

I. 1. Literaturübersicht

I. 1. 1 Probiotika

I. 1. 1. 1 Definition

LILLEY und STILWELL gebrauchten den Begriff „Probiotikum“ 1965 erstmals. Sie bezeichneten damit in Abgrenzung zu der Bezeichnung „Antibiotikum“ eine ausgeschiedene Substanz des Ciliaten *Colpidium campylum*, die das Wachstum anderer Protozoen fördert. Diese Definition wird von PARKER (1974) spezifiziert. Demnach sind Probiotika „Organismen und Substanzen, die zum mikrobiellen Gleichgewicht beitragen.“ Heute versteht man unter einem Probiotikum nach FULLER (1992) „einen lebenden mikrobiellen Futterzusatz, der eine vorteilhafte Wirkung auf das Wirtstier hat, indem er das intestinale Gleichgewicht verbessert“. Fuller vermeidet die Bezeichnung „Substanz“ bewusst, um die Bedeutung der Lebensfähigkeit der probiotischen Organismen zu betonen.

Obwohl Fuller den Menschen nicht explizit ausschließt, erweitern HAVENAAR et al. (1992) die Probiotikadefinition wie folgt: „Eine lebende Mono- oder Mischkultur von Mikroorganismen, die an Mensch und Tier verabreicht wird, und die eine vorteilhafte Wirkung auf den Wirt hat, indem sie das Vermögen der eigenen Mikroflora verbessert.“ Der offizielle Terminus der Europäischen Gemeinschaft für Probiotika lautet „ecological health control product (EHCP)“.

In Abgrenzung zu den Probiotika sind Präbiotika keine lebenden Keime, sondern unverdauliche Oligosaccharide wie Fructose-Oligosaccharide oder transgalaktosylierte Oligosaccharide. Diese können von körpereigenen Enzymen nicht verdaut werden und dienen als Substrat für erwünschte darmeigene Bakterien, die sich so zu Lasten pathogener Keime vermehren (GIBSON und MC CARTNEY, 1998; LOPEZ-VARELA et al., 2002).

Aus der Kombination aus Präbiotika und Probiotika entstehen so genannte Symbiotika. Sie bestehen aus einem Mikroorganismenstamm und einem von ihm verwertbaren Substrat. Meist werden Milchsäurebakterien verwendet, die ebenfalls eine Modulation der Mikroflora bewirken sollen. Das beigefügte Substrat schützt bei der Magen-Darm-Passage und verbessert die Ansiedelung im Magen-Darm-Trakt (GIBSON und ROBERFROID, 1995).

Eine Auswahl von Mikroorganismen, die als Probiotika eingesetzt werden, zeigt Tabelle 1.

Am häufigsten werden verschiedene *Lactobacillus*-, *Streptococcus*- und *Bacillus*-Arten verwendet, sowie *Saccharomyces cerevisiae*.

Bakterien			
<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>acidophilus</i>	<i>bifidum</i>	<i>lactis</i>	<i>mesenteroides</i>
<i>plantarum</i>	<i>infantis</i>	<i>intermedius</i>	
<i>casei</i>	<i>longum</i>	<i>cremoris</i>	<i>Pediococcus</i>
<i>rhamnosus GG</i>	<i>thermophilum</i>	<i>thermophilus</i>	<i>acidilacticii</i>
<i>delbrueckii</i>	<i>adolescentis</i>		<i>cerevisiae</i>
<i>reuteri</i>	<i>animalis</i>		
<i>fermentum</i>			
<i>brevis</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Bacillus</i>
<i>lactis</i>	<i>faecium</i>	<i>freudenreichii</i>	<i>cereus</i>
<i>cellobiosus</i>		<i>shermanii</i>	<i>subtilis</i>
			<i>licheniformis</i>
Hefen und Schimmelpilze			
	<i>Aspergillus</i>	<i>Saccharomyces</i>	
	<i>niger</i>	<i>cerevisiae</i>	
	<i>oryzae</i>		

Tabelle 1: Eine Auswahl von Mikroorganismen, die als Probiotika eingesetzt werden (nach GOLDIN, 1998; ROLLE und MAYR, 2002)

I. 1. 1. 2 Wirkungsmechanismen von Probiotika

Die Wirkungen von Probiotika werden zunehmend dokumentiert. Trotzdem sind viele Mechanismen noch ungeklärt. Das diskutierte probiotische Konzept lässt sich wie folgt strukturieren (nach GÖRKE und LIEBLER-TENORIO, 2001):

Wirkung auf den Wirtsorganismus:

- Veränderung der Schleimhautarchitektur
- Modulation des angeborenen Immunsystems
- Modulation der adaptiven Immunantwort
- Beeinflussung der zellulären Transportmechanismen und der Schleimhautpermeabilität

Interaktionen zwischen probiotischen und anderen intestinalen Mikroorganismen:

- Nährstoffkonkurrenz
- Konkurrenz um Anheftungsstellen
- Veränderung des intestinalen Milieus
- Agglutination pathogener Keime
- Synthese antimikrobieller Substanzen
- Neutralisation bakterieller Toxine

Wirkung auf den Wirtsorganismus

Veränderungen der Schleimhautarchitektur können sich unter Anderem durch ein verändertes Verhältnis von Darmzottenlänge zur Kryptentiefe ausdrücken (KÜHN, 2000). In einer umfangreichen Untersuchung zum Einfluss von Probiotika auf die Schleimhautmorphologie konnte von GÖRKE (2000) gezeigt werden, dass Dünndarmzotten bei Ferkeln, die *Bacillus cereus* var. *toyoi* erhielten, signifikant länger waren, als die Dünndarmzotten in der Kontrollgruppe. Das Zotten : Kriptenverhältnis war im Jejunum dadurch erhöht. Im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zeigte sich auch in einer Ferkelgruppe, die *Saccharomyces boulardii* erhielt, die einheitliche Tendenz zu längeren Zotten. Darüber hinaus wiesen die mit *Saccharomyces boulardii* behandelten Tiere im Jejunum sowohl in der Basis als auch in der Mitte breitere Zotten als die Kontrollgruppe auf. Die Kryptentiefe betreffend waren jedoch weder im Dünn- noch im Dickdarm Unterschiede zwischen Versuchstieren und Kontrolltieren nachzuweisen.

Bei der lektinhistochemischen Darstellung von Muzinen im Dickdarm wurden bei Ferkeln, die *Bacillus cereus* var. *toyoi* oder *Saccharomyces boulardii* erhielten, statistisch abgesichert weniger muzinhaltige Becherzellen nachgewiesen (GÖRKE, 2000).

Die parazelluläre Permeabilität und der Ionentransport durch die Darmschleimhaut können mit der *in vitro* Ussing-Kammer Technik untersucht werden. In einer Ferkelgruppe, die mit *Saccharomyces boulardii* (Perenterol®), *Bacillus cereus* var. *caron* (Paciflor®) und *Bacillus cereus* var. *toyoi* (ToyoCerin®) behandelt wurden, konnten so signifikant niedrigere Mannitfluxraten (ein Marker parazellulärer Permeabilität) gemessen werden (WINCKLER et al., 1998). In dieser Studie beeinflussten Probiotika die Chlorid- und Natriumfluxraten nicht signifikant. Die Sensitivität der Gewebe für Theophyllin, welches den Elektronentransport stimuliert, war im Jejunumepithel der Probiotikagruppe hingegen reduziert. Die Autoren

führen dieses Ergebnis als möglichen zugrundeliegenden Mechanismus der antisekretorischen und antidiarrhoischen Effekte von Probiotika auf.

Für die Beeinflussung von zellulären Transportmechanismen durch Probiotika sprechen die Untersuchungen von BREVES et al. (1997). In dieser Studie wurden Vesikel aus jejunalen Bürstensaummembranen von Schweinen isoliert, die mit *Saccharomyces boulardii* oder *Bacillus cereus* var. *toyo*i gefüttert worden waren. In beiden probiotisch gefütterten Gruppen war im darauf folgenden Versuch zur Aktivität der Bürstensaumenzyme eine signifikant höhere Aufnahme von Glukose, bei der Hefe zusätzlich auch von Alanin, im Vergleich zur Kontrollgruppe zu verzeichnen. Diese Aktivitätssteigerung kann möglicherweise durch die trophische Wirkung von Polyaminen erklärt werden, die in *Saccharomyces boulardii* in großer Menge enthalten sind und die am Zellwachstum sowie der Zellproliferation beteiligt sind. BUTS et al. (1994) konnten hierzu nachweisen, dass die alleinige Verabreichung von Polyaminen dieselbe Auswirkungen auf Bürstensaumenzyme (Saccharase, Maltase) zeigten, wie die Verabreichung von *Saccharomyces boulardii* Kulturen.

Interaktionen zwischen probiotischen und anderen intestinalen Mikroorganismen

Das Anheften von coliformen Keimen konnte drastisch durch die Futtersupplementierung mit *Bacillus cereus* var. *toyo*i verringert werden. Als Wirkungsmechanismus für die Hemmwirkung auf pathogene Mikroorganismen wird die Besetzung von Enterozyten mittels Bildung eines Biofilms an der Darmwand durch Probiotika verantwortlich gemacht (GEDEK, 1986). Auch die Anheftung von probiotischen Keimen an intestinale Epithelien hat eine kompetitive Hemmung der Bakterienadhäsion zur Folge. Dies wurde für *Lactobacillus* Spezies nachgewiesen (GOLDIN et al., 1992).

Die verminderte Bildung von Ammoniak im Darm ist eine Folge der Verringerung fakultativ anaerober Keime im Darm. Anaerobe Keime sind verantwortlich für den mikrobiellen Proteinabbau und die darauf folgende Bildung unerwünschter Metabolite, die für ihre Verstoffwechslung Energie benötigen. Eine positive Probiotikawirkung wird deshalb in diesem Zusammenhang auf den verringerten Energiebedarf in der Leber zur Harnstoffbildung zurückgeführt (KIRCHGESSNER et al., 1993).

Probiotika produzieren antimikrobielle Substanzen, die in der Lage sind Gram-negative und Gram-positive Bakterien zu hemmen. Zu diesen Substanzen zählen organische Säuren, Hydrogenperoxyd und Bakteriozine (ROLFE, 2000). *Saccharomyces boulardii* wird die Bildung eines antibiotisch wirksamen Stoffes zugeschrieben, der sich gegen Gram-negative Mikroorganismen richtet, ähnlich dem Malucidin anderer Hefestämme (GEDEK, 1987). Zu den Bakteriozinen zählen ebenfalls Acidophilin, Lactolin und Acidolin, die von *Lactobacillus acidophilus* produziert werden (MONTES und PUGH, 1993). Diese Stoffe entwickeln

antimikrobielle Aktivität gegen *Escherichia coli* Stämme, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* und andere Sporenbildner. Darüber hinaus werden *Lactobacillus*-Stämmen Wirkungen zugeschrieben, die zur Neutralisation von Endotoxinen führen und die Synthese toxischer Amine hemmen (MONTES und PUGH, 1993). Die Fähigkeit zur Neutralisation bakterieller Toxine wurde auch für *Saccharomyces boulardii* nachgewiesen. CASTAGLIUOLO et al. (1999) konnten mittels *in vitro* Studien an Zellkulturen zeigen, dass eine aus *Saccharomyces boulardii* extrahierte Protease die Toxine A und B von *Clostridium difficile* hemmte. Die Hypersekretion im Ileum und Caecum, die normalerweise durch Toxin A hervorgerufen wird, war auch im *in vivo* Versuch mit Ratten vermindert. In einem *in vitro* Versuch mit Medien, die das karzinogene Lebensmittelmykotoxin Aflatoxin B1 enthielten, konnte gezeigt werden, dass *Lactobacillus*- und *Bifidobacterium*-Stämme in der Lage waren, bis zu 31,3 % des Toxins im Medium zu binden (PELTONEN et al., 2000).

MAIER et al. (1972) untersuchten die Veränderung des intestinalen Milieus durch Darmbakterien. In ihrer Studie wurden konventionell gehaltene Mäuse mit keimfreien Mäusen verglichen. Beiden Gruppen wurden *Shigella flexneri* oral verabreicht. Während sich die pathologischen Keime in der keimfrei gehaltenen Gruppe schnell vermehrten, war die Vermehrung in der konventionell gehaltenen Gruppe vermindert. Die Analyse des Caecuminhaltes ergab, dass der pH-Wert und das Redoxpotential in der konventionellen Gruppe niedriger, und die Konzentration kurzkettiger Fettsäuren höher war, als in keimfreien Mäusen. Im Gegensatz hierzu beobachteten NOUSIAINEN und SUOMI (1991), im Vergleich zu einer konventionell ernährten Kontrollgruppe, keine Veränderung des pH-Wertes bei Ferkeln, denen Milchsäurebakterien zugefüttert wurden.

An der Zellwand von *Saccharomyces boulardii* konnte die Agglutination eines enteropathogenen *Escherichia coli*- sowie eines *Salmonella typhimurium*-Stammes beobachtet werden (GEDEK und AMSELGRUBER, 1990). Die Autoren vermuten einen mannosehaltigen Rezeptor an der Hefezelle, da die Anheftung durch Vorinkubation der *Escherichia coli*-Keime mit Mannose nachweislich abgeschwächt wurde.

I. 1. 1. 3 Probiotika als Immunmodulatoren

Die Stimulierung unspezifischer Abwehrmechanismen durch *Lactobacillus*- und *Bifidobacterium*- Stämme konnte in vielen unterschiedlichen Untersuchungen gezeigt werden. Eine intraperitoneale Injektion von probiotischen Keimen hatte eine gesteigerte Makrophagen- und Natural Killer Zell-Aktivität bei Mäusen zur Folge (KATO et al., 1984). In

diesem Zusammenhang muss jedoch zwischen gesteigerter Immunreaktion und Entzündungsreaktion unterschieden werden. Auch bei oral verabreichten Probiotika war die Phagozytoserate und die Produktion lysosomaler Enzyme durch Makrophagen gesteigert (PERDIGON et al., 1988). QUAN et al. (2001) konnten dies für die Gabe von *Bifidobacterium lactis* an Ferkel im Säugealter (10^9 KBE der Hefe pro Tier und Tag) bestätigen. Die Autoren konnten eine höhere Phagozytoseleistung von Blutmakrophagen und eine höhere lymphoproliferative Antwort bei der probiotisch gefütterten Gruppe nachweisen. Gesteigerte Phagozytose nach oraler Gabe von Milchsäurebakterien konnte ebenso beim Menschen belegt werden (SCHIFFRIN et al., 1994).

Studien zur Wirkung von Probiotika auf die unspezifische Immunantwort zeigen zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. So konnten für Vertreter lebender *Lactobacillus*-Stämme unterschiedliche Wirkungen auf die Phagozytoseleistung von Peritoneal- und Blutmakrophagen gezeigt werden. Wurde *L. acidophilus casei* an Mäuse oral oder intraperitoneal verabreicht, war eine gesteigerte Phagozytoserate von Peritonealmakrophagen zu beobachten, während die intravenöse Gabe einen hemmenden Effekt hatte (ERICKSON et al., 2000). Der gleiche Stamm zeigte beim Menschen nach oraler Gabe keinen Effekt auf Natural Killer Zellen im Blut. Auch PERDIGON et al. (1998) konnten unterschiedliche Effekte durch verschiedene Verabreichungsarten demonstrieren. In ihrem Fütterungsversuch mit *L. casei*, *L. acidophilus* und *L. delbrueckii* zeigten Mäusemakrophagen nach oraler Gabe eine höhere Aktivität, als nach intraperitonealer Gabe.

Gesteigerte Phagozytose wird hingegen auch beim Krankheitsbild der atopischen Allergie beschrieben (ISOLAURI et al., 2001). Phagozyten spielen eine bedeutende Rolle für die frühe Immunantwort, bei der Generalisierung von Entzündungsvorgängen und sind vermehrt bei entzündlich-allergischen Geschehen involviert. Vor diesem Hintergrund untersuchten PELTO et al. (1998) den Einfluss von Probiotika auf Lebensmittelallergien bei Kindern. Sie konnten zeigen, dass probiotische Bakterien die Entzündungsreaktion auf ein Allergen bei erkrankten Kindern einerseits mildern, andererseits bei gesunden Probanden immunstimulierende Effekte haben. Die Autoren interpretieren dieses Ergebnis dahingehend, dass der probiotische Effekt auf das Immunsystem maßgeblich vom Immunstatus des Wirtes abhängt und mehr modulativen als stimulativen Charakter besitzt.

Die spezifische Immunantwort wird von spezialisierten Immunzellen und Immunglobulinen (Ig) vermittelt. Eine große Rolle in der Aktivierung und bei Zell-Zell-Interaktion spielen dabei Zytokine. PERDIGON et al. (1995) untersuchten hierzu den Einfluss von Milchsäurebakterien

auf IgA-produzierende Lymphozyten und sekretorisches IgA im Darm von Mäusen. Die Gabe von Milchsäurebakterien über 7 Tage erhöhte die Anzahl IgA produzierender Zellen im Darm. Dieser Effekt war dosisabhängig zu verstärken. Die Langzeitgabe von Probiotika verminderte hingegen die Gesamtzahl lymphoider Zellen im Darm. Gegen *Salmonella typhimurium* spezifische IgA Gehalte im Darm stiegen dosisabhängig an, wobei die größte Steigerung am 2. Tag mit $2,4 \times 10^9$ *Lactobacillus casei* oder *Lactobacillus acidophilus* Keimen zu erreichen war. Besonderen Wert legen die Autoren auf den histochemischen Nachweis, dass die T-Lymphozyten im Dünndarm nach Gabe von *Lactobacillus casei* signifikant vermehrt waren. Der Anstieg von IgA-produzierenden Zellen wird auf die Zytokinproduktion durch diese T-Lymphozyten zurückgeführt.

SCHAREK et al. (2003) untersuchten den Gehalt an IgA und IgG in Serum, Milch und Fäzes von Sauen und deren Ferkeln, die mit *Enterococcus faecium* behandelt wurden. Von der Geburt bis zum Alter von 2 Monaten wurden weder fäkales IgA, noch IgA oder IgG im Serum, noch IgA oder IgG in der Sauenmilch von dieser Behandlung beeinflusst.

TEJADA-SIMON und Mitarbeiter (1998) immunisierten Mäuse oral mit Cholera toxin (CT), die zusätzlich zu den traditionellen Joghurtbakterien (Kontrollgruppe) *Lactobacillus bulgaricus* und *Streptococcus thermophilus* probiotische Bakterien, wie *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* und *Bifidobacterium infantis* erhalten hatten (Versuchsgruppe). Sie konnten signifikant mehr CT-spezifisches Immunglobulin A in Serum und Kot der Versuchsgruppe nachweisen, als wenn nur die Joghurtbildner oder nur Magermilchpulver gegeben wurden. Zwischen der Versuchsgruppe und den Kontrolltieren gab es hinsichtlich des Gehaltes an spezifischem IgG in Serum und Kot keinen Unterschied.

Auch nach der oralen Verabreichung von *Bifidobacterium bifidum*, bzw. *Bifidobacterium breve* konnte eine gesteigerte Antikörperproduktion gegen Ovalbumin und Cholera toxin gezeigt werden (ISOLAURI et al., 2001).

In einer Untersuchung zum Einfluss von Probiotika auf die Anzahl und Verteilung von Plasmazellen und Lymphozytenpopulationen in der Darmschleimhaut erhielten Ferkel zusätzlich zum Mastfutter *Saccharomyces boulardii* oder *Bacillus cereus* (VAN BRIEL, 2002). Nach Gabe von *Saccharomyces boulardii* kam es zu einer deutlichen Zunahme der IgA⁺Plasmazellen und der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten, nach Gabe von *Bacillus cereus* war die Zunahme der CD6⁺-T-Lymphozyten im mittleren Jejunum besonders ausgeprägt. Im proximalen Jejunum beider Probiotikagruppen kam es zu einer Abnahme der (CD6⁺) T-Lymphozyten im Zottenbereich und zu einer Abnahme der zytotoxischen (CD8⁺) T-Lymphozyten im Kryptepithel. Das Ausmessen der Lymphfollikel in den ilealen Peyer'schen Plaques zeigte eine geringgradige, nicht signifikante Vergrößerung der Follikelfläche.

Der Effekt von probiotischen Mikroorganismen auf Zytokinproduktion und Zytokin messenger Ribonukleinsäure (mRNS) Expression wird unterschiedlich bewertet. Einerseits waren nach 14 Tagen oraler Gabe verschiedener *Lactobacillus*-Stämme keine Veränderungen der mRNS Expression von Zytokinen in Peyer'schen Plaques, Milz oder Lymphknoten von Mäusen nachzuweisen (et al., 1999b). Andererseits konnte eine Steigerung der Tumornekrosefaktor (TNF) - α , Interleukin (IL) -2, IL-5 und IL-6 Produktion durch Probiotika gezeigt werden (MARIN et al., 1997).

Orale Gaben von *Lac. bulgaricus* und *S. thermophilus* förderten im Mäuseversuch die IFN- γ Produktion in Milzzellen, die mit Lymphozytenmitogen stimuliert wurden (MUSCETTOLA et al., 1994). Die Wirkung von Probiotika auf Zytokine kann demnach ebenfalls zutreffender als modulativ umschrieben werden. Als Beispiel wurde die Interferon- γ Produktion von humanen peripheren Blutlymphozyten durch Gaben von Milchsäurebakterien potenziert (DE SIMONE et al., 1986), während die Menge von TNF- α in den Fäzes vermindert wurde (ISOLAURI et al., 2001).

Im Gegensatz zu den aufgeführten Ergebnissen werden manchen probiotischen Keimen in der Literatur auch immunsuppressive und proliferationshemmende Effekte attestiert. Das Homogenisat von *Lactobacillus*-Stämmen wirkte *in vitro* hemmend auf die Lymphozytenproliferation und die Interleukin-4 Produktion durch T-Lymphozyten (SÜTAS et al., 1996). Eine, mit dem supprimierenden Effekt von 10 μ mol Dexamethason/l vergleichbare, Hemmung der Mitogen-induzierten Lymphozytenproliferation, wurde von ISOLAURI et al. (2001) nachgewiesen. Die Autoren schließen aus ihren Versuchen mit Probiotika-Homogenisaten, dass probiotische Bakterien anti-inflammatorische Eigenschaften besitzen, die mit einem therapeutischen pharmazeutischen Mittel vergleichbar sind.

I. 1. 1. 4 Verwendung von Probiotika in der Tiermedizin und Nutztierhaltung

Haustierhaltung

In der Haustierhaltung werden zumeist Kombinationspräparate eingesetzt, die lebende, gefriergetrocknete Kulturen von *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* und *Lactobacillus acidophilus* enthalten (MOLITOR, 1996). Laut Herstellerangaben (z. B. von Bird Bene Bac[®]) werden sie angewendet bei Anorexie, nach chirurgischen Eingriffen am Magen-Darm-Trakt, als Zusatztherapie bei

Infektionskrankheiten, Verletzungen und nach Antibiotikungabe, in anderen Stresssituationen, vor und nach Reisen, während der Aufzucht und bei Futterumstellungen.

Über die Wirksamkeit der Probiotika im Kleintierbereich werden unterschiedliche Angaben gemacht. Es konnte belegt werden, dass *Enterococcus faecium* die Magen-Passage überlebt und sich im Darm vermehrt (ZENTEK et al., 1998). Nach VORBERG (1994) trägt die Gabe von *Enterococcus faecium* zur Eubiose im Darm bei, in anderen Studien ergaben sich jedoch keine Hinweise auf eine günstige Beeinflussung der Verdauungsvorgänge durch Probiotika (MOLITOR, 1996). Signifikante positive Effekte auf Kotkonsistenz und Ammoniumkonzentration konnten bei Hunden beobachtet werden, die *Lactobacillus acidophilus* erhielten (PASCHER und ZENTEK, 2004).

Für den Heimtiersektor sind *Bacillus cereus* und *Saccharomyces boulardii* als Futterzusatzstoffe zugelassen. Bei Gabe von lebenden *Bacillus cereus* var. *toyoi* -Sporen konnten um 12% höhere Tageszunahmen bei Kaninchen und eine verminderte Jungtiersterblichkeit beobachtet werden (KAHRS, 1991).

Nutztierhaltung

Probiotika werden in der Nutztierhaltung vornehmlich prophylaktisch in Stresssituationen und zur Verbesserung der Leistungsparameter eingesetzt. Stresssituationen können zum Beispiel entstehen bei Kolostrummangel, wenn ein erhöhter Infektionsdruck erwartet wird, durch das Absetzen, bei Futterumstellungen, Umstallung und Transporten und durch Erkrankungen, die mit langfristigen Antibiotikagaben einhergehen (MONTES und PUGH, 1993). Futtermittelrechtlich müssen Probiotika den Zulassungsvorschriften der europäischen Gemeinschaft (Richtlinie 70/524/EWG über Zusatzstoffe in der Tierernährung und Richtlinie 87/153/EWG zur Festlegung von Leitlinien zur Beurteilung von Zusatzstoffen) entsprechen. Zugelassene Mikroorganismen werden in die Liste der oben genannten Richtlinie eingetragen, in der auch Angaben zum Dosierungsrahmen für die jeweilige Tierart zu finden sind.

In der Absetzphase wurden Mischungen von Milchsäurebakterien erfolgreich eingesetzt, um die Mortalität von Lämmern und Kälbern zu vermindern und Gewichtsverluste während der absetzbedingten Futterumstellung zu reduzieren (FULLER, 1992). Die Gabe von *Enterococcus faecium* trug zur Stabilisierung der intestinalen Mikroflora und zu Lebendmassezunahmen während der Antibiotikatherapie bei Kälbern und Absatzferkeln bei (OZAWA et al., 1983).

Erkrankungsbedingte Durchfälle im Säuglingsalter werden meist durch Rotaviren und *E. coli* Infektionen verursacht. QUAN et al. (2001) untersuchten die Wirkung von *Bifidobacterium*

lactis (10^9 KBE/Tier/Tag) auf Ferkel im Säugealter. Im Vergleich zur Kontrollgruppe erkrankten die probiotisch gefütterten Tiere seltener an Durchfällen und zeigten eine bessere Futtermittelverwertung. Diese Beobachtung war assoziiert mit geringeren Konzentrationen von *E. coli* und Rotaviren in den Fäzes und höheren spezifischen Antikörpertitern. Die Reduktion coliformer Keime in den Fäzes von Kälbern konnte auch für *Lactobacillus acidophilus* nachgewiesen werden (GILLILAND et al., 1980).

Die Reduzierung anderer Durchfallerreger (zum Beispiel *Salmonella typhimurium*) durch Milchsäurebakterien wurde auch beim Geflügel belegt. Es konnte gezeigt werden, dass *Lactobacillus*-Stämme die Anheftung von *Enterobacteriaceae* an caecalem Mukus vermindern (CRAVE und WILLIAMS, 1997). Die Mortalität gnotobiotischer Küken, die mit pathogenen *E. coli* inokuliert wurden und *Lactobacillus acidophilus* erhielten, war bedeutend niedriger, als bei Küken, die keine Milchsäurebakterien erhielten (WATKINS et al., 1982).

NOUSIAINEN und SUOMI (1991) untersuchten Leistungsparameter und Darmmorphologie von Absatzferkeln, deren Futter entweder mit einem Antibiotikum (Olaquinox), mit einem Probiotikum (Milchsäurebakterien), mit einem Präbiotikum (zum Beispiel ein nichtabsorbierbarer Zucker) oder einem Symbiotikum (Präbiotikum mit Probiotikum) versetzt wurde. Das Futter der Kontrollgruppe enthielt keine Supplementierung. Im Vergleich zu den Kontrolltieren war kein Einfluss der Probiotika auf den Gehalt an organischen Säuren und den pH-Wert im Darm zu verzeichnen. Auch die Messung der Darmzottenlänge und Kryptentiefe ergab keine signifikanten Unterschiede. Aus den mikrobiologischen Daten schließen die Autoren, dass die Effekte von Milchsäurebakterien auf intestinale Parameter und die Wachstumsleistung bei gut funktionierender intestinaler Flora gering sind.

Zu anderen Ergebnissen kommen ABE et al. (1995), die den Effekt von oral verabreichten Bifidobakterien und Milchsäurebakterien auf neugeborene Ferkel und Kälber untersuchten. In dieser Studie wurden Lebendmassezunahmen und Futtermittelverwertung durch Probiotikagaben nachweislich verbessert.

In Tabelle 2 ist der Einfluss von Probiotika auf Lebendmassezunahme und Futteraufwand in verschiedenen Produktionszweigen aufgezeigt. Bei der näheren Betrachtung der Minimal- und Maximalwerte wird ersichtlich, dass in einigen Versuchen keine positiven Effekte, in anderen Versuchen jedoch eine ausgeprägte Beeinflussung der Leistungsparameter zu verzeichnen waren.

	Lebendmassezunahme in % zur Kontrollgruppe	Futtermittelverbrauch in % zur Kontrollgruppe
Ferkelaufzucht	+ 4,8 (- 8,1 bis + 24,3)	- 1,5 (+ 3,1 bis - 9,3)
Kälberaufzucht	+ 5,4 (-5,3 bis + 21,7)	- 2,5 (+ 3,6 bis - 7,9)
Schweinemast	+ 3,7 (- 0,3 bis + 6,7)	- 5,1 (- 1,4 bis - 7,1)
Rindermast	+ 4,8 (- 4,3 bis + 7,2)	- 1,5 (+ 7,6 bis - 4,7)

Tabelle 2: Einfluss von Probiotika auf Lebendmassezunahme und Futtermittelverbrauch in verschiedenen Produktionszweigen (modifiziert nach Arbeitsgemeinschaft für Wirkstoffe in der Tierernährung e. V., 1999).

Untersuchungsgegenstand von Fütterungsstudien mit erwachsenen Rindern ist zumeist die Beeinflussung der Mastleistung und Milchproduktion durch Probiotika. Diese Studien kommen häufig zu unterschiedlichen Ergebnissen. So berichteten JAQUETTE et al. (1988) von einer Zunahme der Milchproduktion um 6,2 % bei Kühen, die mit *Lactobacillus acidophilus* supplementiertes Futter erhielten, während Kühe, die *Saccharomyces cerevisiae* mit dem Futter erhielten, in ihrer Milchleistung zu- wie auch abnahmen (NEWBOLD, 1995). Der Probiotikaaanwendung in der Geflügelproduktion kommt besondere Bedeutung zu, da ein Kotkontakt zwischen Küken und Elterntieren in der Käfighaltung nicht mehr stattfindet und eine entsprechende Mikroflora im Darm der Jungtiere nicht aufgebaut werden kann (FULLER, 1992). Daher wendet man heute das Prinzip der kompetitiven Exklusion an, bei der Probiotika eingesetzt werden, um Darmrezeptoren zu besetzen und damit für die Erregeradhäsion zu blockieren. Durch die Verabreichung von Bakterienstämmen an Junggeflügel soll so die Besiedlung mit pathogenen Keimen verhindert werden (Arbeitsgemeinschaft für Wirkstoffe in der Tierernährung e. V., 1999; VAN BRIEL, 2002). Die Beeinflussung der Leistungsparameter beim Geflügel durch Probiotika konnte vielfach belegt werden. So kam es durch die Verabreichung einer Mischung von *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum*, *Aspergillus oryzae* und *Torulopsis* zu einer Zunahme der Schalendicke, einer Erniedrigung der Dotter- und Serumcholesterolkonzentration sowie zu einer vermehrten Eiproduktion von Legehennen (MOHAN et al., 1995). Die Zulage von *Bacillus cereus* var. *toyoi* bewirkte positive Effekte auf Lebendmasse und Futtermittelverbrauch bei Puten und Broilern (JADAMUS et al., 1999). In früheren Studien, in denen Mischungen von lebenden Milchsäurebakterien verwendet

wurden, konnte ebenfalls eine höhere Eiproduktion beobachtet werden, das Eigewicht und der Futterumsatz wurden jedoch nicht beeinflusst (MILES et al., 1981).

Die uneinheitlichen, mitunter widersprüchlichen Erkenntnisse aus der Probiotikaforschung können zum Teil mit der Verwendung unterschiedlicher Keime erklärt werden, deren Aufbereitung, Aufbewahrung, Dosierung und Verabreichung, sowie dem unterschiedlichen Tiermaterial, in Hinsicht auf Alter, Herkunft, Ausgangsstatus bezüglich der mikrobiellen Besiedelung und Haltungsbedingungen (VANBELLE et al. 1990).

I. 1. 1. 5 **Verwendung von Probiotika in der Humanmedizin**

Das heutige Wissen über den therapeutischen Effekt von Probiotika rekrutiert sich in der Humanmedizin hauptsächlich aus dem Bereich der gastrointestinalen Krankheiten. Es finden vor allem die Genera *Bifidobacterium*, *Saccharomyces* und *Lactobacillus* Anwendung in der Prophylaxe und Behandlung folgender Krankheiten:

- Primäre oder sekundäre Laktoseunverträglichkeit und andere Enzymdefizite
- Antibiotika-assoziierte Diarrhoe (AAD)
- virale, bakterielle oder parasitäre Gastroenteritis
- Reisediarrhoe
- Inflammatory bowel disease (Morbus Crohn, ulcerative Colitis)
- Irritable bowel syndrome
- Colontumore

Bei der Untersuchung von Laktoseunverträglichkeiten hat sich gezeigt, dass Joghurtlaktose besser verdaulich ist, als Laktose, die mit Milch aufgenommen wird. Dies wird auf die Bereitstellung von Laktase durch lebende Joghurtbakterien zurückgeführt, die diese Fähigkeit allerdings durch Pasteurisierung verlieren (DE VRESE et al., 2001). Einen ähnlichen Mechanismus hat man für die verbesserte Sucraseverdaulichkeit durch *Saccharomyces cerevisiae* bei Sucrasemangel festgestellt. *Saccharomyces cerevisiae* ist eine Hefe, die das Enzym Sucrase enthält und die in der Enzym-Substitutionstherapie eingesetzt wird (HARMS et al., 1987).

Eine andere Hefe zeigt einen klinisch nachweisbaren Effekt bei der Prophylaxe der Antibiotika-assoziierten Diarrhoe (AAD). Obwohl die Pathogenese der AAD noch nicht vollständig geklärt ist, steht sie zweifellos in Relation zu Imbalancen der intestinalen Flora (NORD et al., 1986). Nach oraler Gabe konnte für *Saccharomyces boulardii* in drei randomisierten, plazebo-kontrollierten Doppelblindstudien ein geringeres Risiko nachgewiesen werden, an AAD zu erkranken (MARTEAU et al., 2001).

Eine Schwierigkeit in den Erfolgsstudien zur probiotischen Unterstützung der Gastroenteritistherapie, liegt in der ätiologische Vielgestaltigkeit der gastrointestinalen Erkrankungen. Unter den Hauptursachen für Gastroenteritis (*Shigellen*, *Salmonellen*, *C. difficile*, enterotoxische *E. coli*, *H. pylori*, *Rotavirus*) kommen Rotavirusinfektionen bei Kindern am häufigsten vor (ROLFE, 2000). In der symptomatischen Therapie ist die orale Rehydratation am effektivsten, die Durchfalldauer wird von der Flüssigkeitszufuhr aber nicht verringert. MARTEAU et al. (2001) führen in ihrer Studie mehrere placebo-kontrollierte Doppelblinduntersuchungen auf, in denen *Lactobacillus rhamnosus* GG und *Enterococcus faecium* SF 68 die Durchfalldauer bei Rotavirose signifikant verringerten.

Der Wirkmechanismus von Probiotika gegen pathogene Mikroorganismen im Darm, zum Beispiel gegen *E. coli*, dem Hauptverursacher der Reisediarrhöe, scheint nicht nur durch kompetitive Hemmung erklärbar zu sein. MATTAR et al. (2001) entwickelten dazu ein humanes *in vitro* Enterozytenmodell, an dem die inhibitorischen Effekte von *Lactobacillus casei* auf die bakterielle Translokation von *E. coli* C25 untersucht wurden. Sie konnten nachweisen, dass die Passage von *E. coli* durch einen Enterozyten-Monolayer signifikant verringert war, wenn *Lactobacillus casei* zugegeben wurde. Dieser Effekt persistierte nach dem Entfernen von *Lactobacillus casei*. Die Autoren vermuten daher einen direkten Effekt von *Lactobacillus casei* auf Enterozyten: zum einen die Bindung an Enterozytenoberflächenrezeptoren (Konkurrenz mit *E. coli* Anheftung), zum anderen die Hochregulation epithelialer Barrieremechanismen durch sekretierte Substanzen. Sie konnten darüber hinaus zeigen, dass *Lactobacillus casei* keinen nachweisbaren Effekt auf die TEER (Transepithelial electrical resistance) hat, eine Messgröße für die Integrität, beziehungsweise Permeabilität eines Monolayers.

Krankheiten aus dem Bereich der sogenannten Inflammatory bowel diseases (Morbus Crohn, Ulcerative Colitis) sind gekennzeichnet durch chronische und rezidivierende Darmentzündungen idiopathischer Ätiologie, für die keine spezifische Behandlungen bekannt sind. Man vermutet, dass diese Krankheiten auf einer abnormen Immunreaktion auf Bestandteile der Intestinalflora beruhen oder auf einem Defekt der mukosalen Barriere (RUSELER VAN EMDEN et al., 1994). Die wenigen Studien am Menschen zur Wirkung von Probiotika auf Morbus Crohn dokumentieren unterschiedliche Ergebnisse. In einer Untersuchung, in der *Lactobacillus rhamnosus* über 10 Tage verabreicht wurde, konnte kein Einfluss auf die klinischen Symptome gezeigt werden, die Anzahl von IgA sezernierenden Zellen nahm jedoch zu (MALIN et al., 1996). PLEIN und HOTZ (1993) konnten hingegen beweisen, dass die Krankheitsschübe bei einer kombinierten Therapie mit *Saccharomyces*

boulardii über sieben Wochen im Gegensatz zu einer Placebogruppe signifikant verringert waren.

Ähnlich unheitlich sind die Erkenntnisse über den therapeutischen Einsatz von Probiotika beim sogenannten irritable bowel syndrome. Diese Krankheit ist ebenfalls gekennzeichnet durch chronische und wiederkehrende schmerzhaft Durchfälle. MAUPAS et al. (1983) beobachteten eine verringerte Durchfalldauer während der Gabe von *Saccharomyces boulardii*, jedoch keinen Einfluss auf andere intestinale Symptome.

Einige Studien konnten zeigen, dass Probiotika die Konzentration bestimmter Stoffe im Darm verringern, die in der Colonkarzinogenese involviert sein können (WOLLOWSKI et al., 2001, LEE und SALMINEN, 1995). Zu diesen Stoffen zählen beispielsweise Enzyme (β -Glucuronidase, β -Glucosidase, Azoreduktase und Nitroreduktase), die von Bakterien gebildet werden. Die Aufnahme von *Lactobacillus acidophilus* reduzierte die Aktivität dieser Enzyme in den Fäzes (GOLDIN und GORBACH, 1984), während in anderen Studien die Aktivität der Nitroreduktase zwar verringert, die Aktivität der Glucosidase jedoch erhöht war (MARTEAU et al., 1990).

Um eine mögliche Darmkrebsprävention zu untersuchen, wurden Tiere (meist Ratten) mit Milchsäurebakterien gefüttert und dann mit darmkanzerogenen Substanzen (Azoxymethan oder 1,2-Dimethylhydrazin) behandelt. Anschließend wurde die Zahl sogenannter präkarzinogener Läsionen (aberrante Darmschleimhautkrypten) ermittelt. Bei oraler Aufnahme von *Lactobacillus*-Stämmen war die Zahl der Darmtumoren und der aberranten Krypten signifikant reduziert (RAO et al., 1999).

Es wurden verschiedene Mechanismen diskutiert und bestätigt, wie Probiotika auf die Karzinogenese Einfluss nehmen können (ROLFE, 2000): Durch die Hemmung von Bakterien, die präkarzinogene Enzyme in karzinogene umwandeln, durch direkte Einflussnahme auf Tumorzellen und durch Bindung von Karzinogenen. Im Tiermodell wurde der protektive Effekt verschiedener Probiotika auf aberrante Schleimhautkrypten aufgezeigt (BRADY et al., 2000). Keiner der genannten Autoren geht jedoch soweit, Probiotika für die Krebsprävention in Betracht zu ziehen.

Eine weitere Rolle spielen Probiotika in sogenannten „probiotischen Nahrungsmitteln“, beispielsweise Milcherzeugnisse die probiotische Mikroorganismen enthalten. Der Gehalt an koloniebildenden Einheiten ist in diesen Produkten erheblich geringer, als in Formulierungen, die therapeutisch eingesetzt werden.

I. 1. 1. 6 *Bacillus cereus* var. *toyoi*

I. 1. 1. 6. 1 Charakterisierung

In der Gattung *Bacillus* sind Sporenbildner von 0,5-2,5 x 1,2-10 µm Größe zusammengefasst, die aerob und fakultativ anaerob wachsen. Die Endosporen dieser grampositiven Stäbchenbakterien sind resistent gegen Hitze, Austrocknung und chemische Einwirkungen (ROLLE und MAYR, 2002). Die Keime kommen ubiquitär im Boden und im Staub vor.

Bacillus cereus hat Bedeutung als Erreger von Mastitiden bei Kühen, Lebensmittelvergiftungen beim Menschen und im Einsatz als Probiotikum. Die wichtigste Krankheit durch Infektion mit dem penicillinresistenten *Bacillus cereus* ist die Mastitis acuta gravis der Rinder. Aufgrund der Fähigkeit unterschiedliche Toxine zu bilden (emetische Toxine und Enterotoxine), werden *Bacillus cereus* Durchfallerkrankungen und Erbrechen nach Lebensmittelinfektionen zugeschrieben (ROLLE und MAYR, 2002).

Die Subspezies *Bacillus cereus* var. *toyoi* ist ein apathogener Stamm der Gattung (VAN BRIEL, 2002). Definitionsgemäß werden Bacillusarten zur transienten Darmflora gezählt (Arbeitsgemeinschaft für Wirkstoffe in der Tierernährung e. V., 1999).

Zum Einsatz als Probiotikum werden Keime, bzw. deren Sporen gefriergetrocknet als Futterzusatzstoff dem Basisfutter beigemischt. Sporen sind die natürliche Dauerform der *Bacillus*-Keime. Der Auskeimungsprozeß beginnt jedoch erst bei Wasserzutritt und Wärmeeinwirkung. Mehrere Zellwände schützen den Zellkern vor den Beanspruchungen (zum Beispiel Scherkräfte, extreme Temperaturen, Oxidation) die während der Futterherstellung und -lagerung auftreten. Deshalb können *Bacillus*-Sporen für alle Futtertypen verwendet werden. Der Mensch kommt als Konsument mit den verfütterten Probiotika nicht in Berührung, da die verwendeten Keime nicht in die vom Tier stammenden Nahrungsmittel übertreten (Arbeitsgemeinschaft für Wirkstoffe in der Tierernährung e. V., 1999).

I. 1. 1. 6. 2 Wirkungen auf den Wirtsorganismus

Als Probiotika einsetzbare Keime müssen eine Widerstandsfähigkeit gegen die Prozesse der Futtermittelherstellung und der Verdauung besitzen. In erster Linie sind dies die Pelletierung, Lagerung und die sauren Verhältnisse im Magen. Deshalb sind Keime in versporter Form, die im Darm auskeimen, besonders geeignet.

Das Präparat ToyoCerin® (Toyocerin) enthält lebende *Bacillus cereus* var. *toyoi* Keime in versporter Form. Unter dem Einfluss des Darmmilieus sollen diese Sporen auskeimen und dann einen Teil der Darmflora repräsentieren. Bislang wurde Toyocerin zur Anwendung bei Masthühnern, Legehennen, Kälbern, Mastrindern, Zuchthäsinnen und Mastkaninchen bis Oktober 2004 und bei unter zwei Monate alten Ferkeln sowie bei Sauen ohne Altersgrenze zugelassen.

Das Wissenschaftliche Gremium für Zusatzstoffe, Erzeugnisse und Stoffe in der Tierernährung (FEEDAP) der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) veröffentlichte ein Gutachten über die Wirksamkeit des Zusatzstoffes Toyocerin für Mastschweine (FRAGE NR. EFSA-Q-2003-086). Demnach kommt das FEEDAP-Gremium zum dem Schluss, dass das Produkt Toyocerin als Zusatzstoff innerhalb des vorgeschlagenen Dosisbereichs und bei Verwendung während der gesamten Mastperiode wirksam sein kann.

In einem Fütterungsversuch in der Broilermast haben JADAMUS et al. (1999) nachgewiesen, dass *Bacillus cereus* var. *toyoi* - Sporen im Verdauungstrakt bereits nach 30 Minuten auskeimen. Dieses schnelle Auskeimungsverhalten wurde auch beim Ferkel belegt (THELEN und PALLAUF, 1996). Eine Woche nach Aufnahme waren im Blinddarm der Broiler noch Sporen nachweisbar, im vorderen Verdauungstrakt jedoch nicht mehr. Die Autoren schließen daraus, dass die Wirkung von *Bacillus cereus* var. *toyoi* nur bei kontinuierlicher Gabe gewährleistet werden kann, da sich der Keim als transienter Mikroorganismus nicht in der Darmflora etabliert. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass der Futteraufwand in den Probiotika gefütterten Gruppen signifikant reduziert war. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war eine erhöhte Lebendmassezunahme zu verzeichnen. Die Untersuchung zeigte keine gerichtete Dosis-Wirkungs-Beziehung auf.

Für Puten konnte gezeigt werden, dass die Zulage von *Bacillus cereus* var. *toyoi* zum Futter gleichwertige, z. T. bessere Effekte auf die Leistungsparameter bewirkt, als der klassische Leistungsförderer Zink-Bacitracin (JADAMUS et al., 1999).

Gleichartige Effekte auf Futtermittelverwertung und/oder die tägliche Zunahme von Ferkeln, Kälbern und Mastrindern wurden von KÜHN (2000) dargestellt. Die Ergebnisse aus den dort dargestellten Untersuchungen am Darmgewebe und Leistungsversuche zur Wirkung von *Bacillus cereus* var. *toyoi* lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die Dünndarmoberfläche wurde durch vermehrte Bildung von Falten, Zotten und Mikrozotten vergrößert. Die vergrößerte Absorptionsfläche und die dadurch erhöhte

Transportkapazität von Epithelzellen, werden als Ursachen für den erhöhten Nährstofftransport interpretiert.

- Ernährungsbedingte Durchfälle bei Jungtieren wurden deutlich reduziert.
- Ein wesentlicher Teil der Proteinabsorption im Darm wird nicht von einzelnen Aminosäuren bewerkstelligt, sondern über Di- und Tripeptide. Der Transport von Glukose und Dipeptiden durch das Dünndarmepithel wurde durch Toyocerin Gaben gesteigert.

Die Kombination von Leistungsförderern mit Toyocerin zeigte hinsichtlich der Lebendmassezunahme und des Futteraufwandes eine additive Wirkung (IBEN und LEIBETSEDER, 1989). In dieser Studie zur Ferkelaufzucht, in der entweder der Leistungsförderer Virginiamycin oder Toyocerin, bzw. deren Kombination verabreicht wurde, war darüber hinaus die Mortalitätsrate in den Toyocerin-Gruppen um die Hälfte reduziert. Die Autoren führen die nutritive Wirkung von *Bacillus cereus* var. *toyoi* vor allem auf dessen Regulation der intestinalen Mikroflora zurück, indem das Probiotikum unerwünschte Keime der Darmflora reduziert, wie zum Beispiel *E. coli*, dessen Vermehrung im Darm ursächlich für Durchfälle und Todesfälle ist. Die Hemmung von *E. coli* durch *Bacillus cereus* var. *toyoi* wurde durch andere Studien belegt (HATTORI und WATANABE, 1981).

Die nutritive Wirksamkeit wird in einer anderen Studie (KIRCHGESSNER et al., 1993) zudem durch den verminderten Anfall bestimmter Metaboliten des mikrobiellen Protein- und Kohlenhydratabbau (zum Beispiel Ammoniak) im Dünndarm erklärt. In diesem Fütterungsversuch mit entwöhnten Ferkeln wurde die Wirkung von *Bacillus cereus* FH 1457 in verschiedenen Dosen (10^7 bis 10^9 KBE/kg Futter) auf das gastrointestinale Milieu und verschiedene Wachstumsparameter untersucht. Während auf die Durchfallhäufigkeit und den Futteraufwand kein Einfluss zu verzeichnen war, konnten die täglichen Gewichtszunahmen deutlich (um 11,1%) gesteigert werden.

In einem Fütterungsversuch, in dem *B. cereus* var. *toyoi* mit anderen probiotischen Sporenbildnern verglichen wurde, haben KYRIAKIS et al. (1999) ebenfalls beobachtet, dass Mortalität und Durchfallinzidenz in der Probiotika-gefütterten Gruppe erniedrigt waren. Ferkel, die mit *Bacillus licheniformis* Sporen versetztes Futter erhielten, entwickelten sich besser, als die konventionell gefütterte Kontrollgruppe und die Gruppe, die Toyocerin erhielt. Die Autoren schließen aus ihren Ergebnissen, dass die Gabe von *Bacillus licheniformis* Sporen (10^7 viable Sporen pro Gramm Futter) eine wirksame Kontrolle der Durchfälle darstellt, die von enterotoxischen *E. coli* (ETEC) verursacht werden.

Gerichtete Dosis-Wirkungs-Beziehungen lassen sich aus der aktuellen Literatur in wenigen Fällen ableiten. In dem oben erwähnten Fütterungsversuch von JADAMUS et al. (1999) zeigten Dosierungen von 0,5 bis $1,0 \times 10^9$ KBE/kg Futter keinen dosisabhängigen Einfluss

auf die Leistung von Broilern. Auch aus Fütterungsstudien mit Absetzferkeln konnten keine linearen Dosis-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet werden. So steigerten Dosierungen von 10^9 KBE/kg Futter, 10^8 KBE/kg Futter bzw. 10^7 KBE/kg Futter die Gewichtszunahmen um 8,6 %, 11,1 % bzw. 9,5 % (KIRCHGESSNER et al., 1993). In dem von RICHTER (1999) durchgeführten Versuch konnten hingegen die Ferkelverluste mit zunehmender Dosierung reduziert werden.

I. 1. 2 Zelluläre Immunität

I. 1. 2. 1 Differenzierungsantigene des Schweines

Funktionell unterschiedliche Zellen exprimieren unterschiedliche Oberflächenproteine. Der Begriff Cluster of Differentiation (CD) bezeichnet diese Gruppen immunphänotypischer Oberflächenproteine von Zellen, die sich biochemisch und funktionell ordnen lassen. Bei den CD-Molekülen handelt es sich um membrangebundene Glykoproteine, die neben ihrer Nutzung als Marker auch verschiedene Funktionen haben können: Einige CD-Moleküle haben Rezeptor- oder Signalfunktion, darüber hinaus spielen manche eine zentrale Rolle bei der Zell-Zell-Interaktion und -Adhäsion (ABBAS et al., 1996). Man verwendet Antikörper gegen diese Antigene, um Lymphozytenpopulationen und deren Differenzierungs- oder Aktivierungsgrad zu unterscheiden.

CD-Moleküle des Schweines werden analog zu den entsprechenden humanen CD-Molekülen benannt. Die Bezeichnung SWC (swine leucocyte workshop cluster) wird angewendet, wenn ein Oberflächenantigen keine Analogie zu dem entsprechenden humanen Molekül aufweist. Der erste monoklonale Antikörper gegen porcine Leukozytenmarker war 1984 erhältlich (PESCOVITZ et al., 1984).

Im Folgenden sollen verschiedene Differenzierungsantigene, sofern sie für diese Arbeit relevant sind, tabellarisch aufgeführt werden.

Cluster of differentiation	Detektion	Bekannte Funktion	Antikörper	Referenz
CD3	Porzine T-Lymphozyten	Antigenerkennung	BB23-8E6	(PESCOVITZ et al., 1998)
CD8	Porzine T-Zytotoxische Lymphozyten	Bindung an MHC-I-Moleküle	76-2-11	(JONJIC et al., 1984)

CD4	Porzine T-Helfer-Lymphozyten	Bindung an MHCII-Moleküle	74-12-4	(PESCOVITZ et al., 1984)
CD45	Porzine Leukozyten	Signaltransduktion	MAC323	(ZUCKERMANN et al., 2001)
CD25	Porzine aktivierte T-Lymphozyten (IL-2 Rezeptor)	Komplexbildung mit IL 2-Rezeptor	K231.3B2	(BAILEY et al., 1992)
CD11R1	Porzine Eosinophile, Neutrophile und NK-Zellen	Adhäsion	MIL4	(HAVERSON et al., 1994)
CD14	Porzine Monozyten (LPS-Rezeptor)	LPS-Rezeptor	MIL2	(HAVERSON et al., 1994)
SWC6	Porzine Null-Zellen	Antigenerkennung	MAC320	(BINNS et al., 1992)
CD21	Porzine B-Lymphozyten/ dendritische Zellen im Darm	Komplement-rezeptor	BB6-11C9	(DENHAM et al., 1998)
TCR 1	$\gamma\delta$ T-Lymphozyten	Antigenrezeptor	PGBL22-A	(HAVERSON et al., 2001)

Tabelle 5: Differenzierungsantigene des Schweines; alle CD-Moleküle sind mit entsprechenden Referenzen und Antikörper-Herstellerangaben unter folgender Internet-Adresse zu finden: <http://eis.bris.ac.uk/~lvkh/cdlist.htm> (1.7.2004) Siehe hierzu auch unter II.1.2

I. 1. 2. 2 Darmassoziiertes Schleimhautimmunsystem beim Schwein

Die meisten Antigene aus der Umgebung gelangen über mukosale Oberflächen wie den Darm oder den Respirationstrakt in den Körper. Aus diesem Grund kommen den mukosalen lymphoiden Geweben bei der Immunabwehr eine besondere Rolle zu. Lymphozyten, die an mukosalen Oberflächen aktiviert wurden, können von dort systemisch rezirkulieren und auf anderen mukosalen Oberflächen lokalisiert werden (CROITORU und BIENENSTOCK, 1994). Dies ist ein Grund, von einem gemeinsamen Schleimhaut-assoziiertem lymphatischen Gewebe (mucosa-associated lymphoid tissue; MALT) zu sprechen, das in verschiedene anatomische Kompartimente aufgeteilt werden kann.

Als ein Kompartiment des MALT ist das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe (gut-associated lymphoid tissue; GALT) charakterisiert durch die lokale Produktion und Dominanz von Immunglobulin A (IgA). Quantitativ zählt es zu den wichtigsten Effektororganen der adaptiven humoralen Immunität. Das GALT enthält ungefähr 60% aller im Körper vorhandenen Immunzellen (VEGA-LOPEZ et al., 2001) und muss mehreren Anforderungen Rechnung tragen: zum einen ist es Aufgabe des Darmes Stoffe zu resorbieren, auf der anderen Seite ist die Exklusion anderer Stoffe (Pathogene, Toxine) notwendig. Darüber hinaus müssen neben der Toleranz gegen Nahrungsmittelantigenen und intestinalen Bakterien gleichzeitig Abwehrreaktionen gegen unerwünschte Antigene möglich sein. Das GALT ist für diese Funktion ausgerichtet und weist demnach einige Besonderheiten auf.

I. 1. 2. 3 Anatomie des Darmschleimhautimmunsystems

Antigene im Darm treffen zunächst auf das Darmepithel, welches von Mucus bedeckt ist. Der Mucus wirkt pH-Wert stabilisierend sowohl auf der Darms Oberfläche als auch im Lumen und kann die Adhäsion bestimmter Bakterien und Viren verhindern (PABST, 1987). Er wird von Becherzellen gebildet, die zwischen den absorptiven Darmepithelzellen liegen.

Immunzellen finden sich im Darm einerseits diffus verteilt, als sogenannte intraepitheliale Lymphozyten (IEL) und Lymphozyten der Lamina propria (LPL), darüber hinaus gibt es spezielle, mit Lymphozyten gefüllte Zotten im Dünndarm (*lymphocyte-filled villi*) und Ansammlungen von Lymphozyten im Niveau der Krypten (*cryptopatches*) (GEBERT et al., 2000). Intraepitheliale Lymphozyten sind überwiegend T-Zellen vom zytotoxischen Typ, die oberhalb der Basalmembran in engem Kontakt zu Enterozyten liegen (STRAW, 1999; BRANDTZAEG, 1989). Sie migrieren von der *Lamina propria* durch die Basalmembran in das Darmepithel (VAN BRIEL, 2002). IEL sind schon vor der Geburt im GALT vorhanden (BRANDTZAEG, 1989, VEGA-LOPEZ et al., 2001), deshalb scheint ihre Migration in das Epithel auch antigenunabhängig möglich zu sein. Vom Lumen, und damit von luminalen Antigenen, sind sie durch Tight Junctions getrennt (GEBERT et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass sich IEL von peripheren T-Lymphozyten unterscheiden. So exprimieren die meisten der IEL den zytotoxischen CD8 $\alpha\alpha$ Typ, anstelle des CD8 $\alpha\beta$ Typ. Ihre Entwicklung vollzieht sich in den Cryptopatches des Darmes, ohne den Thymus zu passieren (SAITO et al., 1998) (Zur Nomenklatur der CD-Moleküle siehe Kapitel I.1.2.1).

Lymphozyten der *Lamina propria* setzen sich hingegen vor allem aus Plasmazellen und T-Zellen vom T-Helfer-Typ zusammen (BRANDTZAEG, 1989; LEONHARD, 1990; ROBIJN et al., 1995; VEGA-LOPEZ et al., 2001).

Andererseits umfasst das GALT, in der *Lamina propria* und Submukosa verteilte, organisierte lymphoide Strukturen, die als Einzellymphknötchen (Noduli lymphatici) und Peyer'sche Plaques (Noduli lymphatici aggregati) gestaltet sein können (SOLANO-AGUILAR et al., 2001; PABST, 1987; LEONHARD, 1990). Lymphfollikel im Dickdarm werden als lymphoglanduläre Komplexe bezeichnet. Je nach Lokalisation unterscheidet man diskrete jejunale und duodenale Peyer'sche Plaques von einer bandförmigen Peyer'schen Platte im Ileum (UHR, 1993).

Peyer'sche Plaques liegen antimesenterial und ihre Ausdehnung lässt eine zellreiche Region in das Darmlumen vorragen. In dieser Dom-Region befinden sich B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (PABST, 1987). Die Domes sind von einem spezialisierten Epithel bedeckt, das follikelassoziertes Epithel (FAE) genannt wird (POSPISCHIL, 1989; PABST, 1987). Beim Menschen und bei Mäusen exprimieren FAE-Zellen keine MHC (major histocompatibility complex) Klasse II Moleküle, im Gegensatz zu den mikrovillireichen absorptiven Epithelzellen (CROITORU und BIENENSTOCK, 1994). Beim Schwein exprimieren auch Epithelzellen keine MHC Klasse II Moleküle. Das FAE enthält unter anderem M-Zellen („membrane“ BRANDTZAEG, 1989, bzw. „microfold“ ROBIJN et al., 1995), die Antigene aus dem Darmlumen in das darunterliegende lymphoide Gewebe transportieren können (Pospischil, 1989). Das FAE ist weiterhin gekennzeichnet durch das Fehlen von Becherzellen, Zotten und Krypten.

Peyer'sche Plaques und kleinere Lymphfollikel im Darm bestehen in ihren Keimzentren vor allem aus B-Lymphozyten, vereinzelt T-Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen (APZ). In ihrem Aufbau ähneln sie den Lymphfollikeln in Lymphknoten. Sie weisen einen zentralen Bereich mit geringer Proliferationsrate auf, einen peripheren „dunklen“ Bereich mit hoher Proliferationsrate und einen Mantel aus kleinen Lymphozyten (OWEN, 1982).

In den Interfollikarzonen sind überwiegend T-Zellen, vom Typ der CD4 positiven T-Helferzellen zu finden, sowie Makrophagen und interdigitierende Zellen (CROITORU und BIENENSTOCK, 1994). Der große Anteil IgA-produzierender Zellen in den Lymphfollikeln des Darmes, im Gegensatz zu den Lymphfollikeln in den Lymphknoten, ist für das GALT kennzeichnend.

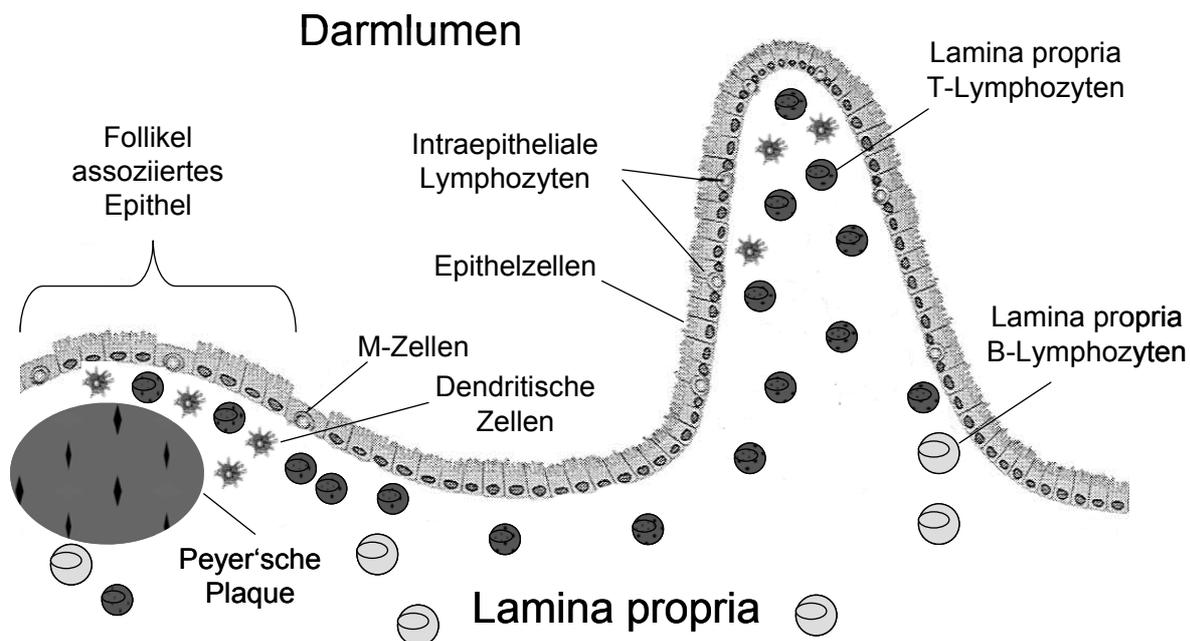


Abbildung 1: Schematische Darstellung lymphatischer Strukturen im Darm

B-Lymphozyten in und um die Peyer'schen Plaques scheinen überwiegend reife Memoryzellen zu sein, wohingegen die B-Zellaggregate der *Lamina propria* Immunglobulin produzierende Plasmazellen sind. Die überwiegende Mehrzahl aller Plasmazellen im Darm produzieren Immunglobulin A (IgA), gefolgt von IgM und IgG (PABST, 1987). Der Transport dieser Immunglobuline zur luminalen Seite wird von der so genannten sekretorischen Komponente bewerkstelligt (BRANDTZAEG, 1989). Die sekretorische Komponente ist ein Transmembranprotein, das von Kryptenzellen produziert wird und IgA durch die Zelle per Transzytose transportiert (NAGURA und SUMI, 1988).

Lymphatische Strukturen im Darm stehen über die Lymphsinus, die die Lymphfollikel umgeben, und die efferenten Lymphgefäße mit den Mesenteriallymphknoten in Verbindung (PABST, 1987). Im Unterschied zu anderen Tieren emigrieren porcine Lymphozyten vom Lymphknoten direkt in die Blutbahn, statt in Lymphbahnen. Eine weitere Besonderheit ist der inverse Aufbau der Lymphknoten (eine Besonderheit, die bei manchen Tierarten erscheint, wie zum Beispiel beim Elefanten, Rhinoceros und Delfin), die peripheres Markgewebe und zentral kortikales Gewebe aufweisen (PABST und BINNS, 1989; BINNS, 1982).

Die Rezirkulation von Immunzellen aus dem Kreislauf an ihren Effektorort wird von Adhäsionsmolekülen gesteuert. Dabei interagieren Selektine, die von naiven T-Zellen gebildet werden, mit Adressinen, die auf vaskulärem Endothel exprimiert werden (JANEWAY und TRAVERS, 1995).

Bei der Geburt sind bereits Peyer'sche Plaques vorhanden, wobei nachgewiesen werden konnte, dass ihre Größe von Antigenexposition und Haltungsbedingungen abhängt und sich bei spezifisch pathogenfrei, keimfrei oder konventionell gehaltenen Tieren unterscheidet (PABST et al., 1988; PABST und ROTHKÖTTER, 1999).

I. 1. 2. 4 Antigenverarbeitung im Darm

Eine Immunantwort ist das Resultat eines Zusammenspiels, in dem Stimulation, Hemmung, Feedback und Wechselwirkungen gleichzeitig von denselben Zellen und Wirkstoffen ausgehen können. Dabei wird ein und derselbe Zelltyp je nach Anforderung reagieren. Vereinfachend kann man die Schritte zum Entstehen einer Immunantwort folgendermaßen untergliedern:

- Erkennungsphase: Aufnahme und Präsentation von Antigen
- Aktivierungsphase: Proliferation und erste Reaktion aktivierter Immunzellen, Systemische Verbreitung und Rückkehr an den Bestimmungsort
- Effektorphase: Mukosale Immunantwort

→ Erkennungsphase: Aufnahme und Präsentation von Antigen

Nach Schluss der Darmbarriere beim Ferkel werden Antigene aus dem Darmlumen von M-Zellen des FAE aufgenommen und auf der basolateralen Seite abgegeben. Da M-Zellen keine MHC (major histocompatibility complex) Klasse II -Moleküle besitzen, schreibt man ihnen lediglich Schleusenfunktion und keine Antigen-präsentierende Funktion zu (POHLENZ und LIEBLER, 1987; BJERKE und BRANDTZAEG, 1988). Dabei werden Antigene in zytoplasmatischen Vesikeln durch die Zelle transportiert, um an der Basalmembran anderen Zellen abgegeben zu werden.

Antigene können ebenfalls von subepithelialen Makrophagen und dendritischen Zellen aufgenommen und präsentiert werden (OWEN, 1982). Diese antigenpräsentierenden Zellen enthalten Antigen-Peptide, die auf ihrer Oberfläche nahe dem MHC-Molekül präsentiert werden. MHC I-Proteine präsentieren dabei Antigene von Erregern, die sich im Zytosol vermehren und die sich nur durch Abtöten der Zellen zerstören lassen.

Dies wird bewerkstelligt durch T-Zellen, die Antigene über MHC I-Moleküle erkennen (ELSON, 1985). Sie sind im Allgemeinen vom CD8-Typ und wirken zytotoxisch.

MHC II-Moleküle hingegen präsentieren Antigene aus intrazellulären Vesikeln (z.B. Bakterien oder Parasiten, die sich in Makrophagen vermehren). CD4 exprimierende Zellen erkennen diese Antigene in Kontakt mit MHC II-Molekülen und aktivieren Makrophagen, diese Partikel zu phagozytieren (JANEWAY und TRAVERS, 1995; PERDIGON et al., 1995). Antigenerkennung in Verbindung mit dem Kontakt zu MHC-Molekülen erlaubt so die Unterscheidung in „fremd“ und „eigen“ (ROBIJN, 1995), sowie die Aktivierung unterschiedlicher T-Zellpopulationen.

MHC II-Proteine werden nur auf immunregulatorischen Zellen exprimiert, während MHC I-Proteine auf fast allen kernhaltigen somatischen Zellen zu finden sind. Diese hochpolymorphen MHC I-Proteine werden auch klassische Klasse Ia-Moleküle genannt, in Abgrenzung zu den nicht-klassischen Klasse Ib-Molekülen (LE BOUTEILLER und LENFANT, 1996). Die nicht-klassischen MHC Ib Moleküle spielen eine besondere Rolle bei der differenzierten Modulation der T-Zellantwort.

Homologe der MHC I-Moleküle (MICA, MICB) präsentieren kein Antigen, sondern werden, ähnlich wie das Heat-shock Protein 70, im Stresszustand von Darmepithelzellen und epithelialen Tumorzellen exprimiert (GROH et al., 2001). $\gamma\delta$ -T-Zellen, $CD8^+\alpha\beta$ T-Zellen und NK Zellen besitzen spezielle Rezeptoren für MICA (NKG2D) und man nimmt an, dass diese Zellen durch Bindung an MICA aktiviert werden (BAUER et al., 1999; GROH et al., 2001). Es konnte nachgewiesen werden, dass Infektionen (Zytomegalievirus, Mycobakterien) und Krebserkrankungen (bei Karzinomen der Lunge, Magen, Brust und Kolon) über die MIC-NKG2D Interaktion, zu T-Zell-Proliferation und Zytokinsekretion in vielen Geweben führen. Bei gesunden Individuen wird MIC nur im Darmepithel exprimiert (SPIES, 2002).

Subepitheliale dendritische Zellen agieren ebenfalls als Antigen-präsentierende Zellen und aktivieren erstmals B-Lymphozyten in den Keimzentren der Lymphfollikeln (BIEWENGA et al., 1993), zudem aktivieren sie T-Zellen in der Interfollikularzone. Diese Aktivierung führt zur Proliferation und Zytokinfreisetzung (MC GHEE et al., 1989), entweder als *de novo*-Synthese (T-Helferzellen) oder als Freisetzung vorgeformter Zytokine (Zytotoxische T- Zellen) (JANEWAY und TRAVERS, 1995; ROBIJN, 1995; MC GHEE et al., 1989; ELSON, 1985).

→ Aktivierungsphase: Proliferation und erste Reaktion aktivierter Immunzellen, Systemische Verbreitung und Rückkehr an den Bestimmungsort

T-Lymphozyten werden unterschieden in T-Helfer und T-Suppressor- oder Zytotoxische T-Zellen. Aktivierte T-Helfer-Zellen können anhand ihrer Reaktionsweise und Zytokinausstattung in zwei Untergruppen (TH₁-und TH₂-Zellen) weiter untergliedert werden:

TH₁-Zellen sind in erster Linie für die zellvermittelte Immunität zuständig, da ihnen die Bildung von Interleukin-2 (IL-2), Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) zugeschrieben wird, welche die zellvermittelte Immunität dominieren (JANEWAY und TRAVERS, 1995). Sie sind darüber hinaus in der Lage Phagozyten zu Infektionsherden zu dirigieren und hämatopoetische Wachstumsfaktoren herzustellen, um die Bildung von Phagozyten im Knochenmark zu stimulieren (MC GHEE et al., 1989).

TH₂-Zellen hingegen sekretieren hauptsächlich IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 und werden deshalb dem Bereich der Antikörper vermittelten Immunität zugeordnet (MOSMANN und COFFMANN, 1989).

Neben diesen gibt es auch T-Helferzelllinien, die durch ein gemischtes Zytokinrepertoire charakterisiert sind. Sie sezernieren TH₁-Zytokine wie auch TH₂-Zytokine und werden als TH0-Zellen bezeichnet (FIRESTEIN et al., 1989; PERDIGON et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, dass die strikte Aufteilung in TH₁-Zellen und TH₂-Zellen, bzw. in ihre Zytokinexpression eine Polarisierung impliziert, die in dieser Form *in vivo* nicht zu beobachten ist. Vielmehr gibt es fließende Übergänge zwischen den T-Zellpopulationen, wie Analysen auf Einzelzellebene belegen (KELSO, 1995; PRUSSIN, 1997).

T-Zytotoxische Zellen induzieren zum einen den programmierten Zelltod der befallenen Zielzelle (Apoptose), zum anderen führt ihre Aktivierung zur Freisetzung von Zytotoxin enthaltenden Granula (Perforine und Fragmentine), die letztendlich die Zelllyse und damit die Eliminierung des enthaltenden Erregers verursacht (JANEWAY und TRAVERS, 1995).

Während der T- und B-Zellantwort besteht eine gegenseitige Beeinflussung. So stimulieren T-Zellen (wie auch Makrophagen) das sogenannte „genetic rearrangement“ von IgM-produzierenden B-Vorläuferzellen, die nun andere Immunglobulinklassen produzieren können (MC GHEE et al., 1989). B-Lymphozyten wiederum zerlegen Antigene und können sie T-Lymphozyten präsentieren.

Makrophagen bewerkstelligen, neben ihrer Fähigkeit zur Antigenaufnahme, -transport und -präsentation, den Abbau von Partikeln, Mikroorganismen und Zelldetritus (OWEN, 1982). Darüber hinaus können sie Immunglobulin (Ig) M produzierende B-Lymphozyten zum „Switch“ induzieren, das heißt zu dem Wechsel von einer IgM Expression zu einer IgA Expression (CEBRA et al., 1988).

Durch Antigenkontakt werden Lymphozyten aktiviert. Der Aktivierung folgt eine Lymphozytenproliferation in den lymphoiden Geweben des GALT. Aktivierte T- und B-Lymphozyten verlassen die Lymphfollikel mit dem Lymphfluss, migrieren in mesenteriale Lymphknoten und erreichen die Blutbahn, wo sie eine weitere Reifung erleben (PABST und BINNS, 1989). Lymphozyten kehren dann selektiv in die *Lamina propria* ihres

Ursprungsorganes bzw. zum Ort des ersten Antigenkontaktes zurück (sogenanntes „homing“), wie auch zu anderen mukosalen Oberflächen (THIELE, 1991). Von großer Bedeutung sind dabei hohe Endothelvenolen (HEV), die die Lymphozyten-Extravasation fördern, sowie Homing-Rezeptoren auf Lymphozyten (Selektine, Integrine) und Endothelien (Adressine) (ABBAS et al., 1996). HEV werden bei keimfrei gehaltenen Tieren nicht gefunden.

B-Zellen durchlaufen an ihrem Effektorort eine klonale Expansion und die Ausreifung zu Immunglobulin produzierenden Plasmazellen. Sezernierte Immunglobuline werden durch das Epithel ins Darmlumen transportiert (BIEWENGA et al., 1993; ROBIJN et al., 1995). Der Transport wird von einem Transmembranprotein (SC) vermittelt, dessen Expression von IFN- γ und TNF- α hochreguliert werden kann (BRANDTZAEG, 1989).

→ Effektorphase: Mukosale Immunantwort

Aufgrund der Lymphozytenproliferation kommt es hauptsächlich zu zwei Veränderungen: einerseits zur Expansion antigenspezifischer Lymphozytenklone (und damit zu einer Verstärkung der Schutzantwort) und andererseits zur Differenzierung von antigenerkennenden Zellen zu antigeneliminierenden Zellen (ABBAS et al., 1996). Von den vielfältigen Effektormechanismen der mukosalen Immunantwort sind in erster Linie die T-Zell vermittelte Zytotoxizität zu nennen, weiterhin die von T-Zellen sezernierten Zytokine, von B-Zellen produzierte neutralisierende Antikörper und das Phagozytosesystem. Einen Überblick über die Funktionen der Bestandteile zellulärer Immunität gibt Tabelle 3 am Ende des Kapitels.

Zytokine haben pleiotrope Wirkungen und verschiedene Effekte auf die gleiche Zielzelle. In der Hauptsache sind sie Mediatoren der natürlichen Immunität, Regulatoren der Entwicklung unreifer und aktivierter Lymphozyten und der immunvermittelten Entzündung (ABBAS et al., 1996). Unter den Zytokinen spielt Interferon-gamma (IFN- γ) eine besondere Rolle. Es ist direkt an der mukosalen Immunantwort beteiligt, da ihm hemmende Wirkung auf die virale Replikation auf mukosalen Oberflächen zugeschrieben wird. IFN- γ wird als der stärkste Makrophagen aktivierende Faktor angesehen (JANEWAY und TRAVERS, 1995), der Makrophagen zur Beseitigung von Tumorzellen durch Freisetzung von reaktiven Oxygenen und TNF- α anregen kann (URBAN, 1986). Es ist direkt an der Reifung aktivierter B-Lymphozyten und am Isotypenswitch beteiligt und vermittelt so zwischen zellulärer und humoraler Immunität (SIDMAN, 1984).

IFN- γ wird von T-Lymphozyten und Natural Killer Zellen gebildet. Während einer Infektion wird IFN- γ von zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8) und TH₁-Zellen produziert. Man nimmt

an, dass IFN- γ die Immunantwort durch TH₁-Zellen fördert, da IFN- γ die Proliferation von TH₂-Zellen hemmt (GAJEWSKI und FITCH, 1993).

Immunglobuline im Darm sind in der Lage, die Absorption potentieller Allergene und Autoantigene zu reduzieren und die Adhäsion von Bakterien zu verhindern, indem sie deren Bindungsstellen besetzen. Darüber hinaus schreibt man IgA neutralisierende Aktivität gegen bestimmte Viren zu (NAGURA und SUMI, 1988). Antikörper können Komplementfaktoren aktivieren, bewirken Mastzelldegranulation und opsonieren Pathogene, um deren Phagozytose zu verstärken (Abbas et al., 1996; JANEWAY und TRAVERS, 1995).

Ziel der intestinalen Immunantwort ist es Pathogene im Darm zu neutralisieren. Gleichzeitig müssen aber destruirende Effekte auf die körpereigenen Gewebe verhindert werden. Vor dem Hintergrund der aufgeführten Mechanismen mukosaler Immunantwort soll hier deswegen ergänzend auf die Begriffe der Immunexklusion und der Immuntoleranz eingegangen werden.

Die Ausbildung einer protektiven Immunantwort ohne ausgeprägte Entzündungsreaktion wird zum einen durch die Produktion neutralisierender und nicht entzündungsvermittelnder Antikörper möglich (PHALIPO et al., 2002). Im Darm wird diese Rolle vor allem durch sekretorisches IgA übernommen, welches widerstandsfähig gegen den enzymatischen Abbau durch Proteasen im Darmlumen ist. Immunglobuline vom IgA-Typ werden im Dünndarm als Dimere produziert (sie liegen im Blut als Monomer vor), wobei die beiden Moleküle über die J-Kette kovalent gebunden sind. Sekretorisches IgA (sIgA) wird aktiv von einem Polyglobulinimmunrezeptor, der sekretorischen Komponente, von der basolateralen Seite auf die luminalen Seite von Epithelzellen transportiert. Erreger, gegen die der Körper Antikörper besitzt, werden von diesen Immunglobulinen im Darm gebunden und damit der Antigenkontakt mit der Schleimhautoberfläche und die Antigenaufnahme vermindert. Es resultiert eine Immunexklusion (BEFUS und BIENENSTOCK, 1982; ALLEN et al., 1990). Die Bindung von sIgA an ein Antigen führt nicht zur Komplementaktivierung, daher resultiert dieser Vorgang nicht in einer Entzündungsreaktion (BRANDTZAEG, 1986; POHLENZ und LIEBLER, 1994).

Andererseits wird die Immuntoleranz gegen harmlose Antigene (zum Beispiel Vertreter der eigenen Darmflora, Nahrungsmittel) durch T-Zellen vermittelt, indem diese auf Antigene mit funktioneller Inaktivität (Anergie) reagieren, apoptotisch werden oder sich zu regulatorischen T-Zellen ausdifferenzieren, die immunsuppressive Zytokine (IL-10, Transforming Growth Factor TGF- β) produzieren (KELSALL und STROBER, 1995).

Die Zytokine IL-10 und TGF- β spielen eine zentrale Rolle bei der Induktion oraler Toleranz.

IL-10-Knockout Mäuse entwickelten spontan eine Enterokolitis, die durch erhöhte Ausschüttung von IL-12 und IFN- γ gekennzeichnet war und die zeigt, dass IL-10 bei der Modulation lokaler Immun-, bzw. Entzündungsreaktionen im Darm notwendig ist (DAVIDSON et al., 2000). Die Funktionen von IL-10 dienen vor allem dazu Entzündungsreaktionen zu beenden; so hemmt IL-10 die Produktion zahlreicher proinflammatorischer Zytokine und wirkt der T-Zellproliferation entgegen (MOORE et al., 2001).

TGF- β hat, wie IL-10, ambivalente Wirkungen, es überwiegen aber immunsuppressive Effekte, indem es die Zytokinsynthese aktivierter T-Zellen hemmt, die Apoptose und den Immunklassenswitch von B-Zellen lenkt und den oxidativen Burst, sowie die Zytokinsekretion von Phagozyten vermindert (DERYNCK und CHOY, 1998).

<p>T-Zellen</p> <ul style="list-style-type: none"> • lysieren Virus-infizierte Zellen • erkennen körperfremde Zellen • befähigen B-Zellen zur AK-Produktion • aktivieren Phagozyten und deren Bildung • produzieren Zytokine 	<p>Zytokine</p> <ul style="list-style-type: none"> • sind beteiligt an der Ausreifung von B-Zellen zu Plasmazellen • sind beteiligt am Isotypenswitch • aktivieren Makrophagen • unterstützen die T- und B-Zelldifferenzierung
<p>B-Zellen</p> <ul style="list-style-type: none"> • differenzieren zu Plasmazellen und bilden dann neutralisierende Antikörper • präsentieren Antigene 	<p>NK-Zellen</p> <ul style="list-style-type: none"> • lysieren Virus-infizierte Zellen • lysieren körperfremde Zellen • erkennen AK-bedeckte Zielzellen
<p>Granulozyten/Mastzellen</p> <ul style="list-style-type: none"> • setzen Histamin und andere Entzündungsmediatoren frei 	

Tabelle 3: Überblick über wichtige Funktionen der Bestandteile zellulärer Immunität

I. 1. 2. 5 Lymphozytenpopulationen des Darmes

In der Literatur finden sich unterschiedliche, zum Teil widersprüchliche, Angaben über die Entwicklung von Lymphozyten im Darm des Schweines von der Geburt bis zum adulten Tier. Dies ist zum einen darin begründet, dass Erkenntnisse aus Messungen an keimfrei

gehaltenen Tieren nicht ohne weiteres mit konventionell gehaltenen Tieren verglichen werden können. Zum anderen lassen sich verschiedene Auswertungsparameter (Zahl der Lymphozyten pro 100 Enterozyten oder Zahl pro Gesichtsfeld) nicht übertragen. Fütterung, Alter und Umwelt beeinflussen die absolute und relative Zahl von Lymphozyten, so dass in der Literatur keine allgemeingültige Auflistung absoluter oder relativer Zellzahlen in verschiedenen lymphatischen Organen des Schweins zu finden ist (PASTORET und GRIEBEL, 1998). Ein gemeinsamer Nenner scheint sich in folgenden Feststellungen abzuzeichnen:

- Die Zahl der Lymphozyten im Darm nimmt mit dem Alter zu, dabei scheint der mikrobielle Stimulus eine bedeutende Rolle zu spielen.

In der *Lamina propria* stieg die Zahl der CD2 positiven T-Zellen von 100 pro mm² am 1. Lebenstag auf 1500 pro mm² am 40. Lebenstag (PABST und ROTHKÖTTER, 1999). Die Zahl an IEL erhöht sich von 2,6 pro 100 Enterozyten am 1. Lebenstag auf 30 pro 100 Enterozyten nach 2 Monaten (PABST und ROTHKÖTTER, 1999). In dieser Studie war die Zahl an IEL bei keimfrei gehaltenen Schweinen zu allen Zeitpunkten geringer. Die Autoren schließen daraus, dass der Anstieg von IEL im Darm vor allem auf den mikrobiellen Stimulus zurückzuführen ist. Ähnliche Zellzahlen wurden schon von CHU et al (1979) erhoben. Dort stieg die Zahl von IEL am 1. Lebenstag von 3,3 pro 100 Enterozyten auf 38,9 am 31. Lebenstag.

- Im Epithel finden sich vor allem T- Lymphozyten, die kurz nach der Geburt weder CD4 noch CD8 exprimieren, im weiteren Verlauf aber zunehmend das für zytotoxische T- Zellen typische CD8-Protein exprimieren.

VEGA-LOPEZ et al. (2001) fanden, dass um den Geburtszeitpunkt 38% aller Lymphozyten in den Darmvilli IEL sind, die in der Hauptsache die CD2⁺CD4⁻CD8⁻ Population darstellen, während bei adulten Schweinen der Anteil von IEL auf 50% ansteigt, die CD2 und CD8, aber nicht CD4 exprimieren.

- In der *Lamina propria* dominieren CD4 positive T- Lymphozyten neben wenigen CD8 positiven Zellen, B-Zellen und Zellen der unspezifischen Abwehr.

So setzen sich nach MC GHEE et al. (1992) die Zellen in der *Lamina propria* des porzinen Gastrointestinaltrakt zusammen aus 20-40% B-Zellen, 40-60% T-Zellen (von denen ein Drittel CD8 exprimieren, der größte Teil CD4 positiv ist), 10% Makrophagen und weniger als 5% Eosinophile, bzw. Mastzellen. In der *Lamina propria* dominieren CD4⁺ Zellen, die unterhalb der Basalmembran liegen (LEONHARD, 1990; VEGA-LOPEZ et al., 2001; BRANDTZAEG, 1989; ROBIJN et al., 1995). Bei der Geburt sind wenig Immunglobulin-enthaltende Zellen im Darm vertreten. Ihre Zahl steigt in den ersten Lebenswochen jedoch

von 20 Zellen pro Flächeneinheit am 6. Lebenstag auf 264 Zellen pro Flächeneinheit am 28. Lebenstag stark an. Dabei dominieren zunächst IgM, dann IgA produzierende B-Zellen (BROWN und BOURNE, 1976).

- In den organisierten lymphoiden Strukturen (Lymphknötchen und Peyer'sche Plaques) dominieren B-Lymphozyten neben vereinzelt CD4⁺ T-Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen (OWEN, 1982). Diese Strukturen sind bei der Geburt bereits vorhanden (PABST, 1987).
- Das Absetzen der Ferkel hat Auswirkungen auf die Entwicklung des intestinalen Immunsystems und muss bei der Erfassung neonataler Immunität berücksichtigt werden. Erfolgte das Absetzen am 17. Lebenstag so bewirkte dies eine signifikante Abnahme von CD4⁺ Zellen in den Peyer'schen Plaques, sowie die signifikante Verringerung der CD8⁺ Zellen im Darmepithel und der CD172a⁺ Zellen (Monozyten und Granulozyten) in den Peyer'schen Plaques und der *Lamina propria* (SOLANO-AGUILAR et al., 2001).
- Doppelt positive CD4⁺CD8⁺ T-Lymphozyten sind sowohl in der *Lamina propria* als auch im Epithel zu finden (ZUCKERMANN und HUSMANN, 1996). Im Vergleich zu anderen Tieren ist diese Population beim Schwein besonders ausgeprägt und ihre Zahl nimmt mit dem Alter zu (BOEKER et al., 1999).

Diese doppelt exprimierenden Lymphozyten wurden diskutiert als T-Lymphozyten, die den Thymus ohne weitere Ausreifung verlassen haben (SAALMÜLLER et al., 1987b; BOEKER et al., 1999). Andere Untersuchungen belegen hingegen, dass diese Population thymusunabhängig ist, da ihre Zahl nach Thymektomie unvermindert ansteigt (ZUCKERMANN und HUSMANN, 1996). Eine thymusunabhängige Entwicklung von $\alpha\beta$ -T-Zellen in Darmkrypten wurde bei der Maus nachgewiesen (SAITO et al., 1998). Da die Mehrheit aller CD4/CD8 doppelt positiven Zellen im Blut zusätzlich CD29 exprimiert (ein Charakteristikum für Memoryzellen), geht man heute davon aus, dass es sich bei dieser Population um Memory-T-Helferzellen handelt (ZUCKERMANN und HUSMANN, 1996).

Die Herkunft und Funktion von $\gamma\delta$ -T Zellen ist aktueller Diskussionsgegenstand. Nahezu alle $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten sind im Thymus gereift. Das bedeutet, dass unreife Zellen, die weder CD4 noch CD8 exprimieren aus dem Knochenmark in den Thymus einwandern. Dort werden sie einer positiven Selektion unterworfen, indem alle Zellen, die kein körpereigenes MHC erkennen, eliminiert werden. Gereifte Zellen verlassen den Thymus und exprimieren neben CD3 entweder CD4 oder CD8.

Nach HAAS et al. (1993) besteht der $\gamma\delta$ -T-Zellpool aus Subpopulationen, die sich thymusabhängig oder thymusunabhängig entwickeln können. Zu der ersten Gruppe zählen

Lymphozyten, die vor allem in der Haut, der Mukosa des Uterus und auch in anderen Geweben zu finden sind und die weder CD4 noch CD8 exprimieren. Die zweite Gruppe entwickelt sich im Epithel des Darmes, ist dort ständig lokalisiert und kann CD8 α exprimieren. Gemeinsam ist ihnen die Fähigkeit, bestimmte Zytokine zu bilden. So wird IFN- γ und IL-5 von intestinalen $\gamma\delta$ -T-Zellen, und IFN- γ , IL-5 und IL-4 von $\gamma\delta$ -T-Zellen des Blutes gebildet. $\gamma\delta$ -T-Zellen erkennen Proteine, die von MHC-Molekülen präsentiert werden und reagieren zwar früher als $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten, aber mit den gleichen Mechanismen (Proliferation, Lymphokinproduktion, Zytolyse, Anergie).

Die Vermutung, dass die T-Zellreifung auch extrathymisch vonstatten gehen kann, zum Beispiel im Gastrointestinalsystem, wird von anderen Autoren geteilt (KAGNOFF, 1998; SAITO et al., 1988). Diese Ansicht wird gestützt durch den Nachweis, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen (ebenso wie CD8 $^+\alpha\alpha$ T-Zellen), im Gegensatz zu klassischen $\alpha\beta$ -T-Zellen, auch in athymischen Mäusen intraepithelial nachweisbar sind (BANDEIRA et al., 1991). BINNS (1994) konnte hingegen zeigen, dass die Zahl der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten nach Thymektomie deutlich abnimmt. Nach THIELKE (2003) spricht die Expression von CD8 $\alpha\alpha$ auf $\gamma\delta$ -T-Zellen für deren extrathymische Herkunft. SAITO et al. (1998) konnten zeigen, dass sich murine intraepitheliale $\gamma\delta$ -T-Zellen in sogenannten „Cryptopatches“ im Darm entwickeln und nicht im Thymus geprägt werden.

I. 1. 2. 6 Periphere Blutlymphozyten

Die Vorläufer- und Stammzellen der Lymphozyten wandern in der Fetalentwicklung aus den blutbildenden Geweben (z.B. der fetalen Leber) in das Knochenmark ein, differenzieren sich dort weiter aus, um wieder in den Blutkreislauf einzutreten. Aus Stammzellen entwickeln sich die myeloische und die lymphatische Zelllinie. Ein Teil der Lymphozyten durchwandert den Thymus (Thymozyten), wo sie geprägt werden (STAINES et al., 1994). Es gibt auch Lymphozyten, die nicht aus dem Knochenmark stammen und eine extrathymale Differenzierung durchlaufen. Unreife Thymozyten haben keine Oberflächenmarker oder Antigenrezeptoren. Auf dem Weg zur Medulla des Thymus beginnen sie diese zu exprimieren und migrieren nach der Toleranzentwicklung als reife T-Lymphozyten in den Blutstrom, in die Lymphbahn und in das periphere Lymphgewebe (ABBAS et al., 1996).

Lymphozyten im Blutstrom tendieren dazu, in zwei Populationen zu segregieren: eine Gruppe zirkuliert zwischen dem Blutstrom und dem systemischen lymphatischen Gewebe der Lymphknoten, Milz und Knochenmark; die andere zirkuliert zwischen dem Blutstrom und den mukosalen lymphoiden Gewebe (STRAW et al., 1999).

I. 1. 2. 7 Subpopulationen des Blutes

Die Angaben über die Zusammensetzung peripherer Blutlymphozyten variieren, so wird die Gesamtzahl von Lymphozyten im Blut von BINNS (1982) mit $10^7/\text{ml}$ angegeben, davon sind 10-20% B-Zellen, 40-70% T-Zellen, die E-Rosetten formen und 30-40% Null-Zellen, die keine E-Rosetten formen (T-Zellen lagern sich in Rosetten an Schaferythrozyten an. Diese Rosetten lassen sich aufgrund ihrer insgesamt höheren Dichte mittels Ficoll-Dichtegradienten von den restlichen Leukozyten der PBMCs separieren). YANG et al. (1996) untergliedern T-Zellen weiterhin nach ihrem T-Zellrezeptortyp. Periphere Blutlymphozyten setzen sich demnach zusammen aus $\alpha\beta$ -T-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen und B-Zellen, sowie Zellen, die weder B- noch T-Zellen sind und Natural-Killer-Aktivität zeigen (YANG und PARKHOUSE, 1996). In einer Studie zur Phänotypisierung porciner Lymphozytenoberflächenmarker fanden YANG und PARKHOUSE (1996) heraus, dass sich CD2 nicht als Pan-T-Zellmarker eignet, da CD2 auch von NK- und B-Zellen exprimiert wird. Die Autoren weisen darauf hin, dass CD3 als Pan-T-Zellmarker verwendet werden kann und unterschieden weitere Lymphozytensubpopulationen im Blut von Schweinen (einen Monat alt) wie folgt:

Lymphozytensubpopulationen	prozentualer Anteil an Gesamtl lymphozyten
$\alpha\beta$-T-Zellen (CD2⁺)	12 ± 3,7
CD4 ⁺ CD8 ⁻	2,1 ± 0,9
CD4 ⁺ CD8 ^{low}	2,2 ± 1,4
CD4 ⁻ CD8 ^{low}	3,7 ± 1,4
CD4 ⁻ CD8 ^{high}	4 ± 1,5
$\gamma\delta$-T-Zellen	23,9 ± 6,5
CD2 ⁺ CD8 ^{low}	2,2 ± 1
CD2 ⁺ CD8 ⁻	1 ± 1
CD2 ⁻ CD8 ⁻	20,7 ± 5
Non T- Non B	31,7 ± 12
CD2 ⁺ CD8 ^{low}	27,7 ± 13,3
CD2 ⁺ CD8 ⁻	2,3 ± 1,7
CD2 ⁻ CD8 ⁻	1,8 ± 1

B-Zellen	$32,4 \pm 12,8$
-----------------	-----------------

Tabelle 4: Lymphozytensubpopulationen im Blut von Schweinen und deren prozentualer Anteil an Gesamtlymphozyten (YANG und PARKHOUSE, 1996).

Im Vergleich zu anderen lymphoiden Strukturen (Milz, Tonsillen, mesenteriale Lymphknoten) waren im Blut weniger $\alpha\beta$ -T-Zellen und mehr $\gamma\delta$ -T-Zellen zu finden. Die Zahl der $\alpha\beta$ -T-Zellen nahm mit dem Alter zu, der Anteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen blieb gleich und die Zahl der NK-Zellen nahm ab. Ähnliche Tendenzen beschreiben SOLANO-AGUILAR et al. (2001) und BOEKER et al. (1999), die darüber hinaus auf die, bei Schweinen besonders große, Population von $CD4^+CD8^+$ Zellen im Blut hinweisen.

Die Hypothese, $CD4^+CD8^+$ Zellen seien unreife T-Zellen, die den Thymus vor Ende ihrer Ausreifung verlassen haben (SAALMÜLLER et al., 1987; ZUCKERMANN et al., 1996; BOEKER et al., 1999) wurde unter anderem von SAALMÜLLER et al. (1989) und PESCOVITZ (1990) widerlegt. Ihren Beobachtungen zur Folge, exprimieren kortikale Thymozyten zusätzlich zu CD4 und CD8 das CD1 Antigen. Dieser „Ortsmarker“ fehlt jedoch auf peripheren $CD4^+CD8^+$ Lymphozyten. Heute werden diese Zellen als ein Resultat extrathymischer, antigen-abhängiger Reifung angesehen (SAALMÜLLER et al., 2002).

Es gibt Hinweise darauf, dass $CD4^+CD8^+$ Zellen sensibilisierte Memory-T-Helferzellen sein könnten, die das CD8 auch nach Rückbildung zu kleinen T-Lymphozyten weiterhin exprimieren (SAALMÜLLER et al. 1987). Für diese Herleitung spricht auch die prozentuale Zunahme dieser Zellen bei älteren Tieren (ZUCKERMANN und HUSMANN, 1996).

Mit der zunehmenden Differenzierung von Leukozytenoberflächenantigenen und der Verfügbarkeit von deren Detektionsantikörpern können in den Zellpopulationen weitere Subpopulationen unterschieden werden. Beim Schwein können so zytolytische $CD4^+CD8^+$ T-Lymphozyten anhand der CD5 Expression in zwei funktionell unterschiedliche Gruppen unterteilt werden. $CD4^+CD5^-CD8^+$ Lymphozyten zeigen spontane zytolytische Aktivität gegen Tumorzellen, während die zytolytische Funktion von $CD4^+CD5^+CD8^+$ Lymphozyten von der Antigenpräsentation durch MHC-Moleküle abhängt (SAALMÜLLER et al., 1994).

HAAS et al. (1993) beschreiben $\gamma\delta$ -T-Lymphozytenpopulationen, die sich in ihrer anatomischen Lokalisation, in ihrer Prägung im Thymus und durch den Zeitpunkt ihres Erscheinens während der Ontogenese voneinander unterscheiden. Demnach gibt es mindestens fünf Untergruppen muriner $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten, die sich zum Teil erheblich unterscheiden. Eine der Subpopulationen wird zum Beispiel vor allem im Darm gefunden, sie

ist thymusunabhängig und exprimiert zusätzlich CD8 $\alpha\alpha$, während eine andere Gruppe, die im Blut zirkuliert, postnatal im Thymus generiert wird.