
2. Literaturübersicht

2.1. Probiotika

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkungen von *Enterococcus faecium* und *Bacillus cereus* var. *toyoi* auf die unterschiedlichen Zellen des Darmtraktes untersucht. Da es sich bei diesen Futterzusatzstoffen um Probiotika handelt, soll im Folgenden ein Überblick über die Definition und die Abgrenzung gegenüber anderen Stoffen wie Präbiotika und Symbiotika gegeben werden. Außerdem sollen die verschiedenen Einsatzgebiete sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin, die Erkenntnisse zur Wirkungsweise sowie die Charakterisierung der verwendeten Keime beschrieben werden.

2.1.1. Definitionen

2.1.1.1. Probiotika

Das aus dem griechischen stammende Wort „pro bios“ bedeutet „für das Leben“ (GISMONDO et al. 1999) und ist somit dem Wort „antibios“ gegenübergestellt.

Der Begriff „Probiotikum“ wurde erstmals 1965 von LILLEY und STILWELL für eine Substanz des Ciliaten *Colpidium campylum* verwandt, die das Wachstum eines anderen Protozoen, nämlich *Tetrahymena pyriformis* stimuliert.

Für das heutige Verständnis dieser Wirkstoffe ist diese Definition zu eng gefasst. Die derzeit allgemein akzeptierte Definition für diese lebensfähigen Keime stammt von FULLER (1989): „Ein Probiotikum ist ein lebender mikrobieller Futterzusatz, der eine vorteilhafte Wirkung auf das Wirtstier hat, indem er das intestinale mikrobielle Gleichgewicht verbessert.“

In den folgenden Jahren versuchten unter anderem HAVENAAR und HUIS IN 'T VELD (1992) hervorzuheben, dass es sich bei Probiotika um Zubereitungen handelt, die „lebende, definierte Mikroorganismen in genügender Menge enthalten“, welche „die Mikroflora in einem Kompartiment des Wirtes“ zu dessen Wohlergehen verändert.

Als Probiotika finden die unterschiedlichsten Arten von Mikroorganismen Verwendung.

Sowohl grampositive (z.B. *Enterococcus spp.*) und gramnegative Bakterien (z.B. *Escherichia coli*-Stamm Nissle 1917) als auch Sporenbildner (z.B. *Bacillus sp.*), Hefen (z.B. *Saccharomyces boulardii*) und Schimmelpilze (GÖRKE und LIEBLER-TENORIO, 2001) werden als Futterzusatzstoffe verwendet.

Alternativ zum dem Begriff „Probiotikum“ wird in humanmedizinischen Publikationen auch die Bezeichnung Biotherapeutikum verwandt.

Der offizielle Terminus der Europäischen Gemeinschaft für Probiotika ist „ecological health control product (EHCP)“, während in den USA die Food and Drug Administration die Bezeichnung „direct-fed microbial (DFM)“ vorschreibt (STAVRIC und KORNEGAY 1995). In Kanada schreibt das Departement of Agriculture and Health die Bezeichnung „viable microbial products“ (entspricht: lebende mikrobielle Produkte) vor.

Abzugrenzen von den Probiotika sind die so genannten Präbiotika und Symbiotika.

2.1.1.2. Präbiotika

Präbiotika sind im Gegensatz zu den Probiotika keine lebenden Organismen sondern verschiedene Poly- und Oligosaccharide (z.B. Inulin, Frukto-, Galakto-, Gentio-, Isomalto-, Laktulo-se, Sojabohnen- und Xylo-Oligosaccharide). Der Abbau dieser Stoffe ist nur durch die im hinteren Verdauungstrakt lokalisierten Bakterien möglich, da den Säugetieren die zur Spaltung notwendigen Enzyme fehlen (IJI und TIVVEY 1998,1999).

GIBSON und MCCARTNEY (1998) bezeichnen Präbiotika als „Substanzen, deren Verabreichung bestimmte erwünschte Mikroorganismengruppen zu Lasten pathogener Keime fördern sollen“. Die durch die Gabe der Präbiotika erwünschte Erhöhung der Zahl an Bifidobakterien im Colon soll „die Gesundheit des Wirtes verbessern“ (GIBSON und ROBERFROID 1995).

2.1.1.3. Symbiotika

Als Symbiotika bezeichnet man die Kombinationspräparate aus einem Mikroorganismenstamm und einem von diesem verwertbaren Substrat.

Sie stellen also eine Kombination aus Probiotika und Präbiotika dar. Durch die zusätzliche Gabe des Substrates soll das Überleben und das Ansiedeln von (lebenden) mikrobiellen Nahrungsmittelzusätzen im Magen-Darm-Trakt verbessert werden und selektiv das Wachstum und der Stoffwechsel einer begrenzten Anzahl an gesundheitsfördernden Bakterienstämmen stimuliert werden (GIBSON und ROBERFROID 1995).

2.1.2. Einsatz von Probiotika beim Menschen

Die Anwendung von Probiotika beim Menschen ist seit über 100 Jahre bekannt. Als erster erkannte Ilja Metschnikow (1845-1916), dass bei einer bestimmten Bevölkerungsgruppe in Bulgarien das Durchschnittsalter weit über dem des Restes der Bevölkerung lag. Auf der Suche nach einer Erklärung fand er heraus, dass sich diese Bevölkerungsgruppe große Mengen an fermentierten Milchprodukten aufnahmen (METSCHNIKOW 1901).

Folglich veröffentlichte er, dass nützliche Darmbakterien das Leben verlängern, während die falsche Zusammensetzung der Darmflora einen schädlichen Einfluss auf das allgemeine Wohlbefinden hat. Die in den fermentierten Milchprodukten gefundenen Bakterien seien in der Lage Fäulnisprozesse im Darm zu unterdrücken und sogar der Arteriosklerose entgegen zu wirken (METSCHNIKOW 1907).

Den im Joghurt gefundenen Mikroorganismus nannte METSCHNIKOW *Bacillus bulgaricus* (später: *Lactobacillus bulgaricus*). Das Resultat der Untersuchungen von Metchnikoff war, dass der Keim in den 1920er Jahren beim Menschen zur Behandlung und Prophylaxe von Durchfallerkrankungen eingesetzt wurde. Durchschlagende Therapieerfolge konnten allerdings nicht erzielt werden und außerdem rückte die Antibiotikatherapie immer mehr in den Vordergrund der Forschung, so dass die Probiotika fast in Vergessenheit gerieten.

Der Wiederentdeckung des probiotischen Konzepts Mitte der 1980er Jahre ging ein zunehmendes Interesse in der Nutztierfütterung in den 1960er Jahren voraus (KNEIFEL 2005). Heute erfreut sich das Konzept wachsender Beliebtheit und die Forschung wird in allen Bereichen vorangetrieben. Dies haben die Probiotika nicht zuletzt der wachsenden Angst der Bevölkerung vor den zunehmenden Antibiotikaresistenzen und der Häufung von Allergien zu verdanken.

Heute werden probiotische Mikroorganismen beim Menschen sowohl unter klinischen Indikationen zur Prävention oder Behandlung von Darmerkrankungen wie auch als Lebensmittelzusatzstoff eingesetzt (SPILLMANN 1997).

Betrachtet man heute die Kühlschränke der Lebensmittelmärkte, dann fällt auf, dass es kaum noch fermentierte Milchprodukte gibt, die nicht wegen der „gesundheitsfördernden Wirkung“ der enthaltenen Probiotika beworben werden. Diese Werbung bewegt sich häufig am Rande der Vorgaben des Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-Gesetzes (LMBG) (LAUN et al. 2002).

Trotzdem, oder gerade deshalb, wächst der Markt um die Probiotischen Lebensmittel weiter und erreicht mittlerweile weltweite Umsatzzahlen in Höhe von mehreren Millionen Euro (ABBOT 2004).

Bei den verwendeten Keimen handelt es sich im Bereich der Lebensmittelzusatzstoffe meistens um Bakterien der Gattungen *Bifidobacterium* und *Lactobacillus*.

Bis heute gibt es aber leider kaum evidenzbasierte Studien, die den so häufig beworbenen Nutzen der probiotischen Lebensmittel belegen.

Der Einsatz von probiotischen Keimen als Therapeutikum nimmt in den letzten Jahren in der Humanmedizin stetig zu (HUIS IN 'T VELD 1998). Die Anwendungsgebiete sind vielfältig. Die Hauptindikation ist nach wie vor die unterstützende Behandlung bei Diarrhöen unterschiedlicher Genese.

Allerdings liegen nicht für alle Bereiche gesicherte klinische Studien vor. Nachgewiesen ist die Wirksamkeit bei der Therapie von infektiösen Diarrhöen bei Kleinkindern (MCFARLAND et al. 1995; VANDERHOOF et al. 1999; SZAJEWSKA et al. 2001; SURAWICZ 2003) sowie bei der Behandlung der Reisediarrhöe mit dem Keim *S. boulardii* (KIRCHHELLE et al. 1996). Ebenso konnte ein positiver Einfluss dieses Keims bei der Antibiotika-assoziierten Diarrhöe festgestellt werden (SURAWICZ 1989). Auch nach der Verabreichung der Keime *E. faecium*, *L. acidophilus* und *L. bulgaris* konnten WUNDERLICH et al. (1989) und GOTZ (1979) eine Verringerung der Durchfallhäufigkeit nach Antibiotikatherapie beim Menschen ermitteln.

Von großem Nutzen sind die Probiotika scheinbar bei der Remissionserhaltung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Speziell in *Colitis ulcerosa*-Studien (KRUIS et al. 1997; REMBACKEN et al. 1999; KRUIS et al. 2002) konnte mit der Applikation von verschiedenen Keimen eine Verbesserung des Gesundheitsstatus der Patienten erreicht werden. Obwohl die Wirkungsmechanismen der Keime im Darmlumen noch relativ ungeklärt sind, wurde mit dem *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917 (EcN) die gleichen Behandlungserfolge erreicht, wie mit dem standardmässig verwendeten Mesalazin. In einer weiteren Studie erreicht VENTURI et al. (1999) mit einem Gemisch aus verschiedenen Laktobazillen- und Bakteroidesspezies (VSL#3®) einen ähnlich positiven Einfluss.

Auch bei der häufig nach Anlegen eines Pouches entstehenden Pouchitis konnten mit VSL#3® Behandlungserfolge erzielt werden. Sowohl die Inzidenz für diese Entzündung direkt nach der Operation als auch die Remissionserhaltung wurden positiv beeinflusst (GIONCHETTI et al. 2000; GIONCHETTI et al. 2003; MIMURA et al. 2004).

Bei einer weiteren CED, dem Morbus Crohn, konnten bisher nur bei Kindern mit leichten Krankheitssymptomen Besserungen nach Gabe von Probiotika vermutet werden (GUPTA et al. 2000).

In der Tumorforschung wird derzeit mit verschiedenen Probiotika experimentiert. Es wird vermutet, dass einige probiotische Keime im Magen-Darm-Trakt unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind kanzerogene Stoffe aus der Nahrung zu binden, und somit den Wirtsorganismus zu schützen (BRADY et al. 2000).

Ein weiteres Einsatzgebiet von Probiotika in der Humanmedizin ist die Allergieprophylaxe.

Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die allergieprophylaktische Wirkung sich scheinbar auf Kinder oder Säuglinge beschränkt, bei denen die mikrobielle Darmflora noch nicht voll ausgebildet ist, und folglich noch eine Beeinflussung durch probiotische Keime möglich ist (HELIN et al. 2002). KIRJAVAINEN und Mitarbeiter stellten 2003 außerdem fest, dass nur bei Verwendung von lebenden Keimen eine allergieprophylaktische Wirkung auf den Organismus zu erreichen ist.

2.1.3. Einsatz von Probiotika in der Veterinärmedizin

Wie beschrieben wurden beim Menschen bereits Mitte des 20. Jahrhunderts verschiedene Keime (*Lactobacillus*-Spezies, Streptokokken, Hefen, Bifidobakterien) als Probiotika für die verschiedensten Zwecke eingesetzt (SCHMÖGER 1960; PARKER 1974; GOTZ 1979) In der Veterinärmedizin kamen die Probiotika erst sehr viel später zum Einsatz.

Die mit Abstand größte Bedeutung besitzen die Probiotika beim Tier in der Nutztierfütterung. Die hier eingesetzten Keime unterliegen somit dem Futtermittelgesetz (FMG).

Im Folgenden soll ein Überblick über die verschiedenen Einsatzgebiete der Probiotika in der Veterinärmedizin gegeben werden. Hierbei ist zwischen dem Einsatz bei Nutztieren, also Tieren die der Lebensmittelgewinnung dienen, und dem Einsatz bei anderen Tierarten zu unterscheiden.

2.1.3.1. Nutztierpraxis

Probiotische Keime finden in der Nutztierpraxis sowohl als Leistungsförderer als auch als Therapeutikum oder Prophylaktikum ihre Anwendung. Am häufigsten werden *Lactobacillus-Streptococcus*- und die sporenbildenden *Bacillus*-Arten in den probiotischen Präparaten der Nutztierpraxis verwendet (Tab.1).

Bakterien			
<i>Bacillus</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>coagulans</i> <i>lentus</i> <i>licheniformis</i> <i>pumilus</i> <i>subtilis</i>	<i>amylophilus</i> <i>capillosus</i> <i>ruminicola</i> <i>suis</i>	<i>Adolescentis</i> <i>Animalis</i> <i>Bifidum</i> <i>Infantis</i> <i>Longum</i> <i>thermophilus</i>	<i>Acidophilus</i> <i>Brevis</i> <i>Bulgaricus</i> <i>Casei</i> <i>Cellobiosus</i> <i>Curvatus</i> <i>Delbruekii</i> <i>Fermentum</i> <i>Lactis</i> <i>Plantarum</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>mesenteroides</i>	<i>acidilacticii</i> <i>cerevisiae</i> <i>pentosaceus</i>	<i>freudenreichii</i> <i>Shermanii</i>	<i>Faecium</i> <i>Intermedius</i> <i>Lactis</i> <i>Thermophilus</i>
Pilze			
<i>Aspergillus</i>	<i>Saccharomyces</i>		
<i>niger</i> <i>oryzae</i>	<i>cerevisiae</i>		

Tab.1: Übersicht über die verschiedenen beim Nutztier als Probiotikum eingesetzten Keime (ROLLE 1993)

2.1.3.1.1 Einsatz von Probiotika als Leistungsförderer

Mit dem vollständigen Verbot seit dem 1.1.2006 von Antibiotika in der Nutztierfütterung zum Zwecke der Leistungssteigerung, ist die Suche nach neuen Wegen zur Produktivitätssteigerung in Landwirtschaftlichen Betrieben nochmals verschärft worden. Betroffen sind hiervon vor allem die Nutztierspezies Wiederkäuer, Schwein und Geflügel.

Sowohl beim Geflügel, als auch beim Schwein wurden bisher verschiedene Untersuchungen zur Leistungssteigerung in den verschiedenen Produktionsbereichen durchgeführt.

So konnten KRÜGER et al. 1977 bereits beim Legehennen eine erhöhte Eiproduktion nach oraler Applikation von Laktobazillen feststellen. Bei Masthähnchen konnten sowohl erhöhte Tageszunahmen als auch ein Anstieg der Stickstoffretention und ein niedrigerer Serumcholesterolspiegel nach Gabe eines Probiotikums ermittelt werden (MOHAN et al. 1996). Bereits 1995 konnte MOHAN mit dem gleichen Präparat aus *Aspergillus oryzae*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, und *Torulopsis* bei Legehennen eine höhere Legezahl, eine Zunahme der Schalendicke und einer Absenkung der Konzentration an Cholesterol im Dotter und Serum provozieren.

Bei Broilern ist es durch Gabe von *Saccharomyces cerevisiae* bereits 1993 gelungen die Leberschädigung aufgrund von Aflatoxinaufnahme mit dem Futter zu reduzieren. (STANLEY et al. 1993).

Auch in der Schweineproduktion nimmt der Einsatz von Probiotika nach dem Verbot der antibiotischen Leistungsförderer stetig zu. Man erhofft sich insbesondere bei den Ferkeln eine Steigerung der Futtermittelverwertung und damit zusammenhängend eine erhöhte Tageszunahme nach der Verfütterung von probiotischen Keimen, wobei die Steigerung der Gewichtszunahme anscheinend sekundär über eine Stabilisierung des intestinalen mikrobiellen Gleichgewichts zustande kommt.

Es werden sowohl Einzelpräparate als auch Kombinationspräparate eingesetzt.

Bei neugeborenen Ferkeln führt die zusätzliche Fütterung von *Bifidobacterium pseudolongum* und *Lactobacillus acidophilus* zu einer schnelleren Gewichtszunahme sofern man die Supplementierung bis zum 56. Lebensstag durchführt. Zusätzlich scheint nach den Untersuchungen von ABE et al. (1995) der Keim *Bifidobacterium pseudolongum* zu einer verbesserten Futtermittelverwertung in dieser Altersgruppe zu führen. KIRCHGESSNER und Mitarbeiter konnten bereits 1993 für mit *Bacillus cereus* gefütterte Ferkel eine höhere Gewichtszunahme messen.

Die Gabe von *Bacillus cereus* var. *caron* führt bei Läufern zu einer signifikant erhöhten Stickstoffretention mit der Folge, dass diese Versuchstiere eine Tendenz zur höheren täglichen Gewichtszunahme entwickeln (SCHEUERMANN 1993). MATHEW et al. konnten 1998 bei Schweinen der gleichen Altersgruppe nach einer *Saccharomyces cerevisiae*-Fütterung zwar eine deutlich erhöhte tägliche Futteraufnahme feststellen, allerdings waren die Gewichtszunahmen bei den Versuchstieren nicht deutlich gegenüber den Kontrolltieren erhöht.

Die Untersuchungen von NOVSIAINEN im Jahre 1991 hatten hingegen zuvor nach der Verabreichung von *Lactobacillus acidophilus* und *Lactobacillus fermentum* keine Veränderungen in der Futteraufnahme bzw. Gewichtszunahme ergeben. Es wurden einige Jahre zuvor sogar noch niedrigere tägliche Zunahmen nach Gabe von *Lactobacillus acidophilus* gemessen (POLLMAN 1980). Bei den Untersuchungen der postprandialen porto-arteriellen Konzentrationsdifferenz von Glucose, Galaktose, L-Laktat und Aminostickstoff bei jungen Schweinen, wurden nach Applikation sowohl von *Bacillus cereus* als auch aus einem Gemisch aus Laktobazillen (*L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. brevis*) keine Veränderungen festgestellt.

Der Erdkeim *Sporobacillus P44* konnte jedoch bei diesen Schweinen eine signifikante Zunahme der Amino-Stickstoff-Absorption induzieren RYCHEN u. SIMOES NUNES 1995).

Bei älteren Mastschweinen gibt es über den Einsatz von Probiotika unterschiedliche Erkenntnisse. ROSEN konnte 1992 nur geringe positive Auswirkung auf die Mastleistung von Schweinen nachweisen.

ALEXOPOULOS konnte hingegen 2004 zeigen, dass sowohl die Futterverwertung als auch die Gewichtszunahme von Schweinen in der Endmast nach Verabreichung von *Bacillus licheniformis*- und *Bacillus cereus*-Sporen deutlich erhöht ist. Es wurden außergewöhnlich hohe Werte von bis zu 7,2% mehr Gewichtszunahme im Vergleich zu den Kontrolltieren und bis zu 9,5% besserer Futterverwertung als bei den Kontrolltieren gemessen. Sollten sich diese Ergebnisse bestätigen, wäre die Ablösung der antibiotischen Leistungsförderer auch in ökonomischer Sicht sinnvoll. Rechnet man doch bei diesen mit dem Schwellenwert von 5% höherer Futterverwertung um den Einsatz betriebswirtschaftlich zu rechtfertigen.

ALEXOPOULOS konnte in seinen Untersuchungen des Weiteren zeigen, dass die Schlachtkörper der mit den Bacillussporen gefütterten Tieren scheinbar in höhere Fleisch-Güteklassen eingeteilt werden.

Auch bei Milchkühen werden die vermeintlich leistungssteigernden Wirkungen der verschiedenen Probiotika erforscht, allerdings mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Es liegen Untersuchungen vor, die sowohl eine Zunahme der Milchleistung um bis zu 17% als auch eine Abnahme um bis zu 6% nach der oralen Gaben von *Saccharomyces cerevisiae* ergaben (WILLIAMS et al. 1991, NEWBOLD 1995). Jedoch konnte bereits 1988 HARRISON einen verlangsamten Abbau von Cellulose bei Milchkühen feststellen, die mit demselben Keim gefüttert wurden.

Sowohl bei Schafen als auch bei Ziegen wurde die Abbaurate eines rohfaserreichen Futtermittels in einem Nylonbeutel im Pansen nach Zufütterung von zwei verschiedenen *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen untersucht. Bei konstantem pH-Wert im Pansen vermochte der eine Keim die Abbaurate zu erhöhen, während der zweite Keim scheinbar keinen Einfluss auf die Verdauung der Rohfaser hatte (FLACHOWSKY et al. 1992).

Für Kaninchen sind sowohl *Bacillus cereus* als auch *Saccharomyces cerevisiae* als Futterzusatzstoffe zugelassen (HARTMANN 2000). KAHRS konnte 1991 bereits nachweisen, dass eine mit dem Probiotikum Toyocerin® gefütterte Versuchsgruppe 12% höhere

Tageszunahmen vorweisen konnte als die entsprechende Masttier-Kontrollgruppe. Außerdem waren bei den Versuchstieren um rund ein Drittel weniger Verluste zu verzeichnen.

2.1.3.1.2. Einsatz von Probiotika als Therapeutikum oder Prophylaktikum

Als erste kamen 1973 NURMI und RANTALA auf die Idee des prophylaktischen Einsatzes von Keimen in der Geflügelproduktion. Aufgrund der Automatisierung des Brutprozesses und der daraus resultierenden Trennung der adulten Hühner von den Küken, war es den Küken nicht mehr möglich, über den Kot der Elterntiere eine protektive Darmflora zu erwerben. Um die daraus folgende geringere Widerstandsfähigkeit gegen pathogene Keime auszugleichen, die so genannte verminderte Kolonisationsresistenz (KURZAK et al. 1998; WEBER 2000), verabreichten sie den neugeborenen Küken eine aus Exkrementen erwachsener, gesunder Hühner gewonnene Kotalaufschwemmung. Dies führte dazu, dass 70 – 80% einer Versuchsgruppe nach eben dieser oraler Verabreichung von Darminhalt nicht mehr mit *Salmonella infantis* infiziert werden konnten, während in der entsprechenden Kontrollgruppe in zumindest einer Lokalisation des Magendarmtraktes eine Kolonisation des pathogenen Keims nachgewiesen werden konnte.

Auf der Grundlage dieser Beobachtung basiert das Konzept der kompetitiven Exklusion (CE). Dieses Konzept beruht auf der Hemmung der Kolonisation von pathogenen Keimen, wie vor allem *Salmonella sp.* und *Campylobacter sp.*, durch die Verabreichung einer Mischung verschiedener Bakterienstämme an Junggeflügel, und den Aufbau einer stabilen protektiven Intestinalflora.

Aufgrund der hohen Salmonellenprävalenz in den Geflügelschlachtkörpern besitzt dieses Verfahren der CE auch heute noch eine große Bedeutung in der Salmonellenbekämpfung (BLANKENSHIP et al. 1993), wobei die besten Ergebnisse mit undefinierten Mischkulturen aus dem Kot adulter, gesunder Tiere erzielt wurden (BARROW 1992). Des Weiteren wurden verschiedene andere einzelne Mikroorganismen, z.B. Laktobazillen auf ihre Wirksamkeit untersucht. FULLER erkannte 1977 bereits, dass die Applikation von verschiedenen Laktobazillen durch eine pH-Wert-Absenkung der entstandenen Milchsäure im Kropf bei Küken das Wachstum von *Escherichia coli* unterdrückt. CRAVEN und WILLIAMS stellten 1997 fest, dass *Lac. salivarius* und *Lac. delbrueckii* die Anheftung von *Salmonella thyphimurium* an den caecalen Mucus reduzieren kann.

Beim Schwein werden sowohl Sporenbildner, wie zum Beispiel *Bacillus cereus* im Präparat Toyocerin®, in der Säuge- und Aufzuchtperiode (IBEN u. LEIBETSEDER 1989), als auch

Milchsäurebakterien bei Sauen und Ferkeln hauptsächlich in Perioden verminderter Widerstandsfähigkeit (FOX 1988) eingesetzt.

Es wird aber meistens von einer prophylaktischen Wirkung ausgegangen, die über die Stabilisierung der intestinalen mikrobiellen Flora erreicht wird. Probiotika werden in der Veterinärmedizin selten als Therapeutikum eingesetzt. Diese noch recht wenig berücksichtigte Anwendungsmöglichkeit der probiotischen Keime ist vermutlich auch darauf zurückzuführen, als dass sie in der Therapie von Erkrankungen nur als zugelassenes Arzneimittel nach dem Arzneimittelgesetz (AMG) und den damit verbundenen strengen Richtlinien der Arzneimittelzulassung eingesetzt werden dürfen. Es werden jedoch verschiedene Präparate als Substitutions- oder Regenerationstherapie bei Durchfallerkrankungen der Jungtiere (Kälber, Ferkel usw.) eingesetzt (KAHRS 1986; FOX 1988; IBEN u. LEIBETSEDER 1989).

2.1.3.2. Einsatz bei anderen Tierarten

Unter dem Einsatz von Probiotika bei anderen Tierarten sind hier im Speziellen die so genannten Luxus-Tiere wie Hunde, Katzen, Heimtiere und Ziervögel gemeint. Die Anwendung erfolgt hier bei vergleichbaren Indikationen und mit nahezu denselben Präparaten wie in der Humanmedizin. Von der Industrie wird in zunehmenden Maße auf die Wirksamkeit der Probiotika als Prophylaktikum in der Ernährung dieser Tiere hingewiesen und diese beworben.

Bei Hunden und Katzen konnte nachgewiesen werden, dass der hauptsächlich zur Prophylaxe der Durchfallerkrankungen eingesetzte Keim *Enterococcus faecium* die Passage des Magen-Darm-Traktes überlebt, sich in den distalen Regionen vermehrt und hier scheinbar zur Stabilisierung der Darmflora beiträgt. (VORBERG 1994; MOLITOR 1996; ZENTEK et al. 1998).

In der Regenbogenforellen-Zucht stellen die Verluste durch *Vibrio anguillarum* ein großes Problem dar. Durch die prophylaktische Gabe von *Pseudomonas fluorescens* konnten die Sterblichkeitsrate verringert werden (GRAM et al. 1999). Ebenso konnten bei jungen Zahnbrassen die Mortalität nach einer Protozoeninfektion durch die Gabe eines Glukans gesenkt werden (EFTHIMIOU 1996).

Bei der Untersuchung von 29 Papageien-Arten fand EICHINGER-LEIN (1992), dass nach einer einmaligen Fütterung eines speziellen Lactobacillus-Stammes bei mehr als der Hälfte der Tiere im Kot, und somit vermutlich auch im Darm, keine Enterobakteriaceen zu finden waren.

Eine andere Untersuchung von NOGOSSEK (2001) konnte ähnliche Tendenzen aufzeigen. Nach der Verfütterung von verschiedenen Pro- und Präbiotika an Kanarienvögel konnte er feststellen, dass die Ausscheidung eines pathogenen *Escherichia coli*-Isolates mit dem Kot bei drei getesteten Probiotika und bei den Präbiotika tendenziell niedriger war.

2.1.3.3. Auswahlkriterien

Damit ein Probiotikum in der Tierernährung als Futterzusatzstoff eingesetzt werden darf, muss es EU-einheitlich als ein solches zugelassen werden. Es muss alle Anforderungen, die in den Zulassungsvorschriften der EG und hier in den Richtlinien 70/524/EWG über die Zusatzstoffe in der Tierernährung sowie der Richtlinie 87/153/EWG zur Festlegung von Leitlinien zur Beurteilung von Zusatzstoffen festgelegt sind, erfüllen.

FULLER (1989), SISSONS (1989), COLLINS u. GIBSON (1999), SAARELA (2000), JADAMUS (2001), SIMON et al. (2001), DUGGAN et al. (2002) und TEITELBAUM, ALLAN Walker (2002), GALDEANO u. PERDIGON (2004), KNEIFEL (2005) und andere Autoren stellen folgende Anforderungen an einen Keim, damit er in probiotischen Präparaten genutzt werden kann:

1. keine Pathogenität gegenüber dem Wirtsorganismus und keine Toxinbildung
2. der Keim muss die Magen-Darm-Passage nach oraler Applikation unbeschadet überstehen
3. der Keim muss auch nach einer längeren Lagerzeit des Probiotikums noch in genügend großer Zahl überleben und er muss die Fähigkeit haben sich an die Enterozyten der Magen-Darmschleimhaut anzuheften
4. der Keim muss möglichst resistent gegen mechanische Einflüsse während der technischen Verarbeitung sein
5. der Keim muss die Fähigkeit haben im Gastrointestinaltrakt Kolonien zu bilden
6. der Keim sollte antimikrobielle Substanzen bilden
7. der Keim sollte für den Wirtsorganismus gut verträglich sein und möglichst aus der physiologischen Darmflora des Wirtes stammen
8. der Keim sollte mit der Faeces nur in sehr geringen Mengen ausgeschieden werden

9. der Stamm des verwendeten Keims darf sich in dem Resistenzverhalten nicht von Feldstamm unterscheiden (Europäische Kommission für Gesundheit und Verbraucherschutz, 27.04.2000)
10. der Keim sollte gute sensorische Eigenschaften besitzen
11. der Keim sollte das Immunsystem des Wirts stimulieren

2.1.4. Wirkungsmechanismen der Probiotika

Der Wirkungsmechanismen der Probiotika ist trotz nachgewiesenem klinischen Nutzen und der mittlerweile weit verbreiteten Anwendung von probiotischen Produkten weitgehend unbekannt und folglich Gegenstand aktueller Forschung (SIMON et al.2001; BAUM et al. 2002; VAHJEN u. MÄNNER 2003; SIMON u. VAHJEN 2004; VAHJEN et al.2004).

Man geht heute davon aus, dass es nicht nur einen Mechanismus der Probiotika gibt, der im Wirt zu einer Verbesserung des Gesundheitsstatus führt, sondern dass es sich bei dem klinischen Nutzen der Keime für den Organismus um ein polyfaktorielles Geschehen handelt. Es wird angenommen, dass hierbei im Wesentlichen zwei große Effekt-Bereiche der Probiotika zu unterscheiden sind. Zum einen die direkte Wirkung des aufgenommenen Keims auf den Wirt, und hier insbesondere auf die Darmschleimhaut und das darmassoziierte Immunsystem (MEYDANII 2000; ZIMMERMANN et al. 2001). Zum anderen die direkte und indirekte Wechselwirkung des Probiotikums auf die pathogene Darmmikroorganismen (Tab.2).

Wirkung der Probiotika auf den Wirtsorganismus
<ul style="list-style-type: none"> • Förderung des unspezifischen Immunsystems • Verstärkung des spezifischen Immunsystems • Beeinflussung der Schleimhautpermeabilität • Anabole Wirkung auf den Gesamtstoffwechsel • Förderung der Schleimhautdifferenzierung
Wirkung der Probiotika auf pathogene Mikroorganismen im Darmlumen
<ul style="list-style-type: none"> • Konkurrenz um Nährstoffe • Konkurrenz um Bindungsstellen • Agglutination von pathogenen Keimen • Veränderung des intestinalen Milieus • Produktion von antimikrobiellen Substanzen • Neutralisation von Toxinen

Tab.2: Hypothesen zu Wirkungsmechanismen und Angriffspunkte probiotischer Mikroorganismen (GÖRKE u. LIEBLER-TENORIO 2001)

2.1.4.1. Wirkung der Probiotika auf pathogene Mikroorganismen im Darmlumen

2.1.4.1.1. Konkurrenz um Nährstoffe

Ein scheinbar wichtiger Wirkungsmechanismus der Probiotika ist ihre Nährstoffkonkurrenz gegenüber pathogenen Keimen im Darmlumen. Man erhofft sich durch die Gabe von probiotischen Keimen eine vermehrte Verwertung derselben Nährsubstrate, welche auch für die unerwünschten pathogenen Mikroorganismen notwendig sind. In der entstandenen Konkurrenzsituation stehen den schädlichen Keimen nun nicht mehr ausreichend Nährstoffe für eine uneingeschränkte Aktivität und Wachstum zur Verfügung (FOX 1988; FULLER 1989; ROLFE 2000). Bereits 1978 konnten COLLINS u. CARTER diese Konkurrenz in den Ergebnissen ihrer Arbeit vermuten lassen. Sie konnten zeigen, dass keimfrei gehaltene Mäuse, deren intestinale Mikroflora nicht in Kontakt mit anderen Keimen gekommen war, bereits bei einer sehr viel niedrigeren Dosis von Salmonella enteritidis letal erkrankten als konventionell gehaltene Mäuse. Auf Basis der Vermutung von HUNGATE (1984), der eine Destabilisierung der Dickdarmflora aufgrund eines starken Überschusses an leicht fermentierbaren Kohlenhydraten vermutete, konnten WILSON u. PERINI (1988) nachweisen, dass eine Vermehrung von *Clostridium difficile* in der Darmflora von Mäusen nur unter Anwesenheit von Glukose, N-Azetyl-Glukosamin oder Sialinsäure möglich war. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass anscheinend die Anwesenheit von leicht verwertbaren Kohlenhydraten für eine Besiedlung des Darmtraktes mit bestimmten pathogenen Keimen notwendig ist, und es somit über die Applikation von probiotischen Keimen, die eben dieselben Kohlenhydrate als Nährstoffgrundlage haben, möglich ist die pathogenen Mikroorganismen in ihrem Wachstum und Aktivität zu hindern.

2.1.4.1.2. Konkurrenz um Bindungsstellen

Eine weitere These der Wirkungsweise der Probiotika ist die anscheinende Konkurrenz um Bindungsstellen an der Darmschleimhaut (RINKINEN et al.2003; ULBRICH et al. 2004).

Für einige Mikroorganismen ist die Anheftung an die Darmschleimhaut an bestimmte Bindungsstellen notwendig um ihre pathogene Wirkung zu entfalten.

Die physiologischen Darmbakterien stellen für diese pathogenen Mikroorganismen die räumlich erste Barriere vor dem direkten Kontakt mit der Darmschleimhaut dar. Folglich stehen bei einer geschwächten Intestinalflora mehr Bindungsstellen für diese pathogenen Keime zur Verfügung. Nach einer erfolgreichen, möglichst zahlreichen Besiedlung mit apathogenen Keimen wie der

physiologischen Mikroflora oder probiotisch wirksamen Bakterien, bleibt für pathogene Keime keine Kolonisationsmöglichkeit mehr an der Oberfläche der Mucosa. Bei Ferkeln, deren Darm mit einem apathogenen K88-positiven *Escherichia coli*-Stamm kolonialisiert wurden, konnten nach einer Infektion mit einem toxinbildenden Stamm mit dem identischen Antigen keine Erkrankungen festgestellt werden DAVIDSON u. HIRSH (1976). Ob eine wirkliche Verdrängung der transienten Bakterien durch die Probiotika erfolgt ist allerdings noch unklar. Vielmehr wird vermutet, dass alleine eine dichte Besiedlung der Mucosa mit apathogenen Bakterien als eine Art Schutzfilm die Anlagerung der pathogenen Keime behindert (MURALIDHARA et al. 1973). SAVAGE konnte bei Mäusen und Ratten die mit Penizillin behandelt wurden, schon 1969 eine Verdrängung von Laktobazillen von der kutanen Schleimhaut durch *Trorulopsis* feststellen. Die Besiedlung mit den Hefen wurde nach dem Absetzen des Antibiotikums wieder durch die physiologischen Laktobazillen-Kolonien verdrängt.

2.1.4.1.3. Agglutination von pathogenen Keimen

GEDEK u. AMSELGRUBER (1990) konnten nachweisen dass die Hefe *Saccharomyces boulardii* die Fähigkeit hat, einen bestimmten pathogenen *Escherichia coli*-Stamm und einen *Salmonella typhimurium*-Stamm zu agglutinieren und damit ihre Pathogenität abzuschwächen. Die Agglutination gelang bei dem *Escherichia coli*-Stamm allerdings erst nach einer Mannose-Vorinkubation, was auf einen Mannose-Rezeptor der Hefe schließen lässt.

2.1.4.1.4. Veränderung des intestinalen Milieus

Als nachgewiesen gilt die Wirkung der Probiotika durch Veränderung des intestinalen Milieus. Die meist oral dem Wirt zugeführten probiotischen Keime vermehren sich im Darmlumen und schaffen durch ihre Stoffwechselaktivität und den entstehenden Produkten eine Umgebung für pathogene Keime, die deren Aktivität und Vermehrung hemmen (NOGOSSEK 2001). Die wichtigste Veränderung scheint hierbei die Absenkung des pH-Wertes des Darmchymus zu sein. Verantwortlich für diese Absenkung sind hauptsächlich die von den probiotischen Bakterien gebildeten organische Säuren, aber auch das von Milchsäurebakterien gebildete Laktat.

Die Anhäufung dieser Säuren im Darm scheint der Vermehrung und der Bildung von Toxinen durch enteropathogene Keime entgegenzuwirken (AUDISIO 1999; COLLINS u. GIBSON 1999). Bereits 1963 konnten BURNETT u. HANNA eine Senkung der *Escherichia coli*-Keimzahl im Kot von Schweinen nachweisen, deren Futter Laktat zugesetzt wurde. Hiermit

verbunden war auch die Absenkung der Gesamtkeimzahl im Darm (WHITE et al. 1969). Einen identischen Effekt, nämlich die Anhäufung von Laktat im Dünndarmchymus von Puten, konnte VAHJEN und Mitarbeiter 2002 durch die Gabe des Probiotikums Cylactin® (*Enterococcus faecium* NCIB 10415) in einer Dosierung von $4,2 \times 10^{10}$ KBE/g erreichen. Die orale Anwendung des Probiotikums Cylactin® führte hier zu einer Stimulierung des Wachstums von Milchsäurebildenden Bakterien. Ebenfalls höhere Laktatspiegel konnten von MÄNNER (2002) im Dünndarmchymus von Puten nach Gabe von *Enterococcus faecium* gemessen werden.

Beim Menschen konnten ähnliche Ergebnisse mit den Keimen *Bifidobacterium bifidum* bei Säuglingen (LANGHENDRIES et al. 1995), sowie mit dem Keim *Bifidobacterium longum* beim Erwachsenen (BENNO u. MITSUOKA 1992) gemacht werden. In beiden Fällen konnte nach regelmäßiger Aufnahme des Probiotikums ein Absinken des pH-Wertes in den Faeces der Patienten festgestellt werden.

Ein weiterer Angriffspunkt der Probiotika scheint die Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren im Darmlumen zu sein. So konnte man im Caecum von Mäusen feststellen, dass die, durch mikrobielle Fermentation entstehende freien Fettsäuren, anscheinend die Besiedlung und Vermehrung mit Enterobakteriazeen hemmen (BYRNE u. DANKERT 1979). Diese Ergebnisse stehen im engen Zusammenhang mit den Untersuchungen von BREVES und Mitarbeitern (2000). Sie konnten für die Hefe *Saccharomyces boulardii* einen Einfluss auf eben diese Anteile kurzkettiger Fettsäuren im Colon nachweisen. In ihrem Versuch konnten die Hefen den, durch eine Clindamycin-Behandlung abgesunkenen, Gehalt an freien Fettsäuren ausgleichen. Der durch die Antibiotikagabe abgesunkene Butyrat-Spiegel konnte allerdings nicht durch eine zusätzliche Gabe von *Saccharomyces boulardii* wieder ausgeglichen werden. Sowohl die kurzkettigen Fettsäuren als auch das Butyrat sind für die Ernährung und die Funktion des Wasser- und Elektrolyshaushaltes von großer Bedeutung (ROEDIGER 1980).

Eine weitere Möglichkeit das Milieu für eine Kolonisation mit dem Keime *Escherichia coli* zu verschlechtern ist nach KOOPMAN et al. (1979) die Erhöhung der Propionsäure -Konzentration im Darm.

Die Konzentration von Verdauungsenzymen im Darmlumen ist für die Nährstoffresorption und insgesamt der Futtermittelverwertung des Wirtsorganismus von großer Bedeutung. Einige Probiotika sind in der Lage Enzyme zu bilden, zu aktivieren oder zu hemmen (FULLER 1989; VAN BRIEL 2002).

Die häufig in probiotischen Präparaten verwendeten Laktobazillen sind nach LING et al. (1994) in der Lage, durch eine Veränderung der Aktivität verschiedener Enzyme wie β -Glukuronidase, Nitroreduktase oder Glykocholathydrogenase das intestinale Milieu ebenfalls zu Ungunsten von pathogenen Mikroorganismen zu verändern.

2.1.4.1.5. Produktion von antimikrobiellen Substanzen

Das so genannte „antibiotische Prinzip“ bezieht sich auf die Fähigkeit der Probiotika Stoffe zu bilden, die das Wachstum und die Vermehrung von unerwünschten Keimen unterdrücken (GEDEK 1993, FLACHOWSKY et al. 1996). Diese antibiotisch wirksamen Stoffe werden von den probiotischen Keimen scheinbar nicht provoziert produziert, sondern fallen als Stoffwechselprodukte an. Bei diesen antimikrobiell-wirksamen Substanzen handelt es sich z.B. um organische Säuren, Wasserstoffperoxyd und Bakteriozine (HAVENAAR et al. 1992; JIN et al. 1997; ROLFE 2000). Bereits 1944 konnten MATTICK u. HIRSCH mit einem bei Streptokokken gefundenen Stoff das Wachstum von anderen Streptokokken, einigen Clostridien, Bazillen und Laktobazillen in vitro hemmen.

Heute nimmt man allerdings an, dass es sich bei diesen Stoffen nicht um bakterizide, sondern vielmehr um bakterio-statische Stoffe handelt, die hauptsächlich über eine Milieuveränderung im Darm wirken.

2.1.4.1.6. Neutralisation von Toxinen

Einige Probiotika haben anscheinend die Fähigkeit für den Wirt toxische Stoffe im Darmlumen zu neutralisieren. Dies geschieht entweder durch die Bindung des Giftstoffes oder indirekt durch die Bildung von neutralisierenden Substanzen. SISSONS beschreibt 1989, dass *Lactobacillus bulgaricus* in der Lage ist, im Darm von Schweinen die Wirkung eines Neurotoxins zu neutralisieren. Für Bifidobakterien konnte in vitro nachgewiesen werden, dass die das Redox-Potential im Darm durch Bindung von freien Eisen-Radikalen verändern. Freies Eisen ist als Wachstumsfaktor für die meisten pathogenen Bakterien im Darm essentiell (KOT u. BEZKOROVAINY 1999). Auch STECCHINI und Mitarbeiter konnten 2001 dieses Bindungsvermögen von freien Radikalen bei einigen Laktobazillenstämmen nachweisen.

Es erscheint außerdem möglich, dass einige probiotische Keime Toxinrezeptoren für spezielle Giftstoffe haben, und somit in der Lage sind, diese Toxine im Darm zu binden, bevor sie in Kontakt mit den Enterozyten kommen und ihre Pathogenität entfalten können.

Saccharomyces boulardii hat scheinbar genau diese Fähigkeit zur Bindung an eine Untereinheit des Cholera-toxins (BRANDAO et al. 1998).

In vitro konnte ebenfalls die Menge des Toxin A von *Clostridium difficile*, die sich an die Bürstensaumzellen des Ileums von Ratten anlagert, gesenkt werden, wenn die Zelllinien vorher mit *Saccharomyces boulardii* inkubiert wurden. Am lebenden Tier hatte dies zur Folge, dass die durch das Toxin A verursachte Hypersekretion im Darm verringert werden konnte. (POTHOULAKIS et al. 1993; IZADNIA et al. 1998).

Eine aus der Hefe extrahierte Serinprotease vermochte ebenfalls die Toxinwirkung zu vermindern (CASTAGLIUOLO et al. 1996). In einem weiteren Versuch neutralisierte diese Protease auch das Toxin B von *Clostridium difficile* in einer menschlichen Colon-Zelllinie (CASTAGLIUOLO et al. 1999).

Einige Autoren gehen sogar davon aus, dass ein von Laktobazillen gebildetes Enzym der Tumorbildung im Wirt entgegenwirkt (FULLER 1989; GOLDIN 1998, ROLFE 2000, SANDERS 2000).

Signifikant nachweisen konnte REDDY (1998) die tumordepressive Wirkung von *Bifidobacterium longum* bei Ratten. Er konnte nach Verabreichung von lyophilisierten Kulturen des Probiotikums eine Reduzierung der mit einem karzinogenen biogenen Amin provozierten Darmtumoren messen. Auch eine direkte Hemmung der Tumorzellen, sowie die Unterdrückung des Wachstums von Bakterien, die die Entstehung von karzinogenen Stoffen begünstigen, werden beschrieben.

2.1.4.2. Wirkung der Probiotika auf den Wirtsorganismus

2.1.4.2.1. Verstärkung des unspezifischen Immunsystems

Das in seiner Gesamtheit als darmassoziiertes Immunsystem (gut associated lymphoid tissue, GALT) bezeichnete unspezifische Immunsystem des Verdauungstraktes besteht im Wesentlichen aus Darmlymphknoten, Sekundärfollikeln, Peyer-Plaques und einzelnen Lymphozyten (DOHMS 2004).

Ein entscheidender Effekt auf das angeborene Immunsystem scheint die Beeinflussung der Phagozytoseaktivität der Granulozyten und Makrophagen. Bei Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass die Gabe von verschiedenen Laktobazillen die Phagozytoseaktivität sowohl der Peritonealmakrophagen als auch der Makrophagen im Blut erhöht. In diesem Versuch wurden die Stämme *Lactobacillus casei* und *Lactobacillus bulgaricus* sowohl oral als auch

intraperitoneal verabreicht. Nach beiden Verabreichungsformen konnte bei den Mäusen anhand injizierter Kohlepartikel eine erhöhte Aktivität der Makrophagen gemessen werden (PERDIGON et al. 1986; PERDIGON et al. 1988). Ähnliche Ergebnisse liegen aus der Humanmedizin für die Phagozytoseaktivität von neutrophilen Granulozyten im Blut nach Applikation von *Lactobacillus rhamnosus* GG vor (SCHIFFRIN et al. 1995). Ebenso konnte die Phagozytose von Makrophagen durch eine Behandlung mit *Lactobacillus acidophilus* und *Bifidobacterium longum* gegenüber Salmonellen verbessert werden (HATCHER u. LAMBRECHT 1993). Auch Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* scheinen die Aktivität von neutrophilen Granulozyten zu beeinflussen. PETZOLDT u. MÜLLER konnten 1986 sogar in einem in vitro-Versuch feststellen, dass diese Fähigkeit der Modulation bei abgetöteten Hefen anscheinend noch besser ist als bei lebenden. Verantwortlich für diesen Effekt und einen von BURGALETA u. GOLDE 1977 nachgewiesenen koloniestimulierenden Effekt auf Granulozyten und Makrophagen, ist das Polysaccharid β -1,6-Glukan der Hefe (RIGGI u. DILUZIO 1961). MACHADO-CAETANO und Mitarbeiter (1986) vermuten auf dieser Grundlage auch einen Anstieg der Leukozytenzahl beim Menschen nach Aufnahme von *Saccharomyces boulardii*, und berichten außerdem von einem Anstieg der Erythrozyten sowie der Komplementbestandteile im Blut. Entgegen all diesen Ergebnissen konnte aber 1998 gezeigt werden, dass Laktobazillen nicht nur die Phagozytoseaktivität erhöhen, sondern auch unter bestimmten Umständen wie zum Beispiel bei einem Allergiegesehen senken können (PELTO et al. 1998). Es scheint eine Abhängigkeit der Wirksamkeit des Probiotikums von der immunologischen Gesamtlage des Organismus des Wirtes zu geben.

Einen sekundären Effekt auf das unspezifische Immunsystem, nämlich die Verlangsamung des programmierten Zelltodes (Apoptose) von Lymphozyten oder neutrophilen Granulozyten nach einer Salmonellen-Infektion, konnte von VALDEZ und Mitarbeitern 2001 gezeigt werden. Mäusemakrophagen unterlagen in diesem Versuch nach einer Inkubation mit *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* und *Streptococcus thermophilus* einem langsameren Zelltod nach einer *Salmonella typhimurium*-Infektion als ohne der Behandlung mit den Probiotika.

Des Weiteren scheinen Probiotika auch einen Einfluss auf die Zusammensetzung der unterschiedlichen Lymphozyten in den verschiedenen Lokalisationen des Wirtes zu haben. So konnte VAN BRIEL (2002) feststellen, dass sich die Anzahl der CD4+- Lymphozyten und CD8+ -Lymphozyten im Schweinedarm nach Futterzugabe von *Saccharomyces boulardii* oder *Bacillus cereus* verändert. Es wurden im Vergleich zu den Kontrolltieren eine höhere Anzahl CD4+-Lymphozyten im Jejunum gemessen und eine niedrigere Anzahl im Colon. Die Anzahl

der CD8+-Lymphozyten war im Jejunum niedriger und im Colon höher. Bereits 1999 konnte VIERA mit seinen Mitarbeitern zeigen, dass sich nach Gabe von *Lactobacillus casei* bei Ferkeln die Anzahl der CD3-Lymphozyten im Epithel und in der Lamina propria der Ileum-Schleimhaut im Vergleich zu der Kontrollgruppe verringert.

Bei Mäusen konnte ein höherer Anteil an B-Lymphozyten in den Peyer`schen Platten gefunden werden, wenn sie mit Laktobazillen-haltigem Joghurt gefüttert wurden, als bei der Fütterung mit Kuhmilch (DE SIMONE et al. 1988).

2.1.4.2.2. Förderung des spezifischen Immunsystems

Probiotika scheinen sowohl auf das angeborenen, unspezifische Immunsystem als auch das sich ständig anpassende spezifische Immunsystem des Wirtes eine positive Wirkung zu haben.

Eine der Hauptwirkungen scheint in der adaptiven humoralen Immunantwort die Beeinflussung der Produktion und Sekretion der Antikörper. Mehrere Untersuchungen konnten zeigen, dass speziell die Menge an produziertem IgA in einer Abhängigkeit zu den supplementierten Probiotika steht. IgA wird unter anderem auch in das Darmlumen sezerniert und spielt eine wichtige Rolle in der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen an der Schleimhautoberfläche (GALDEANO u. PERDIGON 2004).

So konnte durch die Gabe von *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* und *Bifidobacterium infantis* bei Mäusen eine signifikant höhere Menge an IgA gemessen werden, die als Antwort auf eine Cholera-toxin-Gabe produziert und sezerniert wurde (YASUI et al. 1992). TEJADA-SIMON und Mitarbeiter konnten diese Ergebnisse 1995 bestätigen, und hinzufügen, dass der Einfluss der Probiotika sich anscheinend auf die Antikörper der Immunglobulinklasse A beschränken und die Produktion von IgG nicht beeinflusst wird. Ebenfalls eine Erhöhung des IgA-Gehaltes im Darm konnte BUTS et al. (1990) bei Ratten nach einer Applikation von *Saccharomyces boulardii* messen. Neuere Untersuchungen von SCHAREK et al. (2004) konnten keine immunstimulierende Wirkung des Keimes *Enterococcus faecium* auf das Immunsystem von trächtigen Sauen und deren Ferkeln ermitteln. Sowohl im Kot, als auch im Blut konnten keine signifikanten Unterschiede an Gehalt der Antikörper IgA und IgG im Vergleich zu den Kontrolltieren gemessen werden.

Bei Säuglingen konnte eine erhöhte Konzentration IgA gegen Rotaviren nach einer Behandlung mit Bifidobakterien und LGG gemessen werden (MAJAMAA et al. 1995). Bei ähnlichen

Untersuchungen konnte zusätzlich zu den lokal erhöhten Konzentrationen an IgA, eine erhöhte Konzentration von IgA im Serum gemessen werden (KAILA et al. 1992).

Einige Laktobazillenstämme scheinen außerdem die Fähigkeit zu haben, im Wirtsorganismus über eine Stimulation der dendritischen Zellen und der Monozyten zur vermehrten IL-12 und IFN- γ -Produktion, die T-Helferzell-1-Antwort zu beeinflussen (HALLER et al. 2000; CHRISTENSEN et al. 2002). Ebenso lassen sich Einflüsse auf das Zytokinprofil nachweisen. Bei IL-10-knock-out Mäusen konnte das Probiotikagemisch VSL#3® die pathologisch erhöhten Tumornekrosefaktor- α - und Interferon- γ -Werte ausgleichen (MADSEN et al. 2001).

Probiotika können nach subkutaner Injektion sogar bei IL-10-knock-out Mäusen sowie im Kollagen-induziertem Arthritismodell der Maus Entzündungssymptome mindern und zusätzlich in der Milz die Produktion von TGF- β stimulieren (SHEIL et al. 2004).

2.1.4.2.3. Beeinflussung der Schleimhautpermeabilität

Über die Schleimhaut des Magendarmtraktes werden die Nährstoffe des Nahrungsbreis aufgenommen und dem Organismus zugeführt. Inwieweit diese Kapazität der Aufnahme durch Probiotika beeinflusst werden kann, wurde an vielen isolierten Epithelien wachsender Schweine untersucht (BREVES 2004). Auf zellulärer Ebene bewirken *Saccharomyces boulardii* und *Bacillus cereus* var. *toyoi* in vitro einen beschleunigten Trans-epithelialen-Transport von Glukose und Dipeptiden (BREVES et al. 2000). In vivo hat dieser erhöhte osmotische Druck auf das Darmepithel einen erhöhten Nettofluss von Wasser aus dem

Darmlumen zur Folge (DOHMS 2004), was eine mögliche Erklärung für die antidiarrhöische Wirkung einiger Probiotika ist.

2.1.4.2.4. Anabole Wirkung auf den Gesamtstoffwechsel

Bei Ratten wurde die leistungssteigernde Wirkung von probiotischen Keimen auf die Mastleistung untersucht.

Nach einer Applikation von *Bacillus cereus* var. *toyoi* konnten ähnliche anabolische Wirkungen auf den Glutathionstatus der Leber festgestellt werden, wie nach der Gabe von klassischen Leistungsförderern wie Carbadox, Flavomycin oder Kupfersulfat (SCHOLE et al. 1994). Diese Wirkung führen die Autoren auf die Abgabe anabol wirkender Substanzen durch das Probiotikum zurück, die für die eigene Sporulation notwendig sind.

2.1.4.2.5. Förderung der Schleimhautdifferenzierung

Ein weiterer Wirkungsmechanismus der Probiotika scheint der Einfluss auf die Entwicklung und Differenzierung der Darmmukosa. Hierzu gibt es jedoch unterschiedliche Ergebnisse. Die Dicke der Darmschleimhaut konnte bei Schweinen durch Gabe von *Saccharomyces boulardii* und *Bacillus cereus* var. *toyoi* insoweit beeinflusst werden, als dass sie im Jejunum zu- und im Colon abnahm. Des Weiteren konnte im Jejunum auch eine Verlängerung der Villi gemessen werden, was BAUM et al. (2002) als einen Einfluss der Probiotika auf die Apoptoserate deuteten. BUTS und Mitarbeiter (1986) konnten hingegen ebenfalls nach *Saccharomyces boulardii* Supplementierung beim Menschen keine signifikanten Veränderungen der Schleimhaut bezüglich der Zottenlänge, Kryptentiefe und Gewicht feststellen. Nach einer dreiwöchigen Einnahmen von SAB konnte beim Menschen lediglich eine tendenzielle Vergrößerung der Schleimhautoberfläche, vermutlich bedingt durch eine leichte Verlängerung der Zotten bei gleich bleibender Kryptentiefe, gemessen werden (JAHN et al. 1995). Auch eine höhere Aktivität der Bürstensaumenzym Laktase, α -Glukosidase und alkalischer Phosphatase im Epithel des Duodenums konnte bei diesem Versuch ermittelt werden.

THELEN konnte 1997 eine signifikante Zunahme der Zottenlänge im Duodenum von Schweinen feststellen, die 35 Tage lang mit *Bacillus cereus* var. *toyoi* gefüttert wurden.

Auch *Bacillus cereus* var. *caron* Sporen konnten bei abgesetzten Ferkeln scheinbar eine Vergrößerung der Schleimhautoberfläche durch eine Zunahme der Zotten und der Kryptentiefe bewirken (KLEIN u. SCHMIDTS 1997).

Keine Veränderungen der Dünndarmschleimhaut konnte hingegen NOUSIAINEN (1991) nach Verabreichung von Laktobazillen bei Ferkeln feststellen.

2.1.5. Als Probiotikum verwendete Mikroorganismen

2.1.5.1 *Enterococcus faecium*

Die Gattungen *Enterococcus*, *Lactococcus* und *Streptococcus* bilden die Familie der Streptokokken. Dem Genus *Enterococcus* gehören zur Zeit 19 Spezies an, und sind bei vielen Tierarten Bestandteil der Begleitflora des Darmes (syn. Faekalstreptokokken). So konnte beim Mensch 10^4 bis 10^5 KBE *E. faecium* pro Gramm Kot gefunden werden (NOBLE 1978; CHENOWETH und SCHABERG 1980).

Bei Nutztieren wie Schweinen, Schafen und Rindern ist die Prävalenz dieser Keime im Kot geringer (LECLERK et al. 1996). *E. faecium* konnte beim prä-ruminierenden Kälbern in der Darmflora gefunden werden, nicht jedoch beim erwachsenen Rind (DEVRIESE et al. 1992). Bei Schweinen ist *E. faecium* die dominierende Enterokokkenart im Kot (LECLERC et al. 1996).

Außerhalb des Darmes besitzen Enterokokken unter den nicht-sporulierenden Bakterien die höchste Tenazität gegen Hitze (AHMAD et al. 2002). Sie lassen sich daher auch teilweise in erhitzten Lebensmitteln nachweisen, in denen sie über die Bildung von biogenen Aminen auch ein pathogenes Potenzial für den Verbraucher darstellen.

Aufgrund dieser hohen Tenazität gegen Umwelteinflüsse und ihren ausgeprägten Fähigkeiten Resistenzen gegen Antibiotika zu bilden, und diese auf andere Enterokokkenstämme zu übertragen (QUEDNAU et al. 1999), stellen die Enterokokken in der Humanmedizin ein zunehmendes Problem dar. Sie verursachen als sog. „Hospitalkeime“ neben den Staphylokokken häufig antibiotikaresistente Wund- und Harnwegsinfektionen (WILHELM et al. 2002).

Die Enterokokken gehören zu den grampositiven Kokken und werden aufgrund ihrer Gruppenantigene in die Lancefield-Gruppe D eingeordnet. Somit lassen sie sich innerhalb dieser gram-positiven Kokken von anderen Gattungen wie z.B. den Staphylokokken eindeutig abgrenzen.

Zurzeit sind nach der geltenden Fassung der Futtermittelzusatz-Verordnung 14 verschiedenen Zubereitungen oder Mischungen von *E. faecium* mit anderen Keimen wie z.B. Laktobazillen zugelassen (Tab.3).

In den vorliegenden Untersuchungen wurde unter anderem das Probiotikum *Enterococcus faecium* SF68 (NCIMB 10415) unter dem Produktnamen Cylactin® von der Firma Roche in einer Konzentration von 10^9 KBE/kg Futter verwendet.

Nr. oder EG-Nr.	Bezeichnung	Chemische Bezeichnung Beschreibung	Tierart oder Tierkategorie	Höchst-Alter	Mindestgehalt	Höchstgehalt
					KBE/kg Alleinfuttermittel	
E 1705	<i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415	Zubereitung	Kälber	6 Monate	1×10^9	$6,6 \times 10^9$
			Masthühner		$0,3 \times 10^9$	$2,8 \times 10^9$
			Mastschweine		$0,35 \times 10^9$	1×10^9
			Sauen		$0,7 \times 10^9$	$1,25 \times 10^9$
			Ferkel		$0,35 \times 10^9$	1×10^9
E 1706	<i>Enterococcus faecium</i> DSM 7134 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> DSM 7133	Gemisch	Kälber	4 Monate	1×10^9	5×10^9
			Ferkel (abgesetzt)		$2,5 \times 10^9$	5×10^9
E 1707	<i>Enterococcus faecium</i> DSM 10663/NCIMB 10415	Zubereitung	Masthühner		1×10^9	1×10^9
			Kälber	6 Monate	1×10^9	1×10^{10}
			Ferkel		1×10^9	1×10^{10}
E 1708	<i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 11181	Zubereitung	Kälber	6 Monate	5×10^8	2×10^{10}
			Ferkel		5×10^8	2×10^{10}
10	<i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415	Zubereitung	Mastrinder		$0,25 \times 10^9$	$0,6 \times 10^9$
			Hunde		$4,5 \times 10^6$	2×10^9
			Katzen		5×10^6	8×10^9
11	<i>Enterococcus faecium</i> DSM 5464	Zubereitung	Ferkel	4 Monate	$0,5 \times 10^9$	1×10^9
			Masthühner		$0,5 \times 10^9$	1×10^9
			Kälber	4 Monate	$0,5 \times 10^9$	1×10^9
13	<i>Enterococcus faecium</i> DSM 10663/ NCIMB 10415	Zubereitung	Masttrut- hühner		1×10^7	1×10^9
			Hunde		1×10^9	1×10^{10}
15	<i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 11181	Zubereitung	Masthühner		$2,5 \times 10^8$	$1,5 \times 10^{10}$
17	<i>Lactobacillus casei</i> NCIMB 30096 <i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 30098	Gemisch	Kälber	6 Monate	1×10^9	3×10^9
18	<i>Enterococcus faecium</i> CECT 4515	Zubereitung	Kälber	6 Monate	1×10^9	1×10^9
			Masthühner		1×10^9	1×10^9
21	<i>Enterococcus faecium</i> DSM 3530	Zubereitung	Kälber	6 Monate	1×10^9	1×10^9
22	<i>Enterococcus faecium</i> DSM 7134	Zubereitung	Ferkel		$0,5 \times 10^9$	4×10^9
			Mastschweine		$0,2 \times 10^9$	1×10^9
			Sauen		$0,5 \times 10^9$	1×10^9
			Masthühner		$0,2 \times 10^9$	2×10^9

Tab.3: Liste der zugelassenen Zubereitungen/Gemische von *Enterococcus faecium* nach der Futtermittelverordnung (Stand 17.5.2006)

2.1.5.2. *Bacillus cereus* var. *toyoi*

B. cereus gehört wie alle *Bacillus*-Arten zu den gram-positiven aeroben Sporenbildnern, der ubiquitär in der Erde und im Staub vorkommt. Einige Stämme sind beweglich (HAHN u. VOGT

1994). *Bacillus cereus* ist ein Endotoxin-bildendes Bakterium, mit stark pathogenen Fähigkeiten. Das gebildete Toxin verursacht beim Menschen u.a. das Diarrhoe- und das emetische Syndrom, und kann, mit einem Lebensmittel aufgenommen, zu Vergiftungserscheinungen führen (FEHLHABER u. JANETSCHKE 1992). Auch Infektionserkrankungen wie Ophthalmitiden, Meningitiden, Endocarditiden und Pneumonien können Folgen einer *B. cereus*-Infektion sein. Bei Rindern und Schafen zählen Mastitiden, Aborte und Totgeburten zu den häufigsten Krankheitssymptomen (BISPING u. AMTSBERG 1988).

In probiotischen Präparaten werden nur Stämme von *B. cereus* eingesetzt, die keine Toxine bilden und apathogen sind (ROLLE u. MAYR 1993; GEDEK 1999).

Im Vergleich zu anderen probiotischen Keimen ist *B. cereus* aufgrund seiner Fähigkeit zur Sporulation unempfindlicher gegen äußere Einflüsse. Dies hat den Vorteil, dass er nach oraler Aufnahme die Magenpassage und den damit verbundenen pH-Wert-Abfall besser übersteht. In diesem widerstandsfähigen Dauerstadium ist die Verarbeitung, Lagerung und auch Pelletierung unter Erhitzung bis auf 60°C möglich (SEIFFERT u. GESSLER 1997).

In Europa wird die apathogene Subspezies *B. cereus* var. *toyoi* im Bereich der Tierernährung verwendet.

In mehreren Publikationen wird von einer signifikanten Steigerung der Tageszunahmen und Futtermittelverwertung bei Mastkälbern und Jungmastbullen berichtet (LETTNER 1987; ROTH u. KIRCHGESSNER 1988a; KLEIN 1995; WAGNER u. LANDFIELD 1999). Bei Versuchen zur Leistungssteigerung bei Ferkeln konnten mit dem identischen Präparat keine Veränderungen der Futtermittelverwertung oder der Tageszunahmen beobachtet werden (ROTH u. KIRCHGESSNER 1988b). TOSSENBERGER et al. (1994) konnten hingegen bei Ferkeln im Alter von drei bis fünf Wochen signifikant höhere Ferkelgewichte messen, wenn die Sauen ebenfalls mit dem Probiotikum gefüttert wurden.

Derzeit sind nach der geltenden Fassung der Futtermittelzusatz-Verordnung zwei verschiedenen Zubereitungen zugelassen (Tab.4). In der vorliegenden Arbeit wurde unter anderem der Keim *Bacillus cereus* var. *toyoi* (CNCM I-1012/NCIMB 40112) im Präparat Toyocerin® von Lohmann Animal Health als Futterzusatzstoff verwendet. Das Präparat enthält lebende *B. cereus*-Keime in versporter Form.

Nr. oder EG-Nr.	Bezeichnung	Chemische Bezeichnung Beschreibung	Tierart oder Tierkategorie	Höchst-Alter	Mindestgehalt	Höchstgehalt
					KBE/kg Alleinfuttermittel	
E 1701	<i>Bacillus cereus</i> var. toyoi CNCM I-1012/ NCIMB 40112	Zubereitung	Ferkel	2 Monate	1×10^9	1×10^9
			Ferkel	von 2 - 4 Monate	$0,5 \times 10^9$	1×10^9
			Mastschweine	von 4 Monate bis Schlachtung	$0,2 \times 10^9$	1×10^9
			Sauen	1 Woche vor dem Abferkeln bis zum Absetzen	$0,5 \times 10^9$	2×10^9
			Mastrinder		$0,2 \times 10^9$	$0,2 \times 10^9$
			Masthühner		$0,2 \times 10^9$	1×10^9
			Mastkaninchen		$0,1 \times 10^9$	5×10^9
1	<i>Bacillus cereus</i> var. toyoi NCIMB 40112/ CNCM I-1012	Zubereitung	Legehennen		$0,2 \times 10^9$	1×10^9
			Kälber	6 Monate	$0,5 \times 10^6$	1×10^9
			weibliche Zuchtkaninchen		$0,1 \times 10^6$	5×10^9

Tab.4: Liste der zugelassenen Zubereitungen von *Bacillus cereus* var. toyoi nach der Futtermittelverordnung (Stand 17.5.2006)

2.2. Der Darmtrakt des Schweines

Der Darm bildet die Resorptionsfläche für die mit dem Nahrungsbrei angelieferten Nährstoffe, und scheidet die nicht verwerteten Nahrungsbestandteile aus. (SCHWARZE 1962 ; SMOLLICH u. MICHEL 1992).

Im folgenden Kapitel soll eine kurze Übersicht über die Anatomie und Histologie des Schweinedarms gegeben werden, die keinen Anspruch auf Vollständigkeit erhebt. Detailinformationen sind in den Lehrbüchern der Anatomie und Histologie nachzulesen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Proben aus den Darmabschnitten Duodenum bis Colon entnommen und untersucht.

2.2.1. Anatomie

Beim ausgewachsenen Schwein setzt sich der Darmkanal aus einem etwa 16 bis 21m langen Mittel- und einem 3,5 bis 6m langen Enddarm zusammen. Der Mitteldarm besteht aus den Abschnitten Zwölffingerdarm (Duodenum), Leerdarm (Jejunum) und Hüftdarm (Ileum). Der Enddarm besteht aus den Teilstücken Blinddarm (Caecum), Grimmdarm (Colon) und Mastdarm (Rektum) (Abb.1). Der kranialste Teil des Dünndarms, das Duodenum, ist beim ausgewachsenem Schwein zwischen 0,7 bis 0,95m lang, beginnt am Magenausgang (Pylorus) als Pars cranialis duodeni und geht kaudal als Pars descendens duodeni in das Jejunum über. In das Duodenum münden sowohl der Ductus choledochus als auch weiter aboral der Ausführungsgang des Pankreas (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE 1987).

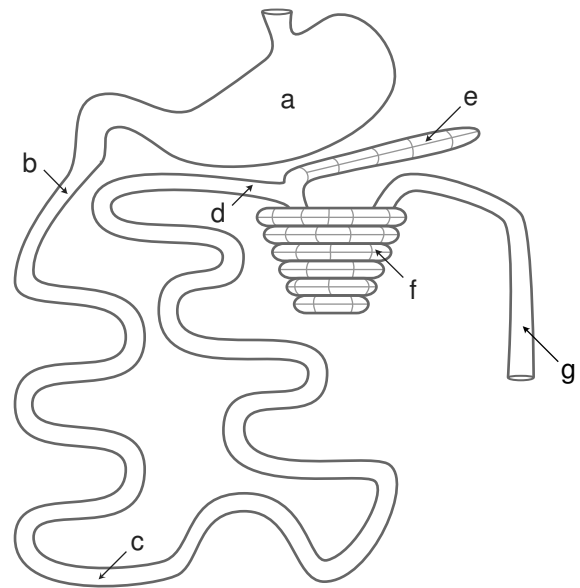


Abb.1: Schematische Darstellung der verschiedenen Darmabschnitte beim Schwein:

a: Magen, b: Duodenum, c: Jejunum,
d: Ileum, e: Caecum, f: Colon-Kegel,
g: Rectum

Der längste Darmabschnitt, das Jejunum, weist eine Länge von 14 bis 19m auf. Aufgehängt an einer breiten Gekröseplatte steht dieser stark gewundener Darmabschnitt mit fast allen Organen der Bauchhöhle in Kontakt (BERG 1988). Zusammen mit dem als eine Art „Kegel“ vorliegendem Colon ascendens nimmt der Leerdarm einen großen Teil der rechten caudalen Bauchhöhle ein (DYSE, SACK, WENSING 1991).

Äußerlich nicht vom Jejunum zu unterscheiden, beginnt an der Insertion der Plica ileocaecalis der Hüftdarm. Das Ileum ist bei adulten Tieren zwischen 0,7 und 1m lang und endet mit der Papilla ilealis spitzwinklig in den Dickdarm. Beim Schwein bildet eine verdoppelte Ringmuskelschicht den Musculus sphincter ilei am Ende des Ileums (SCHWARZE 1962; NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE 1987).

Der Blinddarm hat ein Fassungsvermögen von 1,5 bis 2,2 Liter und ist 30 bis 40cm lang.

Das Caecum weist beim Schwein die Besonderheit auf, dass es durch jeweils drei Bandstreifen (Taenia caeci) und Poschenreihen (Haustra) in Form eines „Standdarms“ (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE 1987) gehalten wird.

Das Colon geht aus dem breiteren Caecum hervor und wird unterteilt in die Teilabschnitte Colon ascendens, Colon transversum und Colon descendens. Der erste Teil des Grimmdarms, das Colon ascendens, stellt den längsten Teil des Dickdarms dar, und ist in vier zentripetal verlaufenden Spiralen (Gyri centripetales) um das eigene sehr kurze Gekröse gewickelt. Am Ende dieser Windungen bildet das Colon ascendens einen stumpfen Kegel um dann in drei zentrifugalen Windungen (Gyri centrifugales) im Inneren dieses Colon-„Kegels“ zu verschwinden (SCHWARZE 1962). An den außenliegenden Gyri centripetales befinden sich zwei Poschenreihen und zwei Bandstreifen die sich in den Gyri centrifugales langsam verlieren (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE 1987). Der zweite Teil des Grimmdarms ist das Colon transversum, das sich nach den letzten inneren Windungen und einer Schleife, die cranial bis an den Magen reicht, an das Colon ascendens anschließt.

Den absteigenden Teil des Colons ab Höhe der Arteria mesenterica cranialis bezeichnet man als Colon descendens, das in das Rektum in Form einer deutlichen Ampulle (Ampulla recti) übergeht (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE 1987).

2.2.2. Histologie

2.2.2.1. Histologischer Aufbau der Darmwand

Der Grundaufbau der Darmwand ist in allen Abschnitten identisch und entspricht dem allgemeinen Bauprinzip des Tubulus alimentarius. Die innerste Schicht bildet die Schleimhaut (Tunica mucosa). Sie kleidet das Darmlumen aus.

Unter ihr liegt die lockere Tela submucosa, die die Schleimhaut von der Muskelhaut (Tunica muscularis) abgrenzt und größere Lymph- und Blutgefäße sowie den submucösen Nervenplexus (Meissnersche Plexus) einschließt. Diese „Verschiebeschicht“ ist für die Funktion der Darmperistaltik sowie die Längendehnung des Darms notwendig. Im Duodenum findet man in der Tela submucosa zusätzlich die Submucosa-Drüsen (Brunner'sche Drüsen). Die Tunica muscularis besteht aus glatten Muskelfasern die in der inneren Schicht zirkulär (Stratum circulare) und in der äußeren Schicht longitudinal (Stratum longitudinale) verlaufen. Zwischen diesen beiden Muskelschichten liegt im elastischen Stratum intermusculare der Auerbach-Plexus (Plexus myentericus).

Dieses Geflecht aus Nerven und Ganglien innerviert die Tunica muscularis und sorgt somit für den mechanischen Transport der Ingesta durch den Verdauungstrakt.

Die äußere Wand des Darms bildet die dünne, elastische Serosa (Tunica serosa), die zur Tunica muscularis nochmals durch eine dünne Tela subserosa getrennt ist (SMOLLICH, MICHEL 1992).

Die Tunica mucosa setzt sich aus dem, die gesamte Schleimhautoberfläche bedeckenden, einschichtig hochprismatischem Epithel (Epithelium mucosae), sowie der darauf folgenden bindegewebigen Lamina propria mucosae und der äußersten Lamina muscularis mucosae zusammen (SMOLLICH, MICHEL 1992).

Die Lamina propria mucosae enthält Blutgefäße, Nervenfasern, Lymphkapillaren und T- und B-Lymphozyten (DELLMANN, EURELL 1998). Die Lamina muscularis mucosae mit ihren drei scherenartig gegenläufig verlaufenden Muskelzügen erlaubt der Schleimhaut unter Beteiligung der Tela submucosa eine unabhängige Bewegung.

Die Schleimhaut bildet durch Einfaltungen die sog. Krypten oder Darmdrüsen. Durch diese Faltung der Darmoberfläche wird eine Oberflächenvergrößerung erreicht, die durch Ausstülpungen der Lamina propria mucosae im Bereich des Dünndarms (Zotten) noch einmal erhöht wird. Die Länge und die Form der Zotten differiert in den unterschiedlichen Darmabschnitten stark. Beim Schwein werden die Zotten im Duodenum als mittellang und dick mit abgerundeter Spitze, im Jejunum als lang und dünn mit abgerundeter Spitze und im Ileum als kurz, dünn und oben spitz zulaufend beschrieben (MOUWEN 1971, REITER 2006).

Neben den unterschiedlichen Längen in den verschiedenen Darmabschnitten hängt die Länge der Zotten und die Tiefe der Krypten zusätzlich vom Alter und scheinbar von der Fütterung der Tiere ab (PLUSKE et al. 1997). So konnten beim Saugferkel in allen Dünndarmabschnitten nach dem Absetzen der Milch eine Verkürzung der Zotten auf die Hälfte der ursprünglichen Länge und eine Verlängerung der Krypten gemessen werden (HAMPSON 1986).

2.2.2.2. Zelltypen der Darmschleimhaut

Die Zelltypen der Darmschleimhaut gehen aus Stammzellen hervor, die sich im Bereich des Kryptengrundes befinden und dort u.a. bei der Maus nachgewiesen werden konnten (PRITCHARD u. WATSON 1996). Neben den üblichen Zelltypen wie Muskelzellen, Nervenzellen, Fettzellen usw. befinden sich in der Darmschleimhaut hochdifferenzierte Zelllinien auf die im Folgenden kurz eingegangen werden soll.

Die Zelltypen des Epithels unterscheiden sich in ihrer Form und Funktion zum Teil erheblich. Enterozyten und Becherzellen bilden den Hauptanteil der Zellen der Lamina epithelialis. Enterozyten besitzen auf ihrem luminalen Zellpol einen dichten Besatz an Mikrovilli und werden aufgrund dieses Saumes auch Saumzellen genannt (SMOLLICH, MICHEL 1992). Becherzellen produzieren den aus Glykoproteinen bestehenden Gleitfilm der Darmschleimhaut. Sie lassen sich von den Saumzellen im gefüllten Stadium leicht aufgrund ihrer Form unterscheiden. Haben sie ihre Sekretgranula allerdings freigesetzt, ist eine Differenzierung lediglich aufgrund der unterschiedlichen Lage und Form des Zellkerns möglich (SMOLLICH, MICHEL 1992).

Ein weiterer Zelltyp des Epithels sind die sog. M-Zellen. Sie befinden sich als einzelne Epithelzellen oder als Zellgruppen im Bereich der Dome (Schleimhauerhabenheiten) über den Noduli lymphatici aggregati (Peyer'sche Plaques) des distalen Jejunums und Ileums. Ihre Aufgabe ist die Aufnahme und Durchleitung luminaler Antigene zu den Zellen des darmassoziierten lymphoretikulären spezifischen Immunsystems (SMOLLICH, MICHEL 1992; GEBERT 1994).

Im Bereich des Kryptengrundes befinden sich Drüsenzellen, die von den Becherzellen aufgrund ihres großen Gehaltes an azidophilen Sekretgranula abzugrenzen sind. Diese sog. Paneth'sche Zellen produzieren u.a. bakterizide Lysozyme und Defensine (HILGENBRINK 1987; SCHWARZBACHER 2004).

Mit einem Anteil von 1-3% an den Zellen der Darmschleimhaut bilden die Zellen des enteroendokrinen Systems den kleinsten Anteil. Die von ihnen produzierten und sezernierten Hormone (Gastrin, Somatostatin, Serotonin usw.) sind an der Regulation und der Sekretion des gesamten Magen-Darm-Traktes beteiligt. Diese endokrinen Zellen kommen als Bestandteil des Epithels mit oder ohne Kontakt zum Darmlumen in der Propria im gesamten Magen-Darmtrakt vor (LEONHARDT 1990; SMOLLICH, MICHEL 1992; SCHWARZBACHER 2004).

2.3. Zellassoziierte Enzyme der Darmschleimhaut

2.3.1. Intestinale Alkalische Phosphatase

Unter dem Begriff „Alkalische Phosphatase“ werden mehrere Isoenzyme mit einem Wirkungsoptimum im alkalischen Bereich (pH=10) zusammengefasst, die durch hydrolytische Spaltung von organischen Phosphateestern anorganische Phosphate freisetzen (SCHENCK u. KOLB 1990; HÄUSSINGER u. GEROK 1995).

Die Isoenzyme der Alkalischen Phosphatase werden in den verschiedenen Geweben, wie Leber (Gallengangsepithelzellen, Hepatozyten), Knochen, Plazenta, Nierenrinde und der Darmschleimhaut gebildet (BARRETT et al. 1976; GOLDSTON et al. 1981; HALL 1985).

Im Darm spielt die Alkalische Phosphatase (AP), die in vielen resorptiv aktiven Geweben vorkommt, als eines der sog. Bürstensaumenzyme der Enterozyten bzw. als lymphatisches Enzym, das bei der Fettverdauung auftritt eine sehr wichtige Rolle. Bei Rindern findet sich in den Schleimhäuten der Verdauungsorgane Haube, Pansen, Duodenum und Ileum ein besonders hoher Anteil an Intestinaler Alkalischer Phosphatase, während beim Pferd das Colon, und beim Schwein das Jejunum einen besonders hohen Anteil dieses Enzyms aufweist (WIESNER u. RIBBECK 2000).

Untersuchungen an Schweinen konnten zeigen, dass im Jejunum physiologischerweise höhere Konzentrationen an AP vorhanden sind, als im Duodenum oder im Ileum (FAN et al. 1999).

In der gleichen Untersuchung konnte FAN aber auch nachweisen, dass die maximale spezifische Aktivität der AP entlang der longitudinalen Achse des Schweinedarms von proximal nach distal abnimmt. Der Autor vermutet aufgrund dieser unterschiedlichen Ergebnisse eine Expression von verschiedenen Isoenzymen der intestinalen alkalischen Phosphatase entlang des Schweinedarms. Ebenso konnte gezeigt werden, dass es postnatal Veränderungen in der Aktivität der AP im Darm von Ferkeln gibt. Während die höchste Aktivität in dem Zeitraum um das Absetzen von der Muttersau gemessen werden konnten, ließen sich bei adulten Tieren die niedrigsten Werte und bei den Neugeborenen mittlere Aktivitätswerte nachweisen (FAN et al. 2002).

Einflüsse der Ernährung auf die Expression der intestinalen alkalischen Phosphatase im Schweinedarm konnten von GU und Mitarbeitern (2004) nachgewiesen werden. Sie konnten zeigen, dass ein veränderter Roh-Protein-Gehalt in der Ration nicht nur die Epithel-Zell-Grösse und die Krypten-Tiefe der Dünndarmschleimhaut beeinflusst, sondern auch Einfluss auf die Konzentration an Alkalischer und Saurer Phosphatase im Epithel hat.

Nicht nur bei Schweinen, sondern auch bei anderen Tierarten konnten Ernährungsbedingte Veränderungen der Intestinalen AP (IAP) festgestellt werden.

Bei Atlantischen Lachsen konnte nach einer, durch Sojabohnen verursachten, Entzündung der Dünndarmschleimhaut eine deutliche Abnahme der Sauren und Alkalischen Phosphatase im distalen Dünndarm nachgewiesen werden (BAKKE-MCKELLEP et al. (2000).

Bei Ratten ist bekannt, dass die Aktivität der IAP im gesunden Dünndarm von proximal nach distal abnimmt (SHIDOJI u. KIM 2004). Sie konnten bei Ratten mittels PCR drei verschiedene

Isoenzyme der IAP mit unterschiedlichen Verteilungsmustern entlang der longitudinalen Achse des Dünndarms nachweisen.

Ebenfalls bei Ratten konnte mittels einer Lactose-Diät die Aktivität der Intestinalen Alkalischen Phosphatase im Jejunum gegenüber einer Kontrollgruppe signifikant erhöht werden (SOGABE et al. 2004).

In einer Studie mit IAP-knock-out-Mäusen konnten, nach der Fütterung mit einem Grundfutter mit hohem Fett-Anteil, verschiedene Beobachtungen bei den „knock-out“-Mäusen im Vergleich zu Tieren einer Kontrollgruppe mit normalem IAP-Status gemacht werden. Bei den Tieren ohne IAP konnten sowohl höhere Tageszunahmen als auch ein beschleunigter Transport von Fetttropfen durch das Darmepithel gemessen werden. Auch der Serum-Triglycerid-Spiegel im Blut der Knock-out-Mäuse war deutlich höher als bei den Tieren der Kontrollgruppe (NARISAWA et al. 2003). Diese Ergebnisse lassen den Autor vermuten, dass die Intestinale Alkalische Phosphatase also scheinbar eine limitierende Funktion in der Fett-Absorption bei Mäusen wahrnimmt.

Bei Broilern konnten hingegen bei der Untersuchung der IAP in Abhängigkeit von der täglichen Gewichtszunahme festgestellt werden, dass Tiere mit einer geringeren Tageszunahme eine höhere Aktivität an IAP im Duodenum und Jejunum vorweisen konnten als vergleichbar schneller wachsende Tiere (LENHARDT u. MOZES 2003).

2.3.2. Saure Phosphatase

Die Saure Phosphatase (SP) ist ein Enzym, dass zu der Gruppe der Sauren Hydrolasen, deren pH-Optimum im schwach sauren Bereich bei 5,0 liegt, gehört. Die SP wurde bereits 1935 durch KUTSCHER u. WOLBERGS beschreiben.

Hauptvorkommen dieser Hydrolasen sind die Lysosomen, die in den meisten eukaryontischen Zellen vorkommen. Z.B. ist die lysosomale Saure Phosphatase (LAP) für den Abbau zelleigener und zellfremder Makromoleküle zuständig. Ein vermehrtes Auftreten dieses Enzyms weist also auf degenerative Prozesse u.a. in Verbindung mit dem physiologischen Zelltod hin (WILLE 2001).

Über Protonenpumpen der lysosomalen Membranen wird der, für die Funktion der Enzyme notwendige, saure pH-Wert im Lysosomenlumen aufrechterhalten. Die von den Makromolekülen übrig gebliebenen monomeren Abbauprodukte verlassen die Lysosome wieder über spezifische Transportkanäle.

Bereits 1967 konnten BJÖRKMAN u. SIBALIN am Elektronenmikroskop SP-positive Zellbestandteile im Darm von Saugferkeln feststellen.

GU et al. (2004) konnten, wie bereits beschrieben, auch für die lysosomale Saure Phosphatase zeigen, dass eine Roh-Proteinreiche Fütterung bei Schweinen Veränderungen in der Aktivität des Enzyms in den Darmschleimhaut zur Folge hat.

Untersuchungen an Hühnern zeigen, dass durch ein provoziertes Fasten der Hühner die Expression der LAP in der Darmschleimhaut gesteigert werden konnte (YAMAUCHI u. TARACHAI 2000).

Epithelzellen der Darmschleimhaut haben also vermutlich die Fähigkeit ihre Enzymstruktur der Lysosome den jeweiligen Nährstoffsituationen des Darmlumens anzupassen.

In der Humanmedizin werden erhöhte oder erniedrigte Werte der Sauren Phosphatase in den entsprechenden Zellen als Teil eines Krankheitsgeschehen betrachtet und sind somit häufig Teil eines pathophysiologischen Prozesses (BULL et al. 2001).

2.4. Endokrine Zellen des Darmtraktes

BAYLISS u. STARLING (1902) konnten mit ihrer Untersuchung über den Sekretineffekt als erste die Definition eines Hormons beschreiben, und gleichzeitig zeigen, dass der Magen-Darm-Trakt ein endokrines Organ ist.

Heute bezeichnet man als gastrointestinale- oder Enterohormone eine Gruppe von Proteinen die in den Zellen der Anhangsorganen (Mund- und Bauchspeicheldrüsen und Gallenwege) oder im Magen-Darm-Trakt selbst gebildet werden (KURUMAYA et al. 1989; MILLER et al. 1978). Die Sekretion dieser Hormone erfolgt unter der Aktivität des vegetativen Nervensystems und steht im engen Zusammenhang mit der Verdauungsfunktion. Produziert werden die Enterohormone in den verschiedenen Zelltypen (Endocrinocytii gastrointestinales) des Gastro-entero-pancreatischen-endokrinen Systems (GEP) (FUJITA 1976).

Die Endokrinozyten weisen in ihrer Anzahl und Lokalisation zelltyp-, segment- und artspezifische Unterschiede auf (WEYRAUCH et al. 1987; FUJITA 1988; DOBBINS u. AUSTIN 1991; Tab.5)

Zelltyp	Lokalisation				Dickdarm	Sekret
	Magen		Dünndarm			
	Fundus	Pylorus	proximal	distal		
D	+	+	++	+	+	Somatostatin
D ₁	+	+	+	+	+	?
EC	+	+	++	+	+	Serotonin
ECL	++	-	-	-	-	Histamin
G	-	++	+	-	-	Gastrin
M oder I	-	-	++	+	-	CCK-PZ
K	-	-	+	+	-	GIP
L	-	-	+	+	+	GLI
M ₀	-	-	+	+	-	Motilin
N	-	-	-	+	-	Neurotensin
PP	-	(+)	(+)	-	-	PP
S	-	-	+	+	-	Sekretin

Tab.5: Gastrointestinale Endokrinozyten-Typen mit ihrer Lokalisation und ihren produzierten Sekreten (FUJITA 1988); (+) bei menschlichen Feten und Neugeborenen

Insgesamt konnten im Gastrointestinaltrakt mehr als 16 verschiedene endokrine Zelltypen isoliert werden (HAKANSON et al.1978; ANLAUF et al. 2003).Heute geht man allerdings von neun endokrinen Standardzellen (D-, EC-, ECL-, G-, I-, L- und S-Zellen) aus, die bei allen daraufhin untersuchten Tierarten und beim Menschen im Magen-Darm-Trakt nachgewiesen werden konnten, und sich nur gering speziesspezifisch unterscheiden. Sie gehören als Peptidhormonproduzenten der APUD-Reihe (Amine precursor uptake and decarboxylation), mit der gemeinsamen Fähigkeit Amine bzw. deren Vorstufen aufzunehmen und zu decarboxylieren, an (PEARSE 1976).

Die Endokrinozyten sind entwicklungs geschichtlich vermutlich entodermalen Ursprungs, die unter neuralen Einflüssen ihre endgültige Differenzierung erfahren (FUJITA 1988).

Die Zellen haben meist eine pyramidenartige Form und sind vorzugsweise im Drüsenepithel der Lamina propria mucosae zu finden. Ebenso sind im Schleimhautepithel vereinzelt endokrine Zellen lokalisiert. Die gastrointestinalen Endokrinozyten liegen meist mit einer breiten Basis der Basallamina an, und erreichen mit ihrem apikalen Zellpol häufig die lumenseitige Oberfläche der Drüse. Man spricht bei diesem Zelltyp von einer „open type“-Zelle. Demgegenüber stehen die Hormon-produzierenden Zellen des „closed type“-Types, die mit ihrem apikalen Zellpol das Drüsenlumen nicht erreichen (GRUBE 1986; FUJITA 1988).

Morphologisch sind die Endokrinozyten außerdem durch einen großen, meist runden Zellkern im basalen Zelldrittel, sowie die häufig in der Nähe der basalen Membran gelegenen Sekretgranula, gekennzeichnet. (Abb.2)

Regulatorisch greifen die Endokrinozyten vermutlich über fünf Wege in die Sekretion und Verdauung und den gesamten Stoffwechsel des Organismus ein (Abb.2):

- endokrin: Sekretion in Körperflüssigkeit (Blut)
- neurokryn: Wirkung auf benachbarte Neuronen
- parakryn: Wirkung der Sekrete auf benachbarte Drüsen- oder Saum-Zellen, durch Sekretion in den Intrazellularraum
- exokryn: Sekretfreisetzung in das Darmlumen
- autokryn: Sekretion in den Zellzwischenraum mit Wirkung auf die eigene Zelle

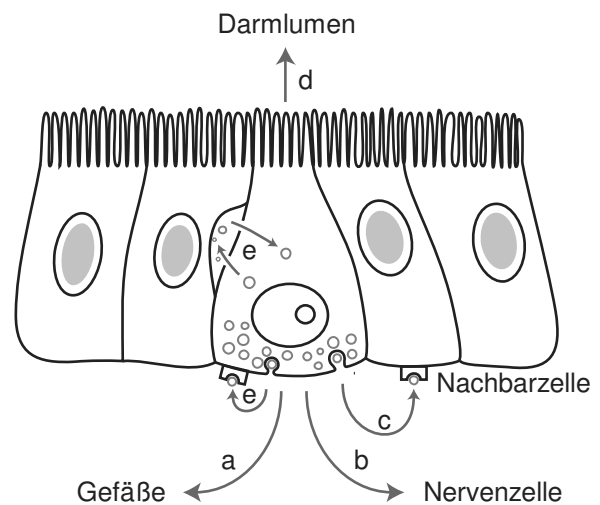


Abb.2: Schematische Darstellung eines „open type“ Endokrinozyten mit den Übertragungsmodi:
a: endokryn, b: neurokryn, c: parakryn,
d: exokryn, e: autokryn

Intestinale Endokrinozyten unterliegen bei ihrer Produktion von Hormonen scheinbar internen und externen Signalwirkungen (NICHOLL et al. 1985). Neben den humoral und nerval vermittelten Informationen aus dem eigenen Organismus, nehmen sie ebenso Informationen und Einflüsse aus dem Darmlumen und des Darminhaltes auf, haben also neben ihrer regulativen Aufgabe gleichzeitig eine Rezeptorfunktion.

In der vorliegenden Arbeit beschränken sich die Untersuchungen auf die Gastrin-, Somatostatin- und Serotonin-produzierenden Zellen des Darmes (Tab.6).

Name	Entdeckung	Chemie	Relative Molekülmasse	physiologische Haupt-Wirkung
Gastrin	Edkins (1905)	17 Aminosäuren	2100	Stimulation der Säuresekretion
Serotonin	Rapport (1947)	1 Aminosäure (Tryptophan)	176	Stimulation der Peristaltik
Somatostatin	Schally und Guillemin (1977)	14 Aminosäuren	1700	Hemmung der endokrinen und exokrinen Sekretion des Magen-Darm-Traktes

Tab.6: Gastrointestinale Enzyme mit ihren Haupt-Wirkungen im Magen-Darm-Trakt

Serotonin wird in den EC-Zellen des APUD-Systems gebildet und wurde 1947 von RAPPORT das erste Mal aus Rinderserum isoliert. Es wird bei Säugetieren aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan gebildet

Im Verdauungstrakt erfüllt das Serotonin zwei wichtige Funktionen. Hauptaufgabe ist die Vermittlung der peristaltischen Bewegungen der Darmmuskulatur. Dies geschieht über die Bindung des sezernierten Serotonins an Rezeptoren der Neuronen, die die ringförmige Muskulatur des Darmes in aufsteigender Richtung kontrahieren und in absteigender Richtung relaxieren lassen (GOYAL u. HIRANO 1996; PAN u. GERSHON 2000). Eine weitere wichtige Funktion des Serotonins im Duodenum ist der Einfluss auf die Chloridionen-Sekretion. Nach mechanischer Stimulation der Mucosa schütten die Endokrinozyten Serotonin aus. Das Hormon bindet an Rezeptoren der Neuronen des submucosalen Plexus und regt über die Sekretomotorneuronen die Epithelzellen zur Chloridsekretion ins Darmlumen an. Den Chloridionen folgen Natriumionen, und aufgrund dieser Salzsekretion kommt es zu einem Wassereinstrom in das Darmlumen (COOKE et al. 1997; COOKE 2000).

Das Hormon Somatostatin wurde von SCHALLY und GUILLEMIN 1977 erstmalig beschrieben. Das aus 14 Aminosäuren bestehende Peptid hemmt unter anderem die Sekretion von Magensäure, Gastrin, Pepsin sowie die Sekretion von Glucagon und Insulin aus dem Pankreas und wirkt somit als „Verdauungsbremse“.

Es unterliegt in seiner Wirkung der hemmenden Wirkung des Nervus vagus. Im Magen wird die Sekretion von Somatostatin durch den Nahrungskontakt gehemmt und durch Anwesenheit von HCO_3^- und die mechanische Dehnung gesteigert. Im Darm erfolgt, im Gegensatz zum Magen, durch den Nahrungskontakt der Endokrinozyten eine Stimulation der Sekretion von Somatostatin (GROSSMANN 1972).

Sehr viel früher wurde das Gastrin durch EDKINS (1905) entdeckt. Es besteht aus 17 Aminosäureresten und ist überwiegend im Antrumbereich des Magens und im Duodenum lokalisiert.

Es kann je nach Produktionsort und Sulfatierung des Tyrosylrestes in sechs verschiedenen Formen vorkommen. (WIESNER u. RIBBECK 2000)

Die Sekretion des Gastrins aus den Endokrinozyten wird durch die Dehnung der Magenwand, Reizung des Nervus vagus sowie die Aufnahme von vermehrt eiweißhaltigen Futtermitteln oder kurzkettigen Fettsäuren stimuliert (MERITT u. KOLTS 1983). Beim Wiederkäuer kann auch

eine Labmagendrehung oder ein alkalischer Magen-pH die Sekretion von Gastrin stimulieren. Hemmend auf die Sekretion wirken hingegen die Hormone Somatostatin und Sekretin.

Die Hauptwirkung des Gastrin ist die Steigerung der Magensaft-Sekretion und der Motilität des Magen-Darm-Traktes. Im Gegensatz zum Somatostatin fördert Gastrin also die Verdauung der Nährstoffe und den Transport der Ingesta (Tab.7).

Hormon			Effekt	
Gastrin	Sekretin	Serotonin		
+	(-)		HCL	Magensekretion
+	(+)		Pepsin	
(+)	+		HCO ₃ ⁻	Pankreassekretion
(+)			Enzyme (Amylase, Lipase)	
(+)	+	(+)	Wasser	
	(+)		Insulin	
(+)	(+)			Darmsekretion
(+)	(+)		Produktion	Galle
(+)			Motorik	
+	(-)	+	Darm	Motilität
	(-)	+	Magen	
(-)		+	Blutdruck	Blutkreislauf
+	(+)		Mucosadurchblutung	
(+)				Calcitoninsekretion
	(+)			Lipolyse

Tab.7: Einzelleffekte der Gastrointestinalen Hormone. + Stimulation, (+) geringe Stimulation, - Hemmung, (-) geringe Hemmung (VAGNE 1970; DEMLING 1976; DOCKRAY 1989 u. andere)

Somatostatinzellen treten wie auch die Gastrinzellen bei Vögeln und Säugetieren in Form des „open types“ und „closed types“ auf. Bei juvenilen Enten wurden im Bereich des distalen Endes des Muskelmagens 1200 Gastrinzellen pro mm² und ca. 900 pro mm² Somatostatinzellen gefunden. Bei adulten Enten ist das Verhältnis von Gastrin- zu Somatostatinzellen mit 1000 zu 700 pro mm² deutlich niedriger. Bei Ziegen konnte in der Pylorusregion, einem dem Antrum der Vögel entsprechenden Bereich, wesentlich weniger positive Zellen beider Hormone gefunden werden (Gastrin: Somatostatin → 325:120 pro mm²). Im Duodenum der Vögel sinkt die Zahl der Gastrin- und Somatostatin-Endokrinozyten rapide ab und markiert den Übergang vom Muskelmagen ins Duodenum.

(WEYRAUCH et al. 1987; WEYRAUCH et al. 1989).