

# **Einfluss von Pro-, Prä- und Synbiotika auf das Immunsystem der Ratte und des Menschen**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
der Universität Karlsruhe (TH)

genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Biologin

Monika Roller

aus Calw

Dekan: Prof. Dr. M. Kappes

Referent: Prof. Dr. G. Rechkemmer

Korreferent: Prof. Dr. R. Paulsen

Tag der mündlichen Prüfung: 13.02.2004

# VERÖFFENTLICHUNGEN

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde an folgenden Stellen veröffentlicht:

## **Artikel:**

Roller M, Rechkemmer G, Watzl B (2004): Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* modulates intestinal immune functions in rats. J. Nutr 1: 153-156

## **Vorträge:**

Roller M, Caderni G, Rechkemmer G, Watzl B: Langzeit-Behandlung mit Inulin moduliert das Immunsystem der Ratte. Jährlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung, Jena, 14.03.2002

Watzl B, Roller M, Caderni G, Rechkemmer G: Long-term treatment with a prebiotic modulates the gut-associated immune system of azoxymethane-treated F344 rats. Minisymposium „Immune and inflammatory dysfunction, nutritional intervention“, Experimental Biology, New Orleans, 20.04.2002

## **Posterpräsentationen:**

Roller M, Caderni G, Rechkemmer G, Watzl B: Stimulation of the gut-associated immune system in azoxymethane-treated F344 rats by a prebiotic. Falk Symposium No. 128 „Exogenous factors in colon carcinogenesis“, Würzburg, 02. – 03.05.2002

Roller M, Caderni G, Rechkemmer G, Watzl B: Long-term treatment with a prebiotic modulates the gut-associated immune system of azoxymethane-treated F344 rats. Symposium „Functional Food: Safety Aspects“, Deutsche Forschungsgemeinschaft; Karlsruhe, 05. – 07.05.2002

Roller M, Femia AP, Van Loo J, Caderni G, Rechkemmer G, Watzl B: Prebiotic treatment modulates the gut-associated immune system and decreases AOM-induced colon carcinogenesis in F344 rats. Second Annual International Conference on Frontiers in Cancer Prevention Research, American Association for Cancer Research, Phoenix, 26. – 30.10.2003

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2 EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Das Immunsystem</b>	<b>2</b>
2.1.1 Organe des Immunsystems	2
2.1.1.1 Das darmassoziierte lymphatische Gewebe	2
2.1.1.2 Milz	3
2.1.2 Zellen des Immunsystems	3
2.1.2.1 Natürliche Killerzellen	3
2.1.2.2 T-Lymphozyten	5
2.1.2.3 Phagozyten	6
2.1.3 Interzelluläre Mediatoren des Immunsystems	7
2.1.3.1 Interleukin-2	7
2.1.3.2 Interleukin-10	8
2.1.3.3 Interleukin-12	8
2.1.3.4 Tumornekrosefaktor- $\alpha$	9
2.1.3.5 Interferon- $\gamma$	10
2.1.3.6 Transforming Growth Factor- $\beta$	10
2.1.3.7 Prostaglandin E <sub>2</sub>	11
2.1.3.8 Sekretorisches Immunglobulin A	12
<b>2.2 Darmkrebs</b>	<b>13</b>
<b>2.3 Probiotika</b>	<b>14</b>
2.3.1 Auswirkungen von Probiotika auf die Gesundheit	17
2.3.1.1 Einfluss von Probiotika auf das Immunsystem	17
2.3.1.2 Einfluss von Probiotika auf die Karzinogenese	18
<b>2.4 Präbiotika</b>	<b>20</b>
2.4.1 Auswirkungen von Präbiotika auf die Gesundheit	21
2.4.1.1 Einfluss von Präbiotika auf die Darmflora	22
2.4.1.2 Einfluss von Präbiotika auf das Immunsystem	23
2.4.1.3 Einfluss von Präbiotika auf die Karzinogenese	24
<b>2.5 Synbiotika</b>	<b>25</b>
2.5.1 Auswirkungen von Synbiotika auf die Gesundheit	25
2.5.1.1 Einfluss von Synbiotika auf das Immunsystem	25
2.5.1.2 Einfluss von Synbiotika auf die Karzinogenese	25
<b>2.6 Zielsetzung</b>	<b>26</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Material</b>	<b>28</b>
3.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	28
3.1.2 Lösungen	29
<b>3.2 Versuchstiere</b>	<b>31</b>

<b>3.3 Geräte</b>	<b>31</b>
<b>3.4. Versuchsdesign der Tierstudie 1</b>	<b>31</b>
3.4.1 Versuchsdiät	32
3.4.2 Präparation der Organe	33
3.4.3 Isolierung der mononukleären Zellen des Blutes	33
3.4.4 Isolierung der Immunzellen der Milz	33
3.4.5 Isolierung der Immunzellen der mesenterialen Lymphknoten	34
3.4.6 Isolierung der Immunzellen der Peyerschen Plaques	34
3.4.7 Lymphozytensubpopulationen	34
3.4.8 Messung der Phagozytoseaktivität	35
3.4.8.1 Opsonisierung der E.coli	35
3.4.8.2 Versuchsansatz zur Messung der Phagozytoseaktivität	35
3.4.9 Messung des oxidativen Burst	36
3.4.10 Messung der Aktivität der natürlichen Killerzellen	36
3.4.10.1 Kultivierung der Zielzellen YAC-1	36
3.4.10.2 Markierung der Zielzellen YAC-1	37
3.4.10.3 Versuchsansatz zur Messung der Aktivität der natürlichen Killerzellen	37
3.4.10.4 Kontrollansatz mit Pentoxifyllin	38
3.4.11 Messung der Proliferation	38
3.4.12 Messung der Sekretion von Interleukin-10	39
3.4.13 Messung der Sekretion von Interferon- $\gamma$	39
3.4.14 Messung der SIgA-Konzentration im Darminhalt	39
3.4.14.1 Probenaufbereitung des Ileum-Inhalts	39
3.4.14.2 Probenaufbereitung des Caecum-Inhalts	40
3.4.14.3 SIgA ELISA	40
<b>3.5 Versuchsdesign der Tierstudie 2 A</b>	<b>40</b>
3.5.1 Versuchsdiät	40
3.5.2 Präparation der Organe	41
3.5.3 Isolierung der Immunzellen der Organe	41
3.5.4 Lymphozytensubpopulationen	41
3.5.5 Messung der Phagozytoseaktivität	41
3.5.6 Messung der Aktivität der natürlichen Killerzellen	41
3.5.7 Messung der Proliferation	41
3.5.8 Messung der Sekretion von Interleukin-10	41
3.5.9 Messung der Sekretion von Interferon- $\gamma$	42
<b>3.6 Versuchsdesign der Tierstudie 2 B</b>	<b>42</b>
<b>3.7 Versuchsdesign der Humanstudie</b>	<b>42</b>
3.7.1 Isolierung der mononukleären Zellen des Blutes	43
3.7.2 Kryokonservierung der mononukleären Zellen	43
3.7.3 Aufbereitung von Fäzeswasser	43
3.7.4 Messung der Phagozytoseaktivität	43
3.7.4.1 Opsonisierung der E. coli	44
3.7.4.2 Versuchsansatz zur Messung der Phagozytoseaktivität	44
3.7.5 Messung des oxidativen Burst	44
3.7.6 Messung der Aktivität der natürlichen Killerzellen	45

3.7.6.1	Kultivierung der Zielzellen K-562	45
3.7.6.2	Markierung der Zielzellen K-562	45
3.7.6.3	Rekultivierung kryokonservierter humaner mononukleärer Zellen	45
3.7.6.4	Versuchsansatz zur Messung der Aktivität der natürlichen Killerzellen	46
3.7.7	Stimulation der mononukleären Zellen zur Zytokinsekretion	46
3.7.8	Messung der Sekretion von Interleukin-2	47
3.7.9	Messung der Sekretion von Interleukin-10	47
3.7.10	Messung der Sekretion von Interleukin-12	47
3.7.11	Messung der Sekretion von Tumornekrosefaktor- $\alpha$	47
3.7.12	Messung der Sekretion von Interferon- $\gamma$	48
3.7.13	Messung von Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 in Fäzeswasser	48
3.7.14	Messung von Prostaglandin E <sub>2</sub> in Fäzeswasser	48
<b>3.8</b>	<b>Statistische Auswertung der Daten</b>	<b>49</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b>Tierstudie 1</b>	<b>50</b>
4.1.1	Körpergewicht	50
4.1.2	Futtermaufnahme	50
4.1.3	Lymphozytensubpopulationen	51
4.1.3.1	CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen	51
4.1.3.2	CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	52
4.1.3.3	Verhältnis CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen/CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	52
4.1.4	Phagozytoseaktivität	52
4.1.4.1	Phagozytoseaktivität der neutrophilen Granulozyten	53
4.1.4.2	Phagozytoseaktivität der Monozyten	54
4.1.5	Oxidativer Burst	55
4.1.6	Aktivität der natürlichen Killerzellen	55
4.1.6.1	NK-Aktivität	56
4.1.6.2	Hemmung der NK-Aktivität mit Pentoxifyllin	56
4.1.7	Proliferation	57
4.1.8	Sekretion von Interleukin-10	58
4.1.9	Sekretion von Interferon- $\gamma$	58
4.1.10	Sekretion von SIgA	59
<b>4.2</b>	<b>Tierstudie 2 A</b>	<b>59</b>
4.2.1	Körpergewicht	59
4.2.2	Lymphozytensubpopulationen	59
4.2.2.1	CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen	60
4.2.2.2	CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	60
4.2.2.3	Verhältnis CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen/CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	60
4.2.3	Phagozytoseaktivität	61
4.2.4	Aktivität der natürlichen Killerzellen	62
4.2.5	Proliferation	63
4.2.6	Sekretion von Interleukin-10	63

4.2.7	Sekretion von Interferon- $\gamma$	64
<b>4.3</b>	<b>Tierstudie 2 B</b>	<b>65</b>
4.3.1	Körpergewicht	65
4.3.2	Lymphozytensubpopulationen	65
4.3.2.1	CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen	65
4.3.2.2	CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	66
4.3.2.3	Verhältnis CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen/CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	66
4.3.3	Phagozytoseaktivität	66
4.3.4	Aktivität der natürlichen Killerzellen	67
4.3.5	Proliferation	68
4.3.6	Sekretion von Interleukin-10	68
4.3.7	Sekretion von Interferon- $\gamma$	69
<b>4.4.</b>	<b>Zusammenfassung beobachteter Effekte in den Tierstudien</b>	<b>70</b>
4.4.1	Tierstudie 1	70
4.4.2	Tierstudie 2 A	70
4.4.3	Tierstudie 2 B	71
<b>4.5</b>	<b>Einfluss von Azoxymethan in den Tierstudien</b>	<b>71</b>
<b>4.6</b>	<b>Humanstudie</b>	<b>72</b>
4.6.1	Phagozytoseaktivität	73
4.6.1.1	Phagozytoseaktivität der Granulozyten und der Monozyten	73
4.6.1.2	Mittlere Fluoreszenzintensität aktiver Granulozyten und aktiver Monozyten	74
4.6.2	Oxidativer Burst	75
4.6.2.1	Bildung reaktiver Sauerstoffspezies	75
4.6.2.2	Mittlere Fluoreszenzintensität	76
4.6.3	Aktivität der natürlichen Killerzellen	77
4.6.4	Sekretion von Interleukin-2	78
4.6.5	Sekretion von Interleukin-10	79
4.6.6	Sekretion von Interleukin-12	80
4.6.7	Sekretion von Tumornekrosefaktor- $\alpha$	81
4.6.8	Sekretion von Interferon- $\gamma$	82
4.6.9	Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 im Fäzeswasser	83
4.6.10	Prostaglandin E <sub>2</sub> im Fäzeswasser	84
4.6.11	Einfluss von Geschlecht, BMI und Dukes-Klassifikation	84
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>85</b>
<b>5.1</b>	<b>Tierstudien</b>	<b>85</b>
5.1.1	Lymphozytensubpopulationen	85
5.1.1.1	Einfluss von PRO auf die Lymphozytensubpopulationen	85
5.1.1.2	Einfluss von PRÄ auf die Lymphozytensubpopulationen	86
5.1.1.3	Einfluss von SYN auf die Lymphozytensubpopulationen	87
5.1.2	Phagozytoseaktivität	88
5.1.2.1	Einfluss von PRO auf die Phagozytoseaktivität	88
5.1.2.2	Einfluss von PRÄ auf die Phagozytoseaktivität	89
5.1.2.3	Einfluss von SYN auf die Phagozytoseaktivität	89

5.1.3	Oxidativer Burst	90
5.1.3.1	Einfluss von PRO auf den oxidativen Burst	90
5.1.3.2	Einfluss von PRÄ auf den oxidativen Burst	91
5.1.3.3	Einfluss von SYN auf den oxidativen Burst	91
5.1.4	Aktivität der natürlichen Killerzellen	91
5.1.4.1	Einfluss von PRO auf die Aktivität der natürlichen Killerzellen	91
5.1.4.2	Einfluss von PRÄ auf die Aktivität der natürlichen Killerzellen	92
5.1.4.3	Einfluss von SYN auf die Aktivität der natürlichen Killerzellen	92
5.1.5	Proliferation	93
5.1.5.1	Einfluss von PRO auf die Proliferation	93
5.1.5.2	Einfluss von PRÄ auf die Proliferation	94
5.1.5.3	Einfluss von SYN auf die Proliferation	94
5.1.6	Zytokine	94
5.1.6.1	Einfluss von PRO auf die Zytokinsekretion	95
5.1.6.2	Einfluss von PRÄ auf die Zytokinsekretion	96
5.1.6.3	Einfluss von SYN auf die Zytokinsekretion	96
5.1.7	Sekretorisches Immunglobulin A	97
5.1.7.1	Einfluss von PRO auf die Sekretion von SIgA	97
5.1.7.2	Einfluss von PRÄ auf die Sekretion von SIgA	98
5.1.7.3	Einfluss von SYN auf die Sekretion von SIgA	98
5.1.8	Wirkungen der Probiotika	99
5.1.9	Wirkungen der Präbiotika	100
5.1.10	Wirkungen der Synbiotika	104
<b>5.2</b>	<b>Humanstudie</b>	<b>106</b>
5.2.1	Bedeutung der gemessenen Immunparameter	106
5.2.2	Vergleichbarkeit mit Humanstudien anderer Arbeitsgruppen	108
5.2.3	Einfluss von SYN auf das Immunsystem	108
5.2.4	Dosis und Aufnahmedauer von SYN	109
5.2.5	Unterschiede zwischen Human- und Tierstudien	110
5.2.6	Unterschiede zwischen Patienten und Versuchstieren	110
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>127</b>
<b>8</b>	<b>TABELLENANHANG</b>	<b>129</b>
<b>8.1</b>	<b>Tierstudie 1</b>	<b>129</b>
8.1.1	Körpergewicht, Gewichtszunahme und Futteraufnahme	129
Tab. 8.1	Körpergewicht und Gewichtszunahme der Versuchstiere	129
Tab. 8.2	Durchschnittliche, tägliche Futteraufnahme	129
8.1.2	Lymphozytensubpopulationen	130
Tab. 8.3	Anteil CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen	130
Tab. 8.4	Anteil CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	130
Tab. 8.5	Verhältnis CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen/CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	131

8.1.3	Phagozytoseaktivität	131
	Tab. 8.6 Anteil phagozytierender Zellen sowie deren MF	131
	Tab. 8.7 Anteil phagozytierender Zellen sowie deren MF	132
8.1.4	Oxidativer Burst	132
	Tab. 8.8 Anteil aktiver Granulozyten im Blut sowie deren MF	132
8.1.5	Aktivität der natürlichen Killerzellen	133
	Tab. 8.9 NK-Aktivität der Immunzellen aus Blut und Milz	133
	Tab. 8.10 NK-Aktivität der Immunzellen aus MLK und PP	133
	Tab. 8.11 Hemmung der NK-Aktivität durch PTX	134
8.1.6	Proliferation	134
	Tab. 8.12 Proliferation der Immunzellen aus Milz, MLK und PP	134
8.1.7	Interleukin-10	135
	Tab. 8.13 IL-10-Sekretion der Immunzellen aus Milz, MLK und PP	135
8.1.8	Interferon- $\gamma$	135
	Tab. 8.14 IFN- $\gamma$ -Sekretion der Immunzellen aus Milz, MLK und PP	135
8.1.9	Sekretorisches Immunglobulin A	136
	Tab. 8.15 SIgA-Konzentration des Ileum- und des Caecum-Inhalts	136
<b>8.2</b>	<b>Tierstudie 2 A</b>	<b>136</b>
8.2.1	Lymphozytensubpopulationen	136
	Tab. 8.16 Anteil CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen	136
	Tab. 8.17 Anteil CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	137
	Tab. 8.18 Verhältnis CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen/CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	137
8.2.2	Phagozytoseaktivität	138
	Tab. 8.19 Anteil phagozytierender Zellen in der Milz sowie MF der aktiven Zellen	138
8.2.3	Aktivität der natürlichen Killerzellen	138
	Tab. 8.20 NK-Aktivität der Immunzellen aus Milz, MLK und PP	138
8.2.4	Proliferation	139
	Tab. 8.21 Proliferation der Immunzellen aus Milz, MLK und PP	139
8.2.5	Interleukin-10	139
	Tab. 8.22 IL-10-Sekretion der Immunzellen aus Milz, MLK und PP	139
8.2.6	Interferon- $\gamma$	140
	Tab. 8.23 IFN- $\gamma$ -Sekretion der Immunzellen aus Milz, MLK und PP	140
<b>8.3</b>	<b>Tierstudie 2 B</b>	<b>140</b>
8.3.1	Lymphozytensubpopulationen	140
	Tab. 8.24 Anteil CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen	140
	Tab. 8.25 Anteil CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	140
	Tab. 8.26 Verhältnis CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen/CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	141
8.3.2	Phagozytoseaktivität	141
	Tab. 8.27 Anteil phagozytierender Zellen in der Milz sowie MF der aktiven Zellen	141
8.3.3	Aktivität der natürlichen Killerzellen	141
	Tab. 8.28 NK-Aktivität der Immunzellen aus Milz, MLK und PP	141
8.3.4	Proliferation	142
	Tab. 8.29 Proliferation der Immunzellen aus Milz, MLK und PP	142



8.3.5	Interleukin-10	142
	Tab. 8.30 IL-10-Sekretion der Immunzellen aus Milz, MLK und PP	142
8.3.6	Interferon- $\gamma$	142
	Tab. 8.31 IFN- $\gamma$ -Sekretion der Immunzellen aus Milz, MLK und PP	142
<b>8.4</b>	<b>Humanstudie</b>	<b>143</b>
8.4.1	Phagozytoseaktivität	143
	Tab. 8.32 Anteil phagozytischer Zellen der Krebspatienten	143
	Tab. 8.33 Anteil phagozytischer Zellen der Patienten mit Polypen	143
	Tab. 8.34 MF der aktiven Zellen der Krebspatienten	144
	Tab. 8.35 MF der aktiven Zellen der Patienten mit Polypen	144
8.4.2	Oxidativer Burst	145
	Tab. 8.36 Anteil aktiver Granulozyten und deren MF der Krebspatienten	145
	Tab. 8.37 Anteil aktiver Granulozyten und deren MF der Patienten mit Polypen	145
8.4.3	Aktivität der natürlichen Killerzellen	146
	Tab. 8.38 NK-Aktivität der PMBZ	146
8.4.4	Interleukin-2	146
	Tab. 8.39 IL-2-Sekretion der PMBZ	146
8.4.5	Interleukin-10	147
	Tab. 8.40 IL-10-Sekretion der PMBZ	147
8.4.6	Interleukin-12	147
	Tab. 8.41 IL-12-Sekretion der PMBZ	147
8.4.7	Tumornekrosefaktor- $\alpha$	148
	Tab. 8.42 TNF- $\alpha$ -Sekretion der PMBZ	148
8.4.8	Interferon- $\gamma$	148
	Tab. 8.43 IFN- $\gamma$ -Sekretion der PMBZ	148
8.4.9	Transforming Growth Factor- $\beta$ 1	149
	Tab. 8.44 TGF- $\beta$ 1-Konzentration im Fäzeswasser	149
8.4.10	Prostaglandin E <sub>2</sub>	149
	Tab. 8.45 PGE <sub>2</sub> -Konzentration im Fäzeswasser	149

## VERZEICHNIS WEITERER TABELLEN

Tab. 3.1	Verwendete Fluoreszenzkanäle	31
Tab. 3.2	Futterzusammensetzung der einzelnen Gruppen	32
Tab. 3.3	Pipettierschema der Testansätze	37
Tab. 3.4	Pipettierschema mit Pentoxifyllin	38
Tab. 3.5	Anthropometrische Daten der Patientengruppen	42
Tab. 3.6	Pipettierschema der Testansätze	46
Tab. 4.1	Verhältnis CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen/CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen (Studie 1)	52
Tab. 4.2	Verhältnis CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen/CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen (Studie 2 A)	61
Tab. 4.3	Verhältnis CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen/CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen (Studie 2 B)	66
Tab. 4.4	Beobachtete Wirkungen der Versuchsdiäten in Studie 1	70
Tab. 4.5	Beobachtete Wirkungen der Versuchsdiäten in Studie 2 A	70

Tab. 4.6	Beobachtete Wirkungen der Versuchsdiäten in Studie 2 B	71
Tab. 4.7	AOM-beeinflusste Immunparameter	72

## VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abb. 2.1	Übersicht über die im menschlichen Darm vorherrschenden Bakterienarten	15
Abb. 2.2	Molekülstruktur von Inulin und Oligofructose	21
Abb. 4.1	Körpergewicht der Versuchstiere (Studie 1)	50
Abb. 4.2	Futtermittelaufnahme (Studie 1)	51
Abb. 4.3	Prozentualer Anteil der CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen (Studie 1)	51
Abb. 4.4	Prozentualer Anteil der CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen (Studie 1)	52
Abb. 4.5	Anteil phagozytischer Zellen der Granulozytenpopulation (Studie 1)	53
Abb. 4.6	Mittlere Fluoreszenzintensität der aktiven Granulozyten (Studie 1)	53
Abb. 4.7	Anteil phagozytischer Zellen der Monozytenpopulation (Studie 1)	54
Abb. 4.8	Mittlere Fluoreszenzintensität der aktiven Monozyten (Studie 1)	54
Abb. 4.9	Oxidativer Burst der Granulozyten (Studie 1)	55
Abb. 4.10	NK-Aktivität (Studie 1)	56
Abb. 4.11	NK-Aktivität der isolierten Immunzellen aus den PP (Studie 1)	57
Abb. 4.12	Proliferation (Studie 1)	57
Abb. 4.13	IL-10-Sekretion (Studie 1)	58
Abb. 4.14	IFN- $\gamma$ -Sekretion (Studie 1)	58
Abb. 4.15	SIgA-Konzentration (Studie 1)	59
Abb. 4.16	Prozentualer Anteil der CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen (Studie 2 A)	60
Abb. 4.17	Prozentualer Anteil der CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen (Studie 2 A)	60
Abb. 4.18	Anteil phagozytischer Zellen (Studie 2 A)	61
Abb. 4.19	Mittlere Fluoreszenzintensität (Studie 2 A)	62
Abb. 4.20	NK-Aktivität (Studie 2 A)	62
Abb. 4.21	Proliferation (Studie 2 A)	63
Abb. 4.22	IL-10-Sekretion (Studie 2 A)	64
Abb. 4.23	IFN- $\gamma$ -Sekretion (Studie 2 A)	64
Abb. 4.24	Prozentualer Anteil der CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen (Studie 2 B)	65
Abb. 4.25	Prozentualer Anteil der CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen (Studie 2 B)	66
Abb. 4.26	Anteil phagozytischer Zellen (Studie 2 B)	67
Abb. 4.27	Mittlere Fluoreszenzintensität (Studie 2 B)	67
Abb. 4.28	NK-Aktivität (Studie 2 B)	68
Abb. 4.29	Proliferation (Studie 2 B)	68
Abb. 4.30	IL-10-Sekretion (Studie 2 B)	69
Abb. 4.31	IFN- $\gamma$ -Sekretion (Studie 2 B)	69
Abb. 4.32	Anteil phagozytischer Zellen (Krebspatienten)	73
Abb. 4.33	Anteil phagozytischer Zellen (Patienten mit Polypen)	73
Abb. 4.34	Mittlere Fluoreszenzaktivität (Krebspatienten)	74
Abb. 4.35	Mittlere Fluoreszenzaktivität (Patienten mit Polypen)	74
Abb. 4.36	Anteil aktiver Zellen (Krebspatienten)	75
Abb. 4.37	Anteil aktiver Zellen (Patienten mit Polypen)	75
Abb. 4.38	Mittlere Fluoreszenzaktivität (Krebspatienten)	76

Abb. 4.39	Mittlere Fluoreszenzaktivität (Patienten mit Polypen)	76
Abb. 4.40	NK-Aktivität (Krebspatienten)	77
Abb. 4.41	NK-Aktivität (Patienten mit Polypen)	77
Abb. 4.42	IL-2-Sekretion (Krebspatienten)	78
Abb. 4.43	IL-2-Sekretion (Patienten mit Polypen)	78
Abb. 4.44	IL-10-Sekretion (Krebspatienten)	79
Abb. 4.45	IL-10-Sekretion (Patienten mit Polypen)	79
Abb. 4.46	IL-12-Sekretion (Krebspatienten)	80
Abb. 4.47	IL-12-Sekretion (Patienten mit Polypen)	80
Abb. 4.48	TNF- $\alpha$ -Sekretion (Krebspatienten)	81
Abb. 4.49	TNF- $\alpha$ -Sekretion (Patienten mit Polypen)	81
Abb. 4.50	IFN- $\gamma$ -Sekretion (Krebspatienten)	82
Abb. 4.51	IFN- $\gamma$ -Sekretion (Patienten mit Polypen)	82
Abb. 4.52	TGF- $\beta$ 1-Konzentration im Fäzeswasser (Krebspatienten)	83
Abb. 4.53	TGF- $\beta$ 1-Konzentration im Fäzeswasser (Patienten mit Polypen)	83
Abb. 4.54	PGE <sub>2</sub> -Konzentration im Fäzeswasser (Krebspatienten)	84
Abb. 4.55	PGE <sub>2</sub> -Konzentration im Fäzeswasser (Patienten mit Polypen)	84

# 1 Zusammenfassung

Probiotika sind definiert als lebende Mikroorganismen, die Nahrungsmitteln zugesetzt werden und den Wirtsorganismus durch Unterstützung seines intestinalen, mikrobiologischen Gleichgewichts positiv beeinflussen (Fuller, 1989). Unter Präbiotika versteht man unverdauliche Nahrungsbestandteile, die durch selektive Förderung des Wachstums und/oder der Aktivität einzelner oder einer begrenzten Zahl von Darmbakterienstämmen positive Wirkungen für die Gesundheit erzielen (Gibson & Roberfroid, 1995). Synbiotika bestehen aus einer Kombination von Pro- und Präbiotika. In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen einer Aufnahme der Probiotika *Lactobacillus rhamnosus* GG und *Bifidobacterium lactis* BB12 (PRO), des Präbiotikums Raftilose<sup>®</sup> Synergy1 (PRÄ; Inulin angereichert mit Oligofruktose) sowie eines Synbiotikums (SYN; Kombination von PRO und PRÄ) auf das systemische und insbesondere das darmassoziierte Immunsystem untersucht. Hierzu wurden Tier- und Humanstudien durchgeführt.

In den Tierstudien mit F344 Ratten wurden die Wirkungen einer kurzzeitigen (4 Wochen lang) und einer langfristigen Verabreichung (33 Wochen lang) von PRO, PRÄ oder SYN an gesunde Tiere untersucht. Darüber hinaus wurde auch an Tieren, die Dickdarmtumoren entwickelten, die langfristige Verabreichung untersucht. Es wurden unterschiedliche Parameter für die Immunzellen des Blutes, der Milz, der mesenterialen Lymphknoten und der Peyerschen Plaques gemessen. Am Durchflusszytometer wurden die Lymphozytensubpopulationen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die Phagozytoseaktivität, der oxidative Burst und die Aktivität der natürlichen Killerzellen untersucht. Die Proliferation der Immunzellen sowie ihre Interleukin-10- und Interferon- $\gamma$ -Sekretion und die Konzentration von sekretorischem Immunglobulin A im Darminhalt wurden mittels ELISA gemessen. Die Aufnahme von PRO hatte nahezu keinen Einfluss auf das Immunsystem der Tiere. Die kurzzeitige Fütterung mit PRÄ bei gesunden Tieren und die langfristige Fütterung mit PRÄ bei Tieren mit Dickdarmtumoren führte zu einer Beeinflussung des darmassoziierten Immunsystems, nicht jedoch des systemischen Immunsystems. Bei einer langfristigen Fütterung mit PRÄ wurde bei gesunden Tieren eine Beeinflussung des systemischen Immunsystems festgestellt. Die kurzzeitige Verabreichung von SYN beeinflusste bei gesunden Tieren das darmassoziierte und das systemische Immunsystem. Durch die langfristige Fütterung von SYN konnte bei gesunden Tieren keine Beeinflussung festgestellt werden. Bei Tieren mit Dickdarmtumoren führte die langfristige Verabreichung von SYN vor allem zu einer Beeinflussung des darmassoziierten Immunsystems.

Die placebokontrollierte Humanstudie wurde mit zwei Patientengruppen durchgeführt. Die erste Gruppe bestand aus Patienten mit resezierten Darmtumoren. Die zweite Gruppe umfasste Patienten mit bereits resezierten oder noch zu entfernenden Darmpolypen. Die Interventionsgruppen nahmen insgesamt 12 Wochen lang SYN zu sich. Zu Beginn der Intervention, nach 6 und nach 12 Wochen wurden durchflusszytometrisch und unter Verwendung der ELISA-Technik verschiedene Immunparameter untersucht. Die Aktivität und der oxidative Burst der Phagozyten des Blutes gaben Auskunft über den Status der unspezifischen Immunabwehr. Insbesondere wurden Parameter untersucht, die bei der Abwehr von Tumorzellen von Bedeutung sind. Die Aktivität der natürlichen Killerzellen des Blutes und die Kapazität peripherer mononukleärer Blutzellen zur Sekretion unterschiedlicher Zytokine (Interleukin-2, Interleukin-10, Interleukin-12, Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und Interferon- $\gamma$ ) wurde gemessen. Im Fäzeswasser wurden die Konzentrationen von Prostaglandin E<sub>2</sub> und Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 gemessen. Die Aufnahme von SYN hatte keinen Einfluss auf das Immunsystem der Patienten mit Polypen. In der Gruppe der Darmkrebspatienten wurde eine geringfügige Beeinflussung des Immunsystems festgestellt. Die Aufnahme von SYN führte nach 12 Wochen zu einer höheren Interferon- $\gamma$ -Sekretion in dieser Gruppe.

## 2 Einleitung

### 2.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem hat eine sehr große Bedeutung für den Organismus. Es schützt den Körper vor eindringenden Viren, Bakterien und Parasiten. Das Immunsystem besteht aus unterschiedlichen, im Körper verteilten, Organen, Zellen und Molekülen, die der Abwehr von Krankheitserregern dienen.

Antigen-unspezifische Abwehrmechanismen, die sofort oder innerhalb von einigen Stunden vom Körper ausgelöst werden, werden zur **nichtadaptiven Immunität** gezählt. Hierzu gehören physikalische Barrieren wie Epithelien und Mucus sowie phagozytische Zellen (neutrophile Granulozyten und Makrophagen), eosinophile Granulozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), außerdem lösliche Faktoren wie das Komplementsystem, Zytokine und Chemokine (Huston, 1997).

Antigen-spezifische Abwehrreaktionen, die innerhalb weniger Tage im Körper gebildet werden, gehören zur **adaptiven Immunität**. Das Auslösen einer adaptiven Immunantwort basiert auf einer Antigenprozessierung und anschließender Antigenerkennung durch T-Lymphozyten (T-Zellen) und B-Lymphozyten (B-Zellen). Durch die Antigenerkennung wird eine klonale Expansion der spezifischen T- und B-Zellen ausgelöst. Diese Klone differenzieren sich zu Effektorzellen, die infizierte Zellen zerstören oder andere Zellen des Immunsystems aktivieren. Ein wichtiges Merkmal der adaptiven Immunantwort ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Am Ende einer Immunreaktion überleben einige der spezifischen T- und B-Zellen, dies führt zu einer deutlich schnelleren Immunantwort im Falle einer erneuten Exposition desselben Antigens (Huston, 1997).

#### 2.1.1 Organe des Immunsystems

##### 2.1.1.1 Das darmassoziierte lymphatische Gewebe

Das darmassoziierte lymphatische Gewebe besteht aus den Peyerschen Plaques, die sich in der Tela submucosa des Dünndarms, vor allem im distalen Ileum befinden. Die intraepithelialen Lymphozyten der Lamina epithelialis und die Immunzellen, die in der Lamina propria des Darmes lokalisiert sind, sind ebenfalls Zellen des darmassoziierten Immunsystems (Brandtzaeg, 1998). Die Lymphknoten des Mesenteriums können, im weiteren Sinne, ebenfalls zu dem darmassoziierten lymphatischen Gewebe gezählt werden (Mowat & Viney, 1997).

Die **Peyerschen Plaques** bestehen aus B-Zell-Follikeln, die direkt unterhalb des Epithelbereichs eine Wölbung bilden, den sogenannten Dom, und aus tiefer liegenden T-Zell-Zonen. Das Follikel-assoziierte Epithelium des Domareals enthält M-Zellen, die sich von den umliegenden Enterozyten vor allem durch das Fehlen der Glykokalyx unterscheiden. M-Zellen nehmen aus dem Darmlumen Mikroorganismen und Makromoleküle durch Phagozytose und Viren und andere anhaftende Partikel durch Endozytose auf. Nach dem Transport durch die Zelle werden die aufgenommenen Antigene an der basolateralen Membran durch Exozytose freigesetzt und gelangen so zu den dort lokalisierten Lymphozyten, Makrophagen und antigenpräsentierenden Zellen (Nicoletti, 2000). M-Zellen prozessieren vermutlich selbst keine Antigene (Neutra, 1999).

**Intraepitheliale Lymphozyten** sind überwiegend T-Zellen und gehören größtenteils zu der Klasse der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Mayer, 2000). Die Funktion der intraepithelialen Lymphozyten ist bislang kaum geklärt. Möglicherweise sezernieren sie Wachstumsfaktoren, die das Epithelwachstum stimulieren. Eine Beteiligung an der Entstehung oraler Toleranz sowie an der Beseitigung infizierter oder defekter Epithelzellen wird ebenfalls diskutiert (Mowat & Viney, 1997).

In der **Lamina propria** finden sich verschiedene Immunzellen. Einen großen Anteil haben B-Zellen und Plasmazellen, die überwiegend Immunglobuline (Ig) des Isotyps A sezernieren. Außerdem sind T-Zellen (CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen), Makrophagen, Mastzellen und dendritische Zellen vorhanden.

Die **mesenterialen Lymphknoten** besitzen den typischen Aufbau von Lymphknoten. Im äußeren Cortextbereich befinden sich lymphatische Follikel, die B-Zellen enthalten und im paracorticalen Bereich sind vor allem T-Zellen und dendritische Zellen lokalisiert. Durch ihre Lokalisation im Mesenterium, das den Dünndarm an die hintere Bauchwand heftet, sind die mesenterialen Lymphknoten wichtige Bindeglieder zwischen Peyerschen Plaques, Mucosa und systemischem Immunsystem. Antigene werden aus der Mucosa, über M-Zellen und dendritische Zellen, zu den Lymphknoten transportiert und dort T-Zellen präsentiert (Nagler-Anderson, 2001). Die T-Zellen der Peyerschen Plaques gelangen ebenfalls über die Lymphknoten in die systemische Zirkulation (MacDonald & Monteleone, 2001).

### 2.1.1.2 Milz

Die Milz wird ständig von sehr vielen Lymphozyten passiert, so dass ihr eine zentrale Rolle bei der Immunantwort zukommt. Morphologisch kann die Milz in eine rote und weiße Pulpa eingeteilt werden. In der roten Pulpa sind Erythrozyten, Megakaryozyten, Makrophagen, Lymphozyten und auch NK-Zellen lokalisiert. Hier findet zudem der Abbau der gealterten Erythrozyten statt. In der weißen Pulpa können drei Kompartimente unterschieden werden: die PALS-Region (periarteriolar lymphoid sheat), Follikel und Randbereich. Die innere PALS-Region enthält überwiegend T-Zellen, die äußere Region außerdem B-Zellen und Makrophagen. Die Follikel sind vorwiegend von B-Zellen bevölkert und enthalten das Keimzentrum. Im Randbereich befinden sich vor allem B-Zellen, Makrophagen und wenige T-Zellen. Antigene gelangen über den Blutstrom in die Milz und begegnen hier den zahlreichen Immunzellen (van den Eertwegh *et al.*, 1992).

## 2.1.2 Zellen des Immunsystems

### 2.1.2.1 Natürliche Killerzellen

Die Zellpopulation der NK-Zellen wurde ursprünglich anhand ihrer Fähigkeit, ohne vorherige Aktivierung, Tumorzellen (beispielsweise K-562-Tumorzellen) abtöten zu können identifiziert. NK-Zellen besitzen keinen T-Zell-Rezeptor (TZR) und sind CD3<sup>-</sup> sowie CD56<sup>+</sup> (Miller, 2002). Anhand weiterer Differenzierungsantigene können verschiedene Subpopulationen der NK-Zellen unterschieden werden, die im Körper auch unterschiedliche Funktionen wahrnehmen (Whiteside & Herberman, 1995). 10 – 20 % der mononukleären Zellen des peripheren Blutes sind NK-Zellen (Miller, 2002). Außer im peripheren Blut kommen NK-Zellen in der roten Pulpa der Milz, in der Leber und in den Schleimhäuten vor. In geringer Zahl werden sie auch in Lymphknoten gefunden, obwohl NK-Zellen nicht durch das

lymphatisches System wandern (Warren, 1996). NK-Zellen sind in der frühen Phase der Immunabwehr wichtig, da sie auch ohne vorherige Stimulation virusinfizierte Zellen und Tumorzellen abtöten können. Aufgrund ihrer Fähigkeit bestimmte Zytokine und Chemokine zu produzieren, kommen ihnen außerdem wichtige regulatorische Aufgaben bei der nicht-adaptiven und bei der adaptiven Immunantwort zu (Trinchieri, 1995). Sie sezernieren die Zytokine Interferon (IFN)- $\gamma$ , Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$ , Granulozyten-Makrophagenkoloniestimulierender Faktor (GM-CSF) sowie Interleukin (IL)-5 und IL-8. Damit haben NK-Zellen das Potenzial die Immunantwort in Richtung einer  $T_H$ -1-Reaktion (IFN- $\gamma$ ) zu leiten, die Hämatopoese (GM-CSF) zu regulieren, die Differenzierung und Mobilisierung eosinophiler Granulozyten zu induzieren (IL-5) und eine inflammatorische Immunantwort zu fördern (IL-8) (Warren, 1996). IL-2, IL-12 und Interferone sind wichtige Zytokine, die Aktivität und Zytokinsekretion der NK-Zellen generell erhöhen (Timonen, 1997). Hingegen haben IL-4 und IL-10 eine hemmende Wirkung auf die Zytokinsekretion der NK-Zellen (Warren, 1996).

Die Aktivität der NK-Zellen wird über eine ganze Reihe von aktivierenden und hemmenden Rezeptoren auf ihrer Oberfläche reguliert. Ligandenbindung an aktivierende Rezeptoren löst Tötungsmechanismen gegenüber der Zielzelle aus, während die Bindung an hemmende Rezeptoren die Zelle vor der Lyse durch NK-Zellen schützt. Zu den bekannten aktivierenden Rezeptoren gehören beispielsweise CD16 und CD2. Ursprünglich wurden KIR (killer immunoglobuline-like receptors) als hemmende Rezeptoren, die MHC-Klasse-I-Moleküle (Haupthistokompatibilitätskomplex, MHC) erkennen, beschrieben. Die Expression von MHC-Klasse-I-Moleküle durch normale, nichtinfizierte Zellen schützt diese Zellen vor der Lyse durch NK-Zellen. Es hat sich jedoch gezeigt, dass es funktionell unterschiedliche KIR gibt, die entweder hemmende oder aber auch aktivierende Signale, bei Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle, auslösen. CD94/NKG2 ist ein heterodimerer Rezeptor, der bei Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle, je nach Subtyp, ein aktivierendes oder ein hemmendes Signal auslösen kann. Die Entscheidung, ob eine Zielzelle abgetötet wird oder nicht, beruht also auf der Nettosumme aller hemmenden und aktivierenden Rezeptorsignale (Miller, 2001). Bei der Erkennung und Abtötung von Tumorzellen sind unterschiedliche Rezeptoren beteiligt. Bislang ist bekannt, dass NKG2D von Bedeutung ist, da dieser Rezeptor Antigene erkennt, die auf Tumorzellen häufig überexprimiert werden (Cerwenka & Lanier, 2001).

NK-Zellen bedienen sich unterschiedlicher Wege, um von ihnen erkannte Zielzellen abzutöten. NK-Zellen können über die Sekretion von Perforin und Granzymen die Nekrose/Apoptose der Zielzelle auslösen. Außerdem exprimieren NK-Zellen membranständige Zytokine der TNF-Ligandenfamilie, die bei Bindung an einen Rezeptor der TNF-Rezeptorfamilie auf einer Zielzelle, die Apoptose dieser Zielzelle auslösen. Möglicherweise können aktivierte NK-Zellen die membranständigen TNF-Liganden auch sezernieren, so dass die Apoptose der Zielzellen nicht nur durch direkten Kontakt, sondern auch über eine gewisse Distanz ausgelöst werden kann (Vujanovic, 2001).

Tartter *et al.* (1987) untersuchten in einer Humanstudie an Patienten mit kolorektalem Karzinom, inwieweit die Aktivität der NK-Zellen des peripheren Blutes, die präoperativ bestimmt wurde, mit dem Wiederauftreten eines Karzinoms korrelierte. Diese Studie zeigte, dass Patienten mit einer niedrigen Aktivität der NK-Zellen häufiger erneut an einem Karzinom erkranken als Patienten mit einer mittleren bis hohen Killerzellaktivität. In einer Prospektivstudie zeigten Imai *et al.* (2000), dass eine niedrige Aktivität der NK-Zellen des Blutes mit einem erhöhten Risiko für eine Krebserkrankung einhergeht. Kishi *et al.* (1999) hat ebenfalls eine geringere NK-Aktivität peripherer Blutlymphozyten in Krebspatienten, im Vergleich zu Gesunden, festgestellt.

### 2.1.2.2 T-Lymphozyten

T- und B-Zellen haben eine gemeinsame Vorläuferzelle. Die Reifung der B-Zellen findet im Knochenmark statt, hingegen reifen T-Zellen im Thymus heran. Während der Reifung der T-Zellen findet zuerst eine Umordnung der Gene des TZR statt. Ein kleiner Teil der T-Zellpopulation exprimiert den  $\gamma\delta$ -TZR und ihre weitere Reifung erfolgt außerhalb des Thymus. Ein Teil der intraepithelialen Lymphozyten gehört zu dieser T-Zellpopulation (Viret & Janeway, 1999). Der größte Teil der T-Zellen exprimiert jedoch den  $\alpha\beta$ -TZR und in der frühen Entwicklungsphase die beiden Korezeptoren CD4 und CD8. Der überwiegende Teil der T-Zellen stirbt bereits während des Reifungsprozesses im Thymus. Durch positive Selektion werden T-Zellen, deren TZR MHC-Moleküle erkennen, vor der Apoptose bewahrt. Vor oder während der positiven Selektion wird die Entscheidung gefällt, ob eine T-Zelle weiterhin den CD4-Korezeptor (CD4<sup>+</sup>-T-Zellen) oder den CD8-Korezeptor (CD8<sup>+</sup>-T-Zellen) exprimiert. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen erkennen Antigene, die an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden sind. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen können in Wechselwirkung mit Komplexen aus Antigen und MHC-Klasse-II-Molekül treten. Durch negative Selektion wird in T-Zellen, die auf Autoantigen-MHC-Komplexe reagieren, die Apoptose ausgelöst. Die genauen Mechanismen dieser Selektionsprozesse sind bislang jedoch nicht vollständig geklärt (Viret & Janeway, 1999; Germain, 2002).

Reife, naive T-Zellen verlassen den Thymus und pendeln zwischen Blut und peripherem Lymphgewebe. Erkennt die T-Zelle ein Antigen auf einer antigenpräsentierenden Zelle (dendritische Zelle, Makrophage oder B-Zelle) und erhält sie gleichzeitig ein kostimulierendes Signal durch die antigenpräsentierende Zelle, wird sie zur Vermehrung und Differenzierung in eine Effektorzelle angeregt. Effektorzellen sind in der Lage auch ohne kostimulierendes Signal auf Antigene zu reagieren (Abbas & Janeway, 2000).

**CD8<sup>+</sup>-T-Zellen** differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen (CTL). CTL können mit vielen Körperzellen interagieren, da MHC-Klasse-I-Moleküle von fast allen Körperzellen exprimiert werden. MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren zytosolische Antigene. Zu diesen Antigenen gehören virale Proteine, Proteine intrazellulärer Bakterien und Tumorantigene (McMichael, 1992). CTL können, wie NK-Zellen, über zwei unterschiedliche Wege infizierte Zellen oder Tumorzellen abtöten. CTL können einerseits über die gezielte Sekretion von Perforin und Granzymen die Nekrose/Apoptose der Zielzelle auslösen. Andererseits exprimieren CTL den Fas-Liganden und andere Moleküle der TNF-Ligandenfamilie, die bei Bindung an Fas oder andere Rezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie auf der Zielzelle, die Apoptose der Zielzelle induzieren (Vujanovic, 2001). CTL sezernieren außerdem Zytokine, vor allem IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$  (Delves & Roitt, 2000).

**CD4<sup>+</sup>-T-Zellen** differenzieren zu Helfer-T-Zellen (T<sub>H</sub>-Zellen). T<sub>H</sub>-Zellen interagieren hauptsächlich mit Zellen des Immunsystems, da MHC-Klasse-II-Moleküle nur von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden. MHC-Klasse-II-Moleküle präsentieren Antigene, die durch Phagozytose oder Endozytose, von der antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen wurden (Huston, 1997). Aufgrund ihrer sezernierten Zytokine werden innerhalb der T<sub>H</sub>-Zellen verschiedene Subpopulationen unterschieden. Am besten charakterisiert sind die beiden Subpopulationen T<sub>H1</sub> und T<sub>H2</sub>. T<sub>H1</sub>- und T<sub>H2</sub>-Zellen haben gemeinsame Vorläuferzellen. In Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren bei der Antigenerkennung wird entweder die Entstehung von T<sub>H1</sub>-Zellen oder T<sub>H2</sub>-Zellen gefördert. Zu diesen Faktoren gehören beispielsweise das Ausmaß der TZR-Liganden Bindung, die Art des kostimulierenden Signals und welche Zytokine sezerniert werden. IL-4 fördert die Differenzierung von T<sub>H2</sub>-Zellen, hingegen stimulieren IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$  und IFN- $\alpha$  die Entstehung von T<sub>H1</sub>-Zellen. Ver-



schiedene Hormone (z. B. Glukokortikoide, Progesteron und Androgene) beeinflussen ebenfalls die Differenzierung der T<sub>H</sub>-Zellen (Romagnani, 1999). T<sub>H</sub>1-Zellen sezernieren überwiegend IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\beta$ . Sie aktivieren damit Makrophagen und veranlassen B-Zellen zur Bildung opsonisierender Antikörper. T<sub>H</sub>2-Zellen bilden vor allem IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Diese Zytokine regen B-Zellen zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern an, aktivieren eosinophile Granulozyten und hemmen teilweise die Funktion von Makrophagen (Romagnani, 1999; Abbas & Janeway, 2000). Innerhalb der T<sub>H</sub>1-Zellen gibt es außerdem eine Subpopulation mit zytotoxischen Fähigkeiten. Diese Zellen exprimieren den Fas-Liganden und induzieren die Apoptose in Fas-positiven Zellen, hauptsächlich in Zellen des Immunsystems (T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen) und haben vermutlich regulierende Aufgaben innerhalb des Immunsystems (Hahn & Erb, 1999).

Eine weitere identifizierte T-Zellpopulation ist die Population der natürlichen Killer T-Zellen (NKT). NKT wurden bislang hauptsächlich in Mäusen untersucht. Diese Zellen besitzen einen TZR, aber auch Oberflächenantigene der NK-Zellen. Inwieweit sie *in vivo* an der Beseitigung virusinfizierter Zellen und Tumorzellen beteiligt sind, ist bislang nicht vollständig geklärt (Brutkiewicz & Sriram, 2002).

### 2.1.2.3 Phagozyten

Zu den professionellen Phagozyten gehören Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten (Rabinovitch, 1995). Sie entfernen Mikroorganismen, Partikel und beschädigte oder apoptotische Zellen aus dem Organismus.

Monozyten und Granulozyten entstehen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle. Monozyten zirkulieren im Blutkreislauf und wandern dann in Gewebe ein, wo sie zu Makrophagen differenzieren. Makrophagen sind vor allem im Bindegewebe, in der Darmwand, der Lunge, der Leber (Kupffer-Sternzellen) und der Milz lokalisiert. Neutrophile Granulozyten haben einen Anteil von 60 – 70 % an der Gesamtpopulation der Leukozyten im menschlichen Blut. Neutrophile Granulozyten sind kurzlebig (2 – 3 Tage) und sind in gesundem Gewebe nicht zu finden. Erst wenn aktivierte Makrophagen oder andere Zellen im Gewebe Chemokine ausschütten, werden neutrophile Granulozyten an den Infektionsherd gelockt.

Professionelle Phagozyten besitzen, im Gegensatz zu den nichtprofessionellen Phagozyten, zahlreiche Rezeptoren, die der Vermittlung der Phagozytose dienen. Diese Rezeptoren können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe enthält Rezeptoren, die Oberflächenmoleküle von Mikroorganismen erkennen, beispielsweise die Rezeptoren für Mannose und  $\beta$ -Glucan. Auch CD36 und CD68 werden zu dieser Rezeptorgruppe gezählt, sie dienen der Erkennung von apoptotischen Zellen. Die zweite Rezeptorgruppe enthält Rezeptoren, die opsonisierte Partikel erkennen. Hierzu gehören Rezeptoren, die IgG und die Komplementkomponenten C3b und C4b binden (Kwiatkowska & Sobota, 1999).

Komplexe Partikel wie etwa Mikroorganismen aktivieren gleichzeitig mehrere Rezeptoren, die an unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden gekoppelt sind. Diese verschiedenen Signale resultieren in der Polymerisation von Actin und führen zur Aufnahme des Partikels in die Zelle und zum Einschluss in das Phagosom. Durch die Verschmelzung des Phagosoms mit einem oder mehreren Lysosomen wird das Phagolysosom gebildet (Aderem & Underhill, 1999). Lysosomen enthalten antimikrobiell wirkende Polypeptide sowie proteolytische Enzyme und weitere Enzyme, welche die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) katalysieren. Die Bildung dieser ROS wird als oxidativer Burst bezeichnet, da der Sauerstoffverbrauch der Zelle durch diese Reaktionen um ein Vielfaches ansteigt. Die NADPH-Oxidase

wird aktiviert und katalysiert die Bildung von Superoxidanionen ( $O_2^{\bullet -}$ ) aus Sauerstoff. Das Superoxidanion wird sehr schnell durch die Superoxid-Dismutase in Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) umgewandelt. Die Myeloperoxidase katalysiert die Entstehung von hypochloriger Säure (HOCl) aus Wasserstoffperoxid und einem Chlorid-Ion (Smith, 1994; Knight, 2000). Umstritten ist, ob unter physiologischen Bedingungen, durch eine Eisen-katalysierte Reaktion, aus Wasserstoffperoxid ein Hydroxylradikal ( $HO^{\bullet}$ ) generiert wird (Nussler *et al.*, 1999). Vor allem HOCl hat stark toxische Wirkung auf Mikroorganismen. Viele Mikroorganismen können jedoch  $O_2^{\bullet -}$  und  $H_2O_2$  katalytisch entgiften. Im Phagolysosom kann zudem durch die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) die Bildung von Stickstoffmonoxid ( $NO^{\bullet}$ ) katalysiert werden. Durch die Reaktion von  $NO^{\bullet}$  mit ROS können weitere antimikrobielle Moleküle entstehen (Smith, 1994).

Kaffenberger *et al.* (1992) bestimmten, bei Patienten mit Tumoren in Mund, Rachen oder Kehlkopf, durchflusszytometrisch den oxidativen Burst der peripheren mononukleären Blutzellen (PMBZ), nach Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA). Es konnte gezeigt werden, dass Patienten, deren PMBZ keinen oxidativen Burst zeigten, eine deutlich geringere Überlebenszeit hatten, im Vergleich zu Patienten, deren PMBZ einen starken oxidativen Burst aufwiesen.

## 2.1.3 Interzelluläre Mediatoren des Immunsystems

### 2.1.3.1 Interleukin-2

IL-2 wird von aktivierten T-Zellen, zumeist  $CD4^+$ -T-Zellen, produziert. Um die Ausschüttung von IL-2 zu induzieren, ist einerseits die Bindung eines Antigens an den TZR und andererseits die Bindung eines zusätzlichen Liganden an einen weiteren Membranrezeptor notwendig. IL-2 ist ein relativ kleines Protein und wird durch ein einzelnes Gen codiert (Williams *et al.*, 1991). Der IL-2-Rezeptor (IL-2R) besteht aus den drei Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Die  $\alpha$ -Untereinheit alleine bindet IL-2 mit sehr geringer Affinität, die Verbindung der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit bildet einen Rezeptor mittlerer IL-2-Affinität. Erst die Komplexbildung der drei Untereinheiten führt zur Bildung eines IL-2-Rezeptors hoher IL-2-Affinität (Gaffen *et al.*, 1998). Naive T-Zellen exprimieren entweder keine  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette oder diese beiden Ketten nur in geringer Menge. Erst Antigenbindung und ein kostimulierendes Signal induzieren die Bildung des hoch affinen IL-2- $R\alpha\beta\gamma$ . NK-Zellen und Monozyten exprimieren, im inaktiven Zustand, geringe Mengen an  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten, so dass sie spontan auf IL-2 Stimulation reagieren können. Eine Aktivierung dieser beiden Zelltypen führt ebenfalls zur Expression des IL-2- $R\alpha\beta\gamma$  (Theze *et al.*, 1996).

Antigenbindung und ein kostimulierendes Signal führen bei einer T-Zelle sowohl zur IL-2-Ausschüttung als auch zur Expression des hoch affinen IL-2R. Die nachfolgende autokrine Interaktion von IL-2 mit seinem Rezeptor bewirkt den Eintritt der Zelle in den Zellzyklus und damit die klonale Expansion dieser T-Zelle und die Differenzierung zur T-Effektorzelle, die auch ohne kostimulierendes Signal auf Antigenbindung reagieren kann (Gaffen *et al.*, 1998). IL-2 stimuliert ebenfalls die Proliferation und Differenzierung von Monozyten. NK-Zellen reagieren auf IL-2-Stimulation mit erhöhter Proliferation und IFN- $\gamma$ -Sekretion und besitzen erhöhte zytolytische Fähigkeiten. Die Inkubation von peripheren Blutlymphozyten mit IL-2 führt zur Bildung von Lymphokin-aktivierten Killerzellen, die Tumorgewebe infiltrieren und eine hohe zytolytische Aktivität gegen Tumorzellen besitzen. Diese Zellen stammen vermutlich von NK-Zellen und auch T-Zellen ab (Brittenden *et al.*, 1996). In klinischen Studien wird

die Behandlung von Tumoren mit der Gabe von IL-2 und Lymphokin-aktivierten Killerzellen untersucht, jedoch ist die Behandlung, aufgrund der toxischen Wirkung der relativ hohen Dosen IL-2, bislang mit sehr starken Nebenwirkungen verbunden (Williams *et al.*, 1991).

### 2.1.3.2 Interleukin-10

IL-10 wird von T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen sezerniert. Humane T<sub>H</sub>2-Zellen bilden deutlich mehr IL-10 als T<sub>H</sub>1-Zellen (Huang *et al.*, 1999). Biologisch aktives IL-10 besteht aus zwei Ketten und bildet ein Homodimer. Der IL-10-Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, die zur IFN-Rezeptorfamilie gehören. Die ligandenbindende Untereinheit IL-10R1 wird in geringer Menge auf den meisten hämatopoetischen Zellen exprimiert. Auf anderen Körperzellen kann die Expression von IL-10R1 induziert werden. Die zweite Untereinheit IL-10R2 ist wichtig für die Signalübertragung und wird auf den meisten Körperzellen exprimiert. Vermutlich kann die Expression von IL-10R2 durch Aktivierungssignale nicht weiter erhöht werden. Hingegen kann die Expression von IL-10R1 durch entsprechende Signale aktiviert werden (Moore *et al.*, 2001).

Die Funktionen von IL-10 sind überwiegend als immunsuppressiv einzustufen und dienen dazu eine Entzündungsreaktion zu beenden. IL-10 hemmt die Produktion zahlreicher Zytokine (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  u. a.) sowie die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen in aktivierten Monozyten/Makrophagen. IL-10 reduziert somit proinflammatorische Mediatoren und vermindert die Antigenpräsentation der Monozyten/Makrophagen. Einerseits erhöht IL-10 die Kapazität der Monozyten/Makrophagen zur Phagozytose, aber andererseits verringert IL-10 die Bildung von Superoxidanion und Stickstoffmonoxid, so dass die Fähigkeit zur Abtötung aufgenommener Organismen reduziert wird (De Waal Malefyt & Moore, 1998). IL-10 hemmt die Zytokinsynthese und Proliferation von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und T-Zell-Klonen auf direktem Wege und aufgrund seiner hemmenden Wirkung auf antigenpräsentierende Zellen. Hingegen induziert IL-10 die Rekrutierung, die zytotoxische Aktivität und die Proliferation von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Generell kann jedoch eine Aktivierung von T-Zellen, in Gegenwart von IL-10, zur Anergie führen (Moore *et al.*, 2001). Auf NK-Zellen kann IL-10 sowohl stimulierenden als auch hemmenden Einfluss haben, abhängig von der IL-10-Konzentration, der NK-Subpopulation und der vorherigen Stimulation der NK-Zellen (De Waal Malefyt & Moore, 1998). IL-10 wird auch von Tumorzellen sezerniert und trägt so möglicherweise zur Unterdrückung der Immunreaktion auf diese Zellen bei. Andererseits konnte im Tierexperiment gezeigt werden, dass die Expression von IL-10 in Tumorzellen zu einem verringerten Tumorwachstum und zu einer geringeren Metastasierung der Tumorzellen beiträgt (Huang *et al.*, 1999). IL-10-Knockout-Mäuse entwickeln eine spontane Enterokolitis, die durch eine erhöhte Ausschüttung von IL-12 und IFN- $\gamma$  charakterisiert ist und die zeigt, dass IL-10 für die Entwicklung einer normalen Immunfunktion der Mucosa notwendig ist (Davidson *et al.*, 2000).

### 2.1.3.3 Interleukin-12

IL-12 wird hauptsächlich von phagozytischen Zellen und antigenpräsentierenden Zellen sezerniert. IL-12 ist ein p70 Heterodimer, das aus zwei kovalent verbundenen Ketten, einer schweren p40 Kette und einer leichten p35 Kette, besteht. Beide Ketten sind auf unterschiedlichen Chromosomen codiert. Nur das Heterodimer ist biologisch aktiv, allerdings wird die schwere Kette von allen IL-12 sezernierenden Zellen in einem 10- bis 100-fachen Überschuss sezerniert. Der IL-12-Rezeptor wird hauptsächlich auf aktivierten T- und NK-Zellen expri-

miert und IL-12 hat damit das Potenzial in diesen Zellen die Zytokinproduktion zu erhöhen sowie Proliferation und Zytotoxizität zu stimulieren. IL-12 hat eine wichtige Aufgabe bei der Abwehr von Infektionen, die durch intrazelluläre Pathogene ausgelöst werden. Phagozyten produzieren bei einer Infektion, innerhalb von wenigen Stunden, IL-12. Als Antwort darauf sezernieren zuerst NK-Zellen und später auch T-Zellen IFN- $\gamma$ , GM-CSF und andere Zytokine, die wiederum auf Phagozyten aktivierend wirken und zu einer positiven Verstärkung der IL-12-Produktion führen. Diese Zytokinkaskade wird in erster Linie von IL-10, IL-4, IL-13 und Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) unterbrochen. IL-12 induziert die Bildung einer T<sub>H</sub>1-Zellpopulation und hemmt die Entstehung von T<sub>H</sub>2-Zellen (Trinchieri & Gerosa, 1996). Des Weiteren ist IL-12 ein Zytokin, das bei der Bekämpfung von Tumorzellen eine wichtige Aufgabe wahrnimmt. IL-12 induziert in NK- und T-Zellen die Bildung von IFN- $\gamma$ , aber auch von TNF und anderen Zytokinen, die zytotoxisch oder zytostatisch auf Tumorzellen wirken. IL-12 aktivierte NK-Zellen zeigen eine erhöhte zytotoxische Aktivität, die zur verstärkten Abtötung von Tumorzellen und zur Beschädigung der Gefäßversorgung des Tumors führen kann (Colombo & Trinchieri, 2002).

#### 2.1.3.4 Tumornekrosefaktor- $\alpha$

TNF- $\alpha$  kommt in zwei verschiedenen Formen vor, als membranständiges TNF- $\alpha$  (pro-TNF- $\alpha$ ) und als sezerniertes TNF- $\alpha$ . Das sezernierte TNF- $\alpha$  entsteht durch proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne von pro-TNF- $\alpha$ . Sezerniertes TNF- $\alpha$  ist die aktive Form des Zytokins, die hauptsächlich die biologischen Wirkungen vermittelt. Pro-TNF- $\alpha$  zeigt geringe biologische Wirksamkeit, vermittelt jedoch zytotoxische Effekte durch Zell-Zell-Kontakte. Die Trimer-Bildung beider Formen ist vermutlich eine wichtige Voraussetzung für die biologische Aktivität (Zhang & Tracey, 1998).

TNF- $\alpha$  wird von zahlreichen Immunzellen wie Monozyten, NK-Zellen, B-Zellen, T-Zellen, Granulozyten sowie von Mastzellen und Kupffer-Sternzellen produziert. Auch Zellen außerhalb des Immunsystems sezernieren TNF- $\alpha$ , hierzu gehören Astrozyten, Nervenzellen, Granulosazellen, Fibroblasten, Osteoblasten, glatte Muskelzellen, Pigmentzellen der Retina, Epithelzellen, Keratinozyten und viele Tumorzellen (Zhang & Tracey, 1998). Die zahlreichen Effekte von TNF- $\alpha$  werden über zwei unterschiedliche Rezeptoren mit homologer Struktur, TNFR1 und TNFR2, vermittelt. Beide Rezeptortypen gehören zur TNFR-Rezeptorfamilie und binden TNF- $\alpha$  mit hoher Affinität. Sowohl TNFR1 als auch TNFR2 werden auf fast allen Zellen exprimiert, außer auf Erythrozyten. TNFR1 ist weiter verbreitet, aber TNFR2 kommt häufiger auf Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen vor. Durch proteolytische Spaltung können aus beiden Rezeptortypen lösliche TNF- $\alpha$ -Rezeptoren (sTNFR) gebildet werden, die ebenfalls TNF- $\alpha$  binden und neutralisieren.

Ursprünglich wurde TNF- $\alpha$  als Protein beschrieben, das *in vivo* zur Nekrose bestimmter Tumorzellen führt (Carswell *et al.*, 1975). TNF- $\alpha$  zeigt jedoch widersprüchliche Effekte bei der Tumorentstehung. Einerseits hat TNF- $\alpha$  zytotoxische oder zytostatische Wirkung auf Tumorzellen, andererseits kann das von Tumorzellen gebildete TNF- $\alpha$  zum Tumorwachstum und zur Tumorerweiterung beitragen (Wilson & Balkwill, 2002). Außerdem aktiviert TNF- $\alpha$  zytotoxische T-Zellen, verstärkt die Funktion der NK-Zellen und vermittelt die IL-2 induzierte Tumortoxizität. Es sind zahlreiche weitere Wirkungen dieses Zytokins bekannt, hierzu gehören beispielsweise die Auslösung von Fieber und Anorexie. In Monozyten/Makrophagen induziert TNF- $\alpha$  die Sekretion anderer Zytokine (u. a. IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)) und beeinflusst die Chemotaxis und den Metabolismus dieser Zellen (Zhang & Tracey, 1998).

### 2.1.3.5 Interferon- $\gamma$

IFN- $\gamma$  wird hauptsächlich von T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen gebildet. Das aktive Protein bildet ein Homodimer. Der Rezeptor für IFN- $\gamma$  wird auf fast allen Körperzellen exprimiert. Der Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, IFNGRI und IFNGR2, die auf unterschiedlichen Chromosomen codiert sind (Le Page *et al.*, 2000).

IFN- $\gamma$  hat eine wichtige Funktion bei der Abwehr von Virusinfektionen. Kommt es zu einer Aktivierung von NK-Zellen durch virusinfizierte Zellen, so sezernieren NK-Zellen als Antwort IFN- $\gamma$ . Die Virusreplikation kann in verschiedenen Stadien durch IFN- $\gamma$  oder andere Interferone gehemmt werden. IFN- $\gamma$  erhöht sowohl die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen als auch MHC-Klasse-II-Molekülen und verstärkt damit die Antigenpräsentation für CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (Le Page *et al.*, 2000). T<sub>H</sub>1-Zellen sezernieren IFN- $\gamma$  und andere Zytokine. IFN- $\gamma$  lenkt wiederum die Immunantwort in Richtung einer T<sub>H</sub>1-Antwort, indem es die Proliferation von T<sub>H</sub>2-Zellen hemmt (De Maeyer & De Maeyer-Guignard, 1998). IFN- $\gamma$  aktiviert außerdem Makrophagen und stimuliert deren oxidativen Burst (Le Page *et al.*, 2000). IFN- $\gamma$  hat zudem eine Bedeutung bei der Regulierung der Immunantwort auf Tumorzellen. Ohne die Fähigkeit auf IFN- $\gamma$  zu reagieren entwickelten Tiere, die mit einem Karzinogen behandelt wurden, deutlich mehr Tumoren. Die Bedeutung von IFN- $\gamma$ , bei der Tumorbekämpfung, beruht einerseits auf der Fähigkeit die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen und anderen antigenpräsentierenden Komponenten auch in Tumorzellen zu erhöhen und damit die Erkennung von Tumorzellen durch CTL zu fördern. Andererseits induziert IFN- $\gamma$  die Bildung von Chemokinen, die zur Hemmung der Tumorigenese beitragen. Außerdem ist IFN- $\gamma$  vermutlich an der Rekrutierung von T-Zellen in Tumorgewebe beteiligt und hemmt die Bildung von immunsuppressiven Faktoren wie etwa TGF- $\beta$  und PGE<sub>2</sub> (Beatty & Paterson, 2001). Des Weiteren verlangsamt IFN- $\gamma$ , durch Verlängerung des Zellzyklus, die Proliferation von normalen Zellen und von Tumorzellen (De Maeyer & De Maeyer-Guignard, 1998).

### 2.1.3.6 Transforming Growth Factor- $\beta$

Fast alle Körperzellen können TGF- $\beta$  freisetzen und besitzen auch TGF- $\beta$ -Rezeptoren, um auf diesen Wachstumsfaktor zu reagieren. Im Darm wird TGF- $\beta$  vor allem von den ausdifferenzierten Epithelzellen in den Darmzotten synthetisiert (Markowitz & Roberts, 1996). TGF- $\beta$  wird in Säugerzellen in den drei Isoformen  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 3 gebildet. Diese Isoformen sind durch unterschiedliche Gene codiert und werden unterschiedlich reguliert. TGF- $\beta$ 1 ist innerhalb des Immunsystems die vorherrschende Isoform. TGF- $\beta$  wird als inaktiver Komplex sezerniert, der aus dem reifen TGF- $\beta$ -Homodimer und dem größeren Protein LAP (latent-associated peptide) besteht. Thrombozyten synthetisieren noch ein weiteres Protein LTBP (latent TGF- $\beta$  binding protein), das sich zusätzlich an den inaktiven Komplex lagert. Damit latentes TGF- $\beta$  an seinen Rezeptor binden kann, muss eine Aktivierung stattfinden. Ein bekannter Mechanismus ist die Abspaltung von LAP und auch LTBP durch Proteasen (Derynck & Choy, 1998). Es sind drei TGF- $\beta$ -Rezeptortypen bekannt: Typ I, II und III. Ein Heterodimer aus Typ I und Typ II vermittelt die Signalübertragung. Rezeptortyp III ist der häufigste Rezeptortyp und bindet TGF- $\beta$  an der Zelloberfläche, um dieses dann dem signalübertragenden Rezeptor I/II zu präsentieren. Rezeptortyp III kann auch als löslicher Rezeptor TGF- $\beta$  binden und deaktivieren (Gold, 1999).

TGF- $\beta$  besitzt immunmodulatorische Fähigkeiten, kann die Differenzierung von Immunzellen beeinflussen und wirkt überwiegend immunsuppressiv. Der Einfluss von TGF- $\beta$  auf Immunzellen variiert generell in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades der Immunzellen sowie der Anwesenheit anderer Zytokine und der vorhandenen TGF- $\beta$ -Konzentration. T-Zellen werden stark von TGF- $\beta$  beeinflusst, beispielsweise hemmt TGF- $\beta$  die Zytokinsynthese aktivierter T-Zellen. Auch die Bildung von CTL, NK-Zellen und Lymphokin-aktivierten Killerzellen wird durch TGF- $\beta$  gehemmt. Andererseits verstärkt TGF- $\beta$  das Wachstum unreifer Lymphozyten und hemmt die Apoptose von T-Zellen. In einer frühen Differenzierungsphase induziert TGF- $\beta$  die Entwicklung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, in einer späteren Phase unterdrückt TGF- $\beta$  die Bildung von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. TGF- $\beta$  lenkt die Differenzierung von B-Zellen, kann deren Apoptose induzieren, den Isotypwechsel beeinflussen und ihre Proliferation hemmen. Auf Monozyten/Makrophagen übt TGF- $\beta$  wiederum ambivalente Einflüsse aus, einerseits unterstützt TGF- $\beta$  die Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen und die Sekretion von Entzündungsmediatoren, andererseits hemmt TGF- $\beta$  ihren oxidativen Burst und ihre Zytokinsekretion (Derynck & Choy, 1998).

TGF- $\beta$  kann, in Abhängigkeit vom Zelltyp, sowohl mitogene als auch antiproliferative Wirkungen ausüben. Vor allem auf Zellen mesenchymalen Ursprungs hat TGF- $\beta$  mitogene Wirkung, die über unterschiedliche molekulare Mechanismen vermittelt wird. In epithelialen Zellen führt TGF- $\beta$  zur Arretierung des Zellzyklus in der späten G1-Phase, in dem es über verschiedene Mechanismen die Phosphorylierung des Retinoblastom-Suppressorproteins verhindert (Alevizopoulos & Mermod, 1997). Tumorzellen zeichnen sich häufig durch eine geringere Empfindlichkeit für TGF- $\beta$  und durch eine Überproduktion von TGF- $\beta$  aus (Derynck & Choy, 1998). Auch Darmtumorzellen zeigen oft eine erhöhte Expression von TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  übt auf die meisten Darmtumorzellen proliferative Effekte aus, im Gegensatz zur antiproliferativen Wirkung auf unveränderte Epithelzellen (Gold, 1999). Häufig lässt sich in Darmtumorzellen auch der Verlust des TGF- $\beta$ -Rezeptors Typ II nachweisen, so dass diese Zellen nicht mehr auf TGF- $\beta$  reagieren können (Markowitz & Roberts, 1996).

### 2.1.3.7 Prostaglandin E<sub>2</sub>

Prostaglandine gehören zur Gruppe der Eikosanoide, die aus Arachidonsäure gebildet werden. Die Arachidonsäure wird durch das Enzym Phospholipase A<sub>2</sub> aus Membranlipiden freigesetzt und durch die Cyclooxygenase (COX) in Prostaglandin H<sub>2</sub> enzymatisch umgewandelt. Schließlich bilden zellspezifische Prostaglandinsynthasen die verschiedenen Prostaglandine, darunter auch PGE<sub>2</sub>.

PGE<sub>2</sub> wird von vielen Körperzellen gebildet, einschließlich Fibroblasten und Makrophagen (Harris *et al.*, 2002). Es sind zwei Isozyme der Cyclooxygenase, COX-1 und COX-2, bekannt. Beide Isozyme besitzen eine sehr ähnliche Struktur und einen ähnlichen Wirkungsmechanismus. COX-1 wird konstitutiv in den meisten Geweben exprimiert, hingegen kann die Expression von COX-2 durch unterschiedliche Faktoren induziert werden. COX-1 ist für die Bildung von Prostaglandinen zur Regulation der normalen physiologischen Funktionen verantwortlich, indessen hat COX-2 eine Bedeutung bei Entzündungsreaktionen, Regulierung des Zellwachstums, Angiogenese und Apoptose (Peleg & Wilcox, 2002). PGE<sub>2</sub> bindet an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor EP. Man kennt vier Subtypen dieses Rezeptors (EP1-4), die an unterschiedliche Second messenger gekoppelt sind (Harris *et al.*, 2002). Das Rezeptorvorkommen wurde hauptsächlich in der Maus untersucht. EP3 und EP4-Rezeptoren sind in der

Maus weit verbreitet und werden auf den meisten Körperzellen exprimiert, hingegen werden EP1 und EP2 gewebespezifisch exprimiert (Narumiya *et al.*, 1999).

PGE<sub>2</sub> hat zahlreiche immunmodulatorische Wirkungen. So hemmt PGE<sub>2</sub> die Proliferation von T-Zellen, insbesondere von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und beeinflusst die Apoptose von T-Zellen in Abhängigkeit ihres Reifungszustandes und dem Grad ihrer Aktivierung. PGE<sub>2</sub> induziert die Apoptose unreifer T-Zellen, hemmt jedoch die Apoptose aktivierter T-Zellen. PGE<sub>2</sub> erhöht die Zytokinsekretion von T<sub>H</sub>2-Zellen, vermindert hingegen die Zytokinsekretion von T<sub>H</sub>1-Zellen. PGE<sub>2</sub> unterstützt also eine Immunantwort in Richtung einer T<sub>H</sub>2-Antwort. PGE<sub>2</sub> hemmt die Proliferation und induziert die Apoptose nur in unreifen B-Zellen, nicht jedoch in reifen B-Zellen. In B-Zellen verstärkt PGE<sub>2</sub> außerdem den Ig-Isotypwechsel in Richtung IgG1 und IgE (Harris *et al.*, 2002).

Prostaglandine beeinflussen möglicherweise das Wachstum von Darmtumoren und anderen Krebsarten. In menschlichem Darmtumorgewebe wurden erhöhte PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen, im Vergleich zu umliegendem, unveränderten Gewebe, festgestellt (Bennett & Tacca, 1975; Narisawa *et al.*, 1990; Rigas *et al.*, 1993; Pugh & Thomas, 1994). Ebenfalls wurde eine erhöhte Expression der COX-2, nicht aber der COX-1, in menschlichem Darmtumorgewebe im Vergleich mit umgebendem, unveränderten Gewebe, gefunden (Sano *et al.*, 1995; Eberhart *et al.*, 1994). Epidemiologische Studien haben einen positiven Zusammenhang zwischen der regelmäßigen Einnahme von Acetylsalicylsäure und einem verringerten Risiko einer Darmkrebserkrankung gezeigt (Thun *et al.*, 1993; Suh *et al.*, 1993). Acetylsalicylsäure ist ein nichtsteroidales Antiphlogistikum, das durch Modifizierung von COX-1 und COX-2 die Synthese von Prostaglandinen hemmt. Ob dieser Wirkungsmechanismus an der Tumorbekämpfung beteiligt ist oder ob andere Effekte von Aspirin dafür verantwortlich sind, ist bislang nicht geklärt (Levy, 1997).

### 2.1.3.8 Sekretorisches Immunglobulin A

Immunglobuline sind die sezernierte Form des B-Zell-Rezeptors. Sie bestehen aus insgesamt vier Polypeptidketten: aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten. Man unterscheidet, aufgrund der Struktur ihrer schweren Kette, fünf Isotypen: IgA, IgD, IgE, IgM und IgG. Die einzelnen Isotypen sind unterschiedlich im Körper verteilt und besitzen verschiedene Effektorfunktionen. Humanes IgA kommt in zwei Subtypen, IgA1 und IgA2, vor. Generell haben Immunglobuline folgende Funktionen: Bindung und Neutralisierung von Antigenen, Komplementaktivierung, Opsonisierung von Antigenen (und damit Aktivierung von Phagozyten) sowie Aktivierung von NK-Zellen zur antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (Alam, 1998). Als erstes Immunglobulin wird IgM gebildet, da es ohne Klassenwechsel exprimiert werden kann. IgG ist der Isotyp, der am häufigsten im Plasma zu finden ist. Hingegen findet man in Sekreten des Darmes und der Atemwege, in Muttermilch, Tränenflüssigkeit und Speichel vor allem IgA. Die Zytokine TGF- $\beta$ , IL-2 und IL-5 induzieren in B-Zellen den Isotypwechsel, so dass diese Zellen IgA sezernieren (Brandtzaeg, 1996).

Im Serum ist eine geringe Menge monomeres IgA vorhanden (Macpherson *et al.*, 2001). Der überwiegende Anteil von IgA wird jedoch von Plasmazellen in der Lamina propria als Dimer sezerniert, wobei die beiden Moleküle über die J-Kette kovalent gebunden sind. Das dimere IgA-Molekül wird vom Poly-Ig-Rezeptor an der basolateralen Oberfläche der darüber liegenden Epithelzelle gebunden und über Transzytose zur apikalen Oberfläche der Epithelzelle transportiert. Hier wird der Poly-Ig-Rezeptor enzymatisch gespalten, dabei bleibt der extrazelluläre Teil des Rezeptors (die sekretorische Komponente) an das dimere IgA gebun-

den und dieser gesamte Komplex, das sekretorische IgA (SIgA), wird in das Lumen freigesetzt. Die sekretorische Komponente schützt SIgA vor einer proteolytischen Spaltung (Brandtzaeg, 1996).

Die Hauptaufgabe von SIgA besteht darin, zusammen mit anderen Faktoren der nichtadaptiven Immunität (wie Muzine, Lysozym, Magensaft und Darmperistaltik), das Anhaften und damit auch das Eindringen in die Darmwand, von Mikroorganismen und Toxinen zu verhindern. Da die Bindung von SIgA an ein Antigen nicht zu einer Komplementaktivierung führt, resultiert dieser Vorgang nicht in einer Entzündungsreaktion (Brandtzaeg, 1996). SIgA ist zudem an der intrazellulären Neutralisierung von Antigenen beteiligt. Auf dem Weg durch die Epithelzelle kann SIgA bereits in die Epithelzelle eingedrungene Viren binden und damit neutralisieren. Dimeres IgA kann schon in der Lamina propria Antigene binden und über die Epithelzellen in das Lumen ausschleusen (Mazanec *et al.*, 1993).

Neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie Monozyten/Makrophagen exprimieren den SIgA-Rezeptor Fc alpha RI (CD89). In diesen Zellen kann SIgA die Phagozytoseaktivität, den oxidativen Burst sowie die Zytokinsekretion verstärken. Verschiedene Zytokine (z. B. IL-8 und TNF- $\alpha$ ) können wiederum die Expression von CD89, zumeist in verstärkender Weise, beeinflussen (Morton & Brandtzaeg, 2001).

## 2.2 Darmkrebs

Darmkrebs ist in Deutschland bei Frauen die zweithäufigste Krebsneuerkrankung und bei Männern die dritthäufigste. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen wird bei Frauen auf nahezu 30.000 und bei Männern auf über 27.000 geschätzt. Sowohl für Frauen als auch für Männer ist Darmkrebs die zweithäufigste Krebstodesursache. Im Mittel erkranken Frauen im Alter von 72 Jahren und Männer mit 67 Jahren. Die Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland (Frauen und Männer) ist, im Vergleich mit den Erkrankungsraten anderer Länder der Europäischen Union, am höchsten. Die niedrigsten Erkrankungsraten findet man in Griechenland, Finnland und Spanien (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002).

Basierend auf den Daten des World Cancer Research Fund (1997) schätzt das Deutsche Institut für Ernährungsforschung, dass durch veränderte Ernährungsgewohnheiten 66-75 % der Darmkrebsneuerkrankungen verhindert werden könnten. Ein erhöhter Gemüseverzehr, ein verringerter Fleisch- und Alkoholkonsum, aber auch eine Erhöhung der körperlichen Aktivität verringern das Erkrankungsrisiko für Darmkrebs (Deutsches Institut für Ernährungsforschung, 1999). Die Auswertung epidemiologischer Studien hat Übergewicht, den Verzehr von rotem Fleisch (stark gebraten) und eine geringe körperliche Aktivität, als Faktoren für ein erhöhtes Risiko an Darmkrebs zu erkranken, identifiziert (Giovannucci, 2002).

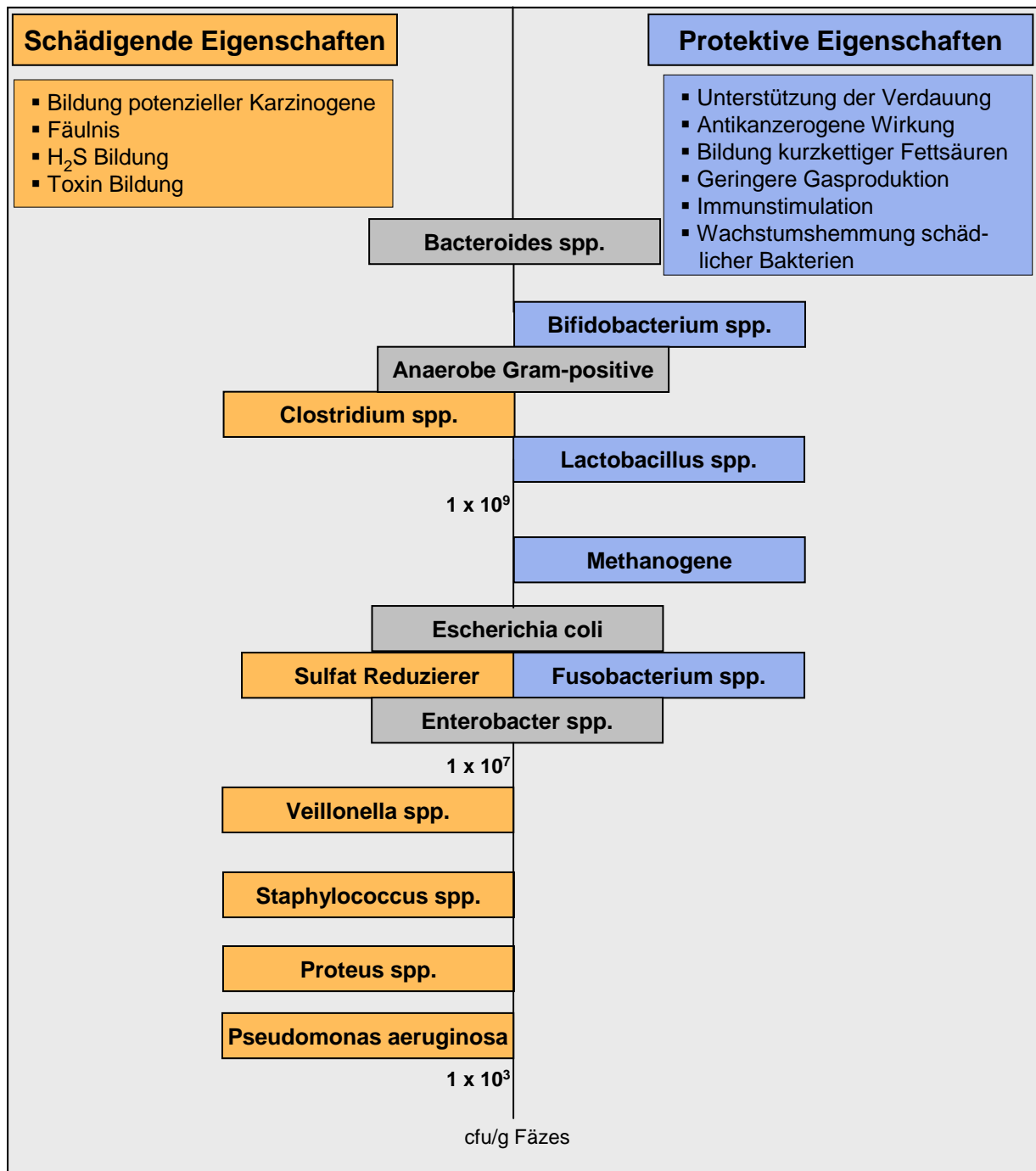
Für die molekularen Mechanismen der Colonkarzinogenese wurden unterschiedliche Modelle entwickelt. Das 1990 von Fearon & Vogelstein vorgestellte Modell wurde zwischenzeitlich ergänzt, besitzt jedoch noch immer Gültigkeit (Arends, 2000; Ilyas & Tomlinson, 1996; Calvert & Frucht, 2002). Darmkrebs entsteht als Folge mehrerer somatischen Mutationen einer Epithelzelle, in einem mehrstufigen Prozess, der sich über Jahre hinziehen kann. Die mutierten Gene gehören zu drei verschiedenen Gengruppen: Onkogene, Tumor-Suppressorgene und DNA-Reparaturenzym-Gene. Mutationen innerhalb dieser Gengruppen führen zu einem selektiven Wachstumsvorteil einer Zelle. Die Akkumulation weiterer Mutationen



resultiert in einer ungehemmten Proliferation dieser Zellklone und schließlich in der Bildung eines Tumors (Fearon & Vogelstein, 1990; Calvert & Frucht, 2002).

## 2.3 Probiotika

Die menschliche Darmflora besteht aus ungefähr 400 verschiedenen Bakterienspezies mit insgesamt über  $1 \times 10^{14}$  Keimen. Der Dünndarm ist nur von wenigen Bakterien besiedelt, hingegen ist der Dickdarm dicht besiedelt mit verschiedenen Mikroorganismen (Fuller, 1989). In der Darmflora finden sich überwiegend anaerobe Bakterien, dagegen sind Spezies der aeroben (bzw. fakultativ anaeroben) Gattungen in deutlich geringerer Zahl vorhanden. Die Bakterien der Darmflora können stark vereinfacht in zwei Kategorien eingeteilt werden: in Bakterien mit potenziell schädigenden Eigenschaften und in Bakterien mit potenziell protektiven Eigenschaften für den Wirtsorganismus (Abb. 2.1).



**Abb. 2.1:** Übersicht über die im menschlichen Darm vorherrschenden Bakterienarten. Die Bakterien sind unterschieden nach potenziell schädigenden   oder protektiven Eigenschaften für den   Wirtsorganismus bzw. Gattungen mit beiden Eigenschaften  . Vorkommen der jeweiligen Gattungen in colony-forming units (cfu) pro g Fäzes (nach Salminen *et al.*, 1998).

Es gibt eine große Variationsbreite der vorherrschenden Gattungen in der Darmflora des Einzelnen. Das Spektrum der intestinalen Mikroflora kann sich beispielsweise aufgrund von akutem Durchfall, Antibiotika-Behandlung, oder im geringen Umfang, durch eine Änderung der Ernährungsgewohnheiten ändern. Gewöhnlich bleibt jedoch die Zusammensetzung der individuellen Darmflora konstant.

Die Darmflora hat wichtige metabolische, trophische und schützende Funktionen. Kohlenhydrate und Proteine, die im Dünndarm nicht abgebaut wurden, werden von Darmbakterien u. a. zu kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) abgebaut, welche wiederum resorbiert werden können und

der Energiegewinnung dienen. SCFA, insbesondere Butyrat, haben trophische Wirkung auf Darmepithelzellen und beeinflussen deren Proliferation und Differenzierung. Intestinale Mikroorganismen haben außerdem eine Bedeutung bei der Vitaminsynthese und der Resorption von Mineralien. Für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des intakten darmassoziierten Immunsystems sind Wechselwirkungen zwischen Darmbakterien und Immunzellen notwendig. Kommensale Darmbakterien können eine Barriere für pathogene Mikroorganismen bilden (Kolonisationsresistenz). Sie können das Anheften und Eindringen pathogener Bakterien verhindern und durch Bildung von Bakteriozinen deren Wachstum hemmen. Bei der Entstehung von Darmkrebs sind intestinale Bakterien ebenfalls von Bedeutung. In Abhängigkeit von ihrer Spezieszugehörigkeit und ihrer Enzymaktivität können sie zur Bildung von kanzerogenen und mutagenen Substanzen beitragen oder aber auch schädliche Substanzen entgiften (Guarner & Malagelade, 2003).

Fuller (1989) definierte Probiotika als lebende Mikroorganismen, die Nahrungsmitteln zugesetzt werden und den Wirtsorganismus durch Unterstützung seines intestinalen, mikrobiologischen Gleichgewichts positiv beeinflussen. In Deutschland erarbeitete das Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) folgende Begriffsbestimmung: Probiotika sind definierte lebende Mikroorganismen, die in ausreichender Menge in aktiver Form in den Darm gelangen und hierbei positive gesundheitliche Wirkungen erzielen (BgVV, 1999). Dunne *et al.* (1999) haben weitere Forderungen formuliert, die Mikroorganismen erfüllen sollten, um sie als Probiotika in Betracht ziehen zu können. Probiotische Mikroorganismen sollten über folgende Eigenschaften verfügen:

- Herkunft aus dem menschlichen Dickdarm
- erwiesenermaßen ohne pathogene Eigenschaften
- die Fähigkeit Herstellungsverfahren zu tolerieren (so dass lebende und aktive Organismen im Produkt vorhanden sind)
- Resistenz gegenüber Magen- und Gallensäuren
- die Fähigkeit zur Adhäsion an Epithelzellen der Darmwand
- die Fähigkeit zur Ansiedlung im Darm (zumindest für kurze Zeit)
- die Produktion antimikrobieller Substanzen
- die Fähigkeit zur Stimulierung des Immunsystems
- die Fähigkeit metabolische Aktivitäten zu beeinflussen (z. B. Cholesterinstoffwechsel, Laktaseaktivität, Vitaminbildung)

Allerdings ist anzunehmen, dass ein Mikroorganismus nicht über alle Eigenschaften gleichzeitig verfügen kann.

Bislang werden vor allem verschiedene Stämme aus den Gattungen *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* sowie *Saccharomyces boulardii* als Probiotika eingesetzt. Inwieweit die einzelnen Stämme den oben genannten Anforderungen tatsächlich genügen ist bei weitem nicht ausreichend untersucht. Da sich Bakterienstämme in ihren Eigenschaften wie Stabilität, Enzymaktivität, Resistenz gegenüber Magen- und Gallensäuren unterscheiden können, ist es notwendig jeden einzelnen Stamm zu charakterisieren und seine positiven Wirkungen für den Menschen nachzuweisen. Untersuchungsergebnisse eines Bakterienstammes lassen sich nicht auf andere Stämme übertragen (Sanders, 2000).

## 2.3.1 Auswirkungen von Probiotika auf die Gesundheit

Im Folgenden eine Auswahl bislang veröffentlichter Studien, die den gegenwärtigen Stand der Forschung wiedergeben.

### 2.3.1.1 Einfluss von Probiotika auf das Immunsystem

*In vitro* beeinflussten unterschiedliche, hitzeinaktivierte Milchsäurebakterien die Zytokinsekretion und die Proliferation humaner Lymphozyten. Unterschiedliche Bifidobakterien stimulierten in einer Makrophagen-Zelllinie (RAW 264.7) die Sekretion von TNF- $\alpha$  und IL-6. Diese Stämme konnten jedoch in einer T<sub>H</sub>-Zelllinie (EL-4.IL-2) ohne zusätzliche Stimulation die Sekretion von IL-2 oder IL-5 nicht beeinflussen (Marin *et al.*, 1997). In einer späteren Studie beeinflussten unterschiedliche Stämme von *Streptococcus thermophilus* die Zytokinsekretion der beiden Zelllinien in ähnlicher Weise (Marin *et al.*, 1998). Die Zytokinsekretion (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10) humaner PMBZ wurde durch Lactobacillen und Bifidobakterien teilweise stärker stimuliert als durch Lipopolysaccharid (LPS) (Miettinen *et al.*, 1996). Hessele *et al.* (1999) zeigten, dass Laktobacillen auch die IL-12-Sekretion humaner PMBZ beeinflussen können. *L. johnsii* und *L. sakei* stimulierten die Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-12. Zudem induzierten *L. johnsii* und *L. sakei* die Proliferation unstimulierter Blutlymphozyten und die Expression der Aktivierungs-Antigene CD69 und CD25 auf NK-Zellen (Haller *et al.*, 2000). Hingegen hemmten *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *S. thermophilus* und *B. lactis* die Proliferation stimulierter PMBZ (Pessi *et al.*, 1999).

Im **Tierversuch** bewirkten bestimmte Milchsäurebakterien eine Modulation des Immunsystems. Im Folgenden sind ausschließlich Studien berücksichtigt, in denen Milchsäurebakterien oral verabreicht wurden. Die Gabe von *S. boulardii* führte bei Ratten zu einer deutlich höheren Konzentration von SIgA im Darm (Buts *et al.*, 1990). Die nachfolgend erwähnten Studien wurden alle an Mäusen durchgeführt. Die Aufnahme von Milchsäurebakterien erhöhte die Bildung spezifischer Antikörper für Cholera toxin (Tejada-Simon *et al.*, 1999a; Gill *et al.*, 2000; Gill & Rutherford, 2001b) und für Rotaviren (Yasui *et al.*, 1999).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Milchsäurebakterien die Zytokinbildung oder -sekretion modulieren können. So führte die Verabreichung von *L. rhamnosus* oder *L. acidophilus* zu einer höheren Sekretion von IFN- $\gamma$  durch Milzzellen. Die Sekretion von IL-4 blieb jedoch unbeeinflusst (Gill *et al.*, 2000). *L. brevis* und *L. reuteri* erhöhten die Zahl Zytokin-produzierender Zellen (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) in den Mikrovilli des Darmes (Maassen *et al.*, 2000). Tejada-Simon *et al.* (1999b) untersuchten die Auswirkungen unterschiedlicher Milchsäurebakterien auf die Genexpression verschiedener Zytokine in den Immunzellen von Peyerschen Plaques, Milz und mesenterialen Lymphknoten. Hier zeigten sich keine Effekte durch die Verabreichung der Milchsäurebakterien.

Als weitere Immunparameter wurden in verschiedenen Studien die Proliferation von Immunzellen, Phagozytoseaktivität und der Anteil bestimmter T-Zellsubpopulationen untersucht. Milchsäurebakterien erhöhten die *ex vivo* Proliferation von Immunzellen der Peyerschen Plaques und der Milz (Takahashi *et al.*, 1993; Kirjavainen *et al.*, 1999; Gill *et al.*, 2000). Eine Stimulation der Phagozytoseaktivität der Leukozyten im Blut durch die Aufnahme von Milchsäurebakterien wurde gezeigt (Gill *et al.*, 2000; Gill & Rutherford, 2001b). Die Gabe von Joghurt, mit verschiedenen Milchsäurebakterien angereichert, führte nur zu unwesentlichen Änderungen des Anteils der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Milz und in den Peyerschen Plaques (Pestka *et al.*, 2001). Gill *et al.* (2000) zeigten ebenfalls, dass die Aufnahme von Milchsäurebakterien nicht zu einer Änderung der T-Zellsubpopulationen im Blut führte, jedoch stimulierte in dieser Studie *L. rhamnosus* die Aktivität der NK-Zellen der Milz.

In **Humanstudien** führte der Verzehr von Milchsäurebakterien zu einer Erhöhung der SIgA-Konzentration in den Fäzes (Fukushima *et al.*, 1998) sowie zu einem Anstieg des IgA-Spiegels im Serum (Link-Amster *et al.*, 1994). Kaila *et al.* (1992) wiesen eine Zunahme der Ig produzierenden Zellen im Blut nach. In den drei genannten Studien war ebenfalls die Konzentration spezifischer IgA (gegen Polioviren, *Salmonella* oder Rotaviren) durch die Intervention mit Milchsäurebakterien erhöht. Im Gegensatz dazu hatte die Aufnahme von Milchsäurebakterien in weiteren Studien keine Wirkung auf die Ig-Konzentration (Wheeler *et al.*, 1997; Spanhaak *et al.*, 1998; van de Water *et al.*, 1999; Pessi *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 2000).

Zum Teil beeinflusste der Verzehr von Milchsäurebakterien die Zytokinsekretion der PMBZ. Der Verzehr von *B. lactis* erhöhte *ex vivo* die Sekretion von IFN- $\alpha$  (Arunachalam *et al.*, 2000). Die Aufnahme von *L. brevis* erhöhte dosisabhängig ebenfalls die Bildung von IFN- $\alpha$  *ex vivo* (Kishi *et al.*, 1996). Weitere Studien konnten jedoch keinen Einfluss von Milchsäurebakterien auf die Zytokinsekretion (IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) *ex vivo* feststellen (Wheeler *et al.*, 1997; Spanhaak *et al.*, 1998; van de Water *et al.*, 1999; Campbell *et al.*, 2000).

Campbell *et al.* (2000) untersuchten außerdem den Einfluss des Verzehrs von Joghurt auf die Proliferation der PMBZ. Hierbei zeigte sich kein Zusammenhang zwischen Proliferation und der Intervention mit Joghurt.

Die Arbeitsgruppe von Gill analysierte in mehreren Studien den Zusammenhang zwischen einer Aufnahme von *B. lactis* oder *L. rhamnosus* und der Phagozytoseaktivität der PMBZ sowie der Aktivität der NK-Zellen *ex vivo*. Beide Mikroorganismen konnten in diesen Studien sowohl die Phagozytoseaktivität als auch die Aktivität der NK-Zellen stimulieren (Arunachalam *et al.*, 2000; Chiang *et al.*, 2000; Gill *et al.*, 2001c; Gill *et al.*, 2001a; Gill & Rutherford, 2001a; Sheih *et al.*, 2001). Der Verzehr fermentierter Milch, angereichert mit *L. johnsonii* oder *B. bifidum*, erhöhte ebenfalls die Phagozytoseaktivität (Schiffrin *et al.*, 1995). In den meisten dieser Studien wurden jedoch keine Kontrollgruppen einbezogen. Im Gegensatz dazu beeinflusste in einer placebokontrollierten Studie die Aufnahme von *L. casei* Shirota die Phagozytoseaktivität der PMBZ nicht (Spanhaak *et al.*, 1998). In dieser Untersuchung wurden eine Reihe weiterer Immunparameter bestimmt, die ebenfalls durch die Intervention nicht modifiziert wurden. Wheeler *et al.* (1997) untersuchten die Auswirkungen des Verzehrs von Joghurt mit aktiven *L. bulgaricus* und *S. thermophilus* auf mehrere Immunparameter und konnten ebenfalls keine Änderungen feststellen.

Die bisherigen Untersuchungen belegen, dass die orale Aufnahme von Probiotika das darmsoziierte Immunsystem und auch das systemische Immunsystem des Menschen beeinflussen kann. Die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse haben möglicherweise ihre Ursache in den Unterschieden der untersuchten Probandengruppen, den verwendeten Bakterienstämmen und der jeweils verabreichten Dosis.

### 2.3.1.2 Einfluss von Probiotika auf die Karzinogenese

*In vitro* (Ames-Test) verminderten unterschiedliche Milchsäurebakterien die Mutagenität verschiedener Kanzerogene (Bodana & Rao, 1990; Pool-Zobel *et al.*, 1993). Dies resultiert möglicherweise aus der Bindung kanzerogener Substanzen durch Milchsäurebakterien, die ebenfalls *in vitro* gezeigt wurde (Morotomi & Mutai, 1986; Zhang & Ohta, 1991; Orrhage *et al.*, 1994).

Um eine mögliche Prävention von Darmkrebs zu untersuchen, wurden in **Tierstudien** die Tiere (zumeist Ratten) mit unterschiedlichen Milchsäurebakterien gefüttert und mit einem Darmkanzerogen wie Azoxymethan (AOM) oder 1,2-Dimethylhydrazin (DMH) behandelt.

Anschließend wurde die Anzahl der aberranten Krypten bzw. der Darmtumoren untersucht. Stämme von *L. acidophilus* reduzierten signifikant die Zahl der Darmtumoren bzw. aberranten Krypten, bei oraler Aufnahme. *L. acidophilus* wurde in diesen Studien bereits vor der Behandlung mit dem Kanzerogen verabreicht (Arimochi *et al.*, 1997; McIntosh *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 1999). In einer Studie von Goldin *et al.* (1996) verminderte der Zusatz von LGG sowohl in einer fettreichen als auch einer fettarmen Diät die Zahl der Darmtumoren. Dieser positive Effekt wurde nur bei einer Fütterung von LGG vor Beginn der Behandlung mit DMH gesehen, nicht jedoch wenn die Fütterung nach der DMH-Behandlung einsetzte. Eine Fütterung von *B. longum* BB536, vor der Behandlung mit dem Kanzerogen, verminderte ebenfalls in mehreren Studien die Zahl der aberranten Krypten sowie die Zahl der Tumoren (Kulkarni & Reddy, 1994; Challa *et al.*, 1997; Sekine *et al.*, 1997). Die Fütterung mit *L. acidophilus* war, im Vergleich mit der Fütterung mit *B. adolescentis* (Arimochi *et al.*, 1997), LGG oder *S. thermophilus* (McIntosh *et al.*, 1999) in der Tumorphävention deutlich wirksamer. Abdelali *et al.* (1995) verglichen den Einfluss fettarmer Milch, fermentierter fettarmer Milch (mit aktiven *Bifidobacterium* sp Bio) und einer Wassersuspension mit aktiven B. sp Bio auf die Zahl der aberranten Krypten. Hierbei zeigte sich, dass die Aufnahme der Bakteriensuspension am effektivsten die Zahl der aberranten Krypten verringerte (61 %). Die Aufnahme fermentierter Milch verringerte die Zahl der aberranten Krypten um 51 %, aber auch fettarme Milch alleine führte zu einer Reduktion um 49 %.

In **Humanstudien** können nur Mechanismen, die indirekt im Zusammenhang mit der Karzinogenese stehen, untersucht werden. Bestimmte bakterielle Enzyme im Darm können zur Bildung kanzerogener und mutagener Substanzen beitragen. Zu diesen Enzymen gehören  $\beta$ -Glucuronidase,  $\beta$ -Glucosidase, Azoreduktase und Nitroreduktase (Salminen *et al.*, 1998). Lactobacillen und Bifidobakterien haben eine geringere Aktivität dieser Enzyme, im Vergleich zu anderen Darmbakterien. Verschiedene Studien haben den Einfluss von Milchsäurebakterien auf die bakterielle Enzymaktivität in den Fäzes untersucht. So reduzierte die Aufnahme von *L. acidophilus* die Aktivität der bakteriellen  $\beta$ -Glucuronidase, Nitroreduktase und Azoreduktase in den Fäzes. Nach der Intervention erreichte die Enzymaktivität wieder den Ausgangswert (Goldin & Gorbach, 1984). Der Verzehr von *B. longum* oder LGG reduzierte die Aktivität der bakteriellen  $\beta$ -Glucuronidase (Goldin *et al.*, 1992; Benno & Mitsuoka, 1992). Hingegen führte die Aufnahme fermentierter Milch, die *L. acidophilus*, *B. bifidum*, *S. lactis* und *S. cremoris* enthielt, nicht zu einer Aktivitätsänderung der  $\beta$ -Glucuronidase und Azoreduktase in den Fäzes. Indessen war die Aktivität der Nitroreduktase verringert und die Aktivität der  $\beta$ -Glucosidase erhöht (Marteau *et al.*, 1990).

Hayatsu & Hayatsu (1993) zeigten, dass eine 3-wöchige Aufnahme von *L. casei* zu einer deutlichen Reduktion der Mutagenität des Urins, nach einer Fleischmahlzeit, führte. Glinghammar *et al.* (1997) untersuchten die Zytotoxizität und die Genotoxizität von Fäzeswasser bei Probanden mit einem hohen täglichen Verzehr von Molkereiprodukten. Nach dem Wechsel zu einer Diät ohne Molkereiprodukte erhöhte sich die Zytotoxizität des Fäzeswassers, die Genotoxizität blieb unverändert.

Die Ergebnisse epidemiologischer Studien sind nicht eindeutig. Verschiedene Untersuchungen konnten keinen Zusammenhang zwischen der Aufnahme fermentierter Milch und einem verringerten Darmkrebsrisiko feststellen (Kampman *et al.*, 1994a; Kampman *et al.*, 1994b; Kearney *et al.*, 1996). Zwei weitere Studien zeigten jedoch, dass der Verzehr von Joghurt invers mit dem Risiko an Darmkrebs zu erkranken korreliert (Peters *et al.*, 1992; Boutron *et al.*, 1996).

Vor allem die Ergebnisse aus den Tierstudien geben Hinweise darauf, dass die Aufnahme von Probiotika das Risiko an Darmkrebs zu erkranken senken könnte.

## 2.4 Präbiotika

Gibson & Roberfroid (1995) definierten Präbiotika als unverdauliche Nahrungsbestandteile, die durch selektive Förderung des Wachstums und/oder der Aktivität einzelner oder einer begrenzten Zahl von Darmbakterienstämmen, positive Wirkungen für die Gesundheit erzielen. Nach Gibson & Roberfroid (1995) sollte ein Präbiotikum folgenden Anforderungen entsprechen:

- es sollte im Dünndarm weder hydrolysiert noch absorbiert werden
- es sollte lediglich einzelnen oder einer begrenzten Zahl kommensaler Darmbakterienstämmen als Substrat dienen und deren Wachstum oder metabolische Aktivität stimulieren
- es sollte eine gesündere Zusammensetzung der Darmflora fördern
- es sollte im Darmlumen oder im gesamten Organismus gesundheitsförderliche Wirkungen induzieren

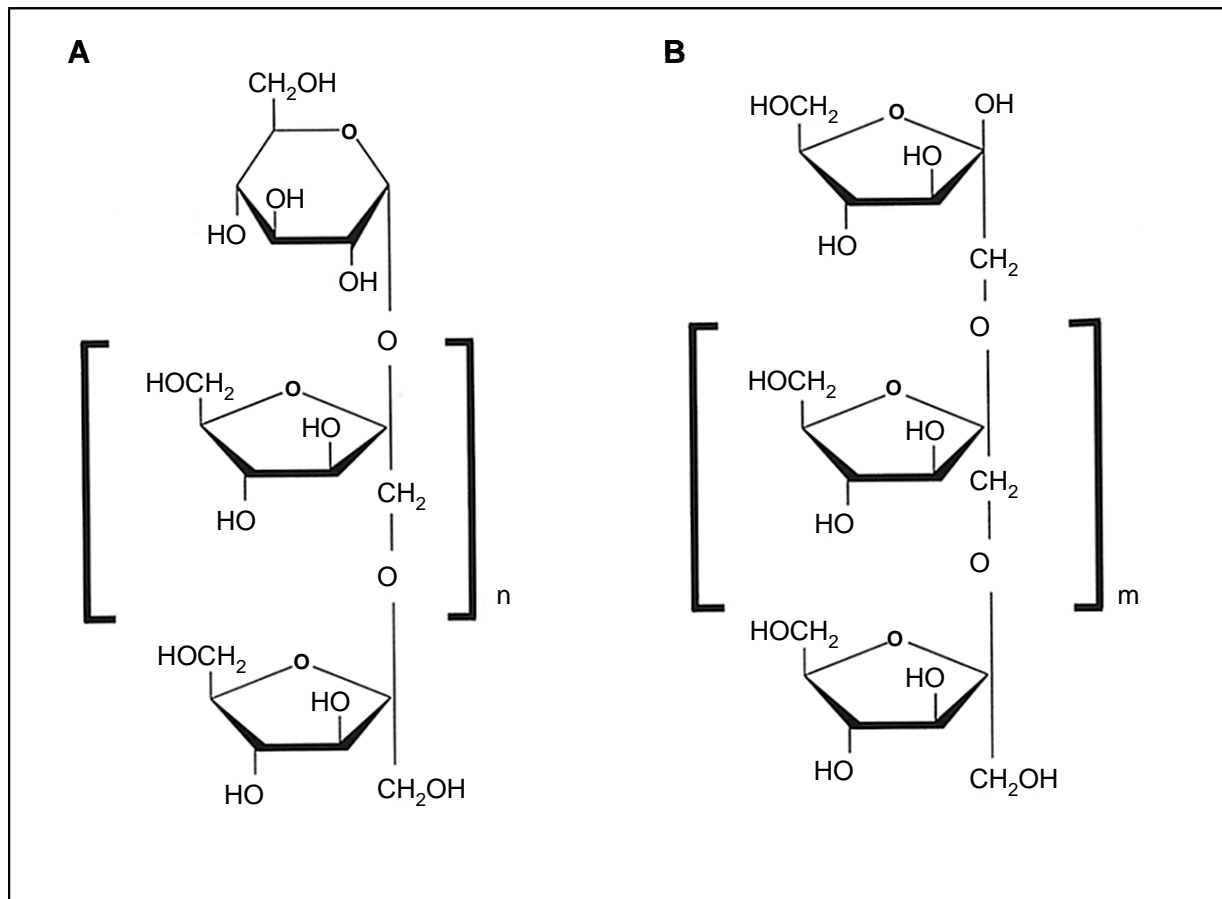
Das BgVV definierte Präbiotika als spezifische unverdauliche Stoffe, die selektiv Bifidobakterien und möglicherweise auch andere Mikroorganismen in ihrem Wachstum im Darm fördern und dadurch positive gesundheitliche Wirkungen erzielen (BgVV, 1999).

Resistente Stärke und Nicht-Stärke-Polysaccharide wie Zellwand-Polysaccharide, Hemicellulose, Pektin und Gummi gelangen unverdaut in den Dickdarm. Diese Stoffe werden jedoch nicht zu der Gruppe der Präbiotika gezählt, da sie unspezifisch die Vermehrung verschiedener Darmbakterien, darunter auch potenziell schädliche Spezies, stimulieren. Galactooligosaccharide und Oligosaccharide aus Sojabohnen gehören möglicherweise zu den Präbiotika. Bislang wurden Fructooligosaccharide, zu denen Inulin und Oligofruktose gehören, als Präbiotika klassifiziert (Gibson & Roberfroid, 1995).

Inulin ist ein weit verbreitetes pflanzliches Reservekohlenhydrat. Zahlreiche Nahrungsmittel wie Topinambur, Zichorien, Zwiebeln, Spargel, Artischocken, Weizen, Lauch und Bananen enthalten Inulin. Inulin ist ein  $\beta$ -D-Fruktan, dessen Fructoseeinheiten über eine  $\beta$  (2-1)-glykosidische Bindung verknüpft sind. Aufgrund des pflanzlichen Syntheseweges befindet sich am Kettenanfang der Fructosekette zumeist ein Glucosemolekül. Inulin besteht aus bis zu 70 Kohlenhydratmonomeren (Roberfroid & Delzenne, 1998). Industriell wird Inulin durch Heißwasserextraktion, hauptsächlich aus Zichorienwurzeln (*Cichorium intybus*), gewonnen. Inulin aus Zichorienwurzeln hat eine Kettenlänge von 2 – 65 Molekülen, mit folgender Längenverteilung der Kohlenhydratketten:

- bis zu 10 Moleküle: 31 %,
- 10 – 20 Moleküle: 24 %,
- mehr als 20 Moleküle: 45 %

Oligofruktose wird durch partielle enzymatische Hydrolyse aus Inulin hergestellt und ist eine Mischung aus reinen Fructoseketten und Fructoseketten mit einem Glucosemolekül am Kettenanfang. Die Kohlenhydratketten haben eine Länge zwischen 2 und 10 Monomeren (van Loo *et al.*, 1995).



**Abb. 2.2:** Molekülstruktur von Inulin (A) und Oligofructose (B).

Die menschlichen Verdauungsenzyme sind spezifisch für  $\alpha$ -glykosidische Bindungen, deshalb werden Inulin und Oligofructose, die eine  $\beta$ -glykosidische Bindung enthalten, im Dünndarm nicht enzymatisch abgebaut. Die  $\beta$ -D-Fruktane gelangen nahezu unverdaut in den Dickdarm. Dort werden sie durch bakterielle Enzyme vollständig abgebaut. Dabei entstehen Gase ( $H_2$ ,  $CO_2$ ,  $CH_4$ ), kurzkettige Fettsäuren (Acetat, Propionat, Butyrat), organische Säuren (Lactat, Succinat, Pyruvat) und Ethanol. Ein Teil dieser Metabolite wird wiederum von Darmbakterien aufgenommen und von ihnen zur Energiegewinnung verwendet. Daraus resultiert eine Zunahme der Bakterienmasse im Dickdarm. Insbesondere durch die vermehrte Bildung kurzkettiger Fettsäuren kommt es im Darmlumen zu einem Abfall des pH-Wertes. Der überwiegende Teil der kurzkettigen Fettsäuren wird im Darm absorbiert und in verschiedenen Geweben metabolisiert. Die verfügbare Energie von  $\beta$ -D-Fruktanen beträgt, im Vergleich zu verdaulichen Kohlenhydraten, lediglich 40 – 50 % und  $\beta$ -D-Fruktane haben damit einen geschätzten kalorischen Wert von 1,0 – 2,0 kcal/g (4,2 – 6,3 kJ/g) (Roberfroid & Delzenne, 1998). Die tägliche Aufnahme von Inulin wird für Westeuropäer auf 3,2 – 11,3 g geschätzt. Die wichtigsten Quellen für Inulin sind Weizen, Zwiebeln, Knoblauch und Lauch (van Loo *et al.*, 1995).

### 2.4.1 Auswirkungen von Präbiotika auf die Gesundheit

Nachfolgend eine Auswahl bislang veröffentlichter Studien, die den derzeitigen Stand der Forschung wiedergeben.



### 2.4.1.1 Einfluss von Präbiotika auf die Darmflora

Bifidobakterien gehören prinzipiell zu den erwünschten intestinalen Bakterien. Die Gründe hierfür sind, dass Bifidobakterien Acetat und Lactat produzieren und damit zu einer Verringerung des pH-Wertes im Darm beitragen. Außerdem produzieren Bifidobakterien Bakteriozine. Diese beiden Mechanismen führen möglicherweise zu einer Wachstumshemmung pathogener Bakterien. Bifidobakterien bilden Folsäure, Verdauungsenzyme und eine Reihe von B-Vitaminen und überdies besitzen sie immunmodulatorische Fähigkeiten. Bifidobakterien können dazu verwendet werden nach einer Antibiotika-Behandlung die normale Darmflora wieder herzustellen (Gibson & Roberfroid, 1995).

Die Fermentation von Inulin und Oligofructose *in vitro* hat gezeigt, dass verschiedene Stämme von Bifidobakterien sowohl Inulin als auch Oligofructose fermentieren können (Roberfroid *et al.*, 1998). In diesem Versuch wuchsen Bifidobakterien besser auf Oligofructose als auf Glucose. Eine Ausnahme bildete *B. bifidum*, dieser Stamm benutzte weder Inulin noch Oligofructose im nennenswerten Umfang als Substrat. Bifidobakterien bilden konstitutiv oder nach Induktion  $\beta$ -Fructosidasen.  $\beta$ -Fructosidasen sind Enzyme, die  $\beta$  (2-1)-glykosidische Bindungen spalten können und damit die Metabolisierung der Fructooligosaccharide ermöglichen (McKellar & Modler, 1989). Andere Bakterienarten haben, jedoch in geringerem Umfang, ebenfalls die Fähigkeit Fructooligosaccharide umzusetzen. Zu diesen Bakterien gehören *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* und verschiedene *Bacteroides* sowie *Clostridien* (Roberfroid *et al.*, 1998). Kaplan & Hutkins (2000) untersuchten verschiedene Stämme von Milchsäurebakterien und Bifidobakterien auf die Fermentation von Fructooligosacchariden. Dabei konnten 12 von 16 *Lactobacillus*-Stämmen und 7 von 8 Bifidobakterien-Stämmen Fructooligosaccharide abbauen. Wang & Gibson (1993) inkubierten humane Fäzesproben, in anaerober Kultur, mit Fructose, Stärke, Inulin oder Oligofructose. Dabei zeigten Bifidobakterien, im Vergleich zu anderen Darmbakterien, ein deutlich stärkeres Wachstum mit Inulin und Oligofructose. Die Untersuchungen von Gibson & Wang (1994) zeigten in einer ähnlichen Versuchsanordnung, dass Oligofructose selektiv das Wachstum der Bifidobakterien stimuliert, also eine bifidogene Wirkung hat.

Verschiedene **Humanstudien** konnten nach Verabreichung von Fructooligosacchariden eine Zunahme der Bifidobakterien in den Fäzes der Probanden feststellen. Die Aufnahme von Oligofructose oder Inulin (15 g/Tag, 15 Tage lang) führte bei gesunden Probanden zu einer signifikanten höheren Zahl von Bifidobakterien in den Fäzes. Die Aufnahme von Oligofructose verringerte dabei die Zahl der *Bacteroides*, *Clostridien* und *Fusobakterien*. Der Verzehr von Inulin verminderte die Zahl der grampositiven Kokken (Gibson *et al.*, 1995). Der tägliche Verzehr von 4 g Neosugar (ein Fructooligosaccharid, enzymatisch aus Saccharose synthetisiert), 25 Tage lang, führte ebenfalls zu einem Anstieg der Bifidobakterien in den Fäzes der untersuchten Probanden (Buddington *et al.*, 1996). Die Aufnahme von Fructooligosacchariden erhöhte nach 7 Tagen die Zahl der Bifidobakterien in den Fäzes bei Tagesdosen von 5 g, 10 g oder 20 g. Die Aufnahme von 2,5 g täglich hatte keine Auswirkungen auf die Anzahl der Bifidobakterien (Bouhnik *et al.*, 1999). Die Aufnahme von Inulin (22 – 34 g/Tag, 64 Tage lang) hatte ebenfalls eine bifidogene Wirkung (Kruse *et al.*, 1999). Jedoch wurden in den beiden letztgenannten Studien die Keimzahlen anderer Gattungen der Darmflora nicht bestimmt, so dass unklar ist, ob es sich um einen selektiven Effekt handelt.

Die bifidogene Wirkung der Fructooligosaccharide ist vermutlich weniger von der verzehrten Menge als von der individuellen Darmflora und der ursprünglichen Anzahl der vorhandenen Bifidobakterien im Darm abhängig. Für eine bifidogene Wirkung ist wahrscheinlich eine tägliche Aufnahme von ungefähr 4 g ausreichend (Roberfroid *et al.*, 1998). In den meisten

Studien wurde nicht untersucht, ob und wie lange die Zahl der Bifidobakterien auch nach dem Ende der Intervention erhöht blieb. In den Studien von Gibson *et al.* (1995) und Kruse *et al.* (1999) wurde die bifidogene Wirkung der Fructooligosaccharide nur während der Intervention beobachtet. Die Zahl der Bifidobakterien in den Fäzes nahm nach Ende der Intervention innerhalb kurzer Zeit wieder ab.

Die Aufnahme von Fructooligosacchariden führte in einem Teil der Studien zu einer Zunahme der durchschnittlichen Stuhlmenge und der Stuhlfrequenz (Gibson & Roberfroid, 1995). Der Verzehr von Fructooligosacchariden kann somit Obstipation lindern (Kleessen *et al.*, 1997; Den Hond *et al.*, 2000). Die Zunahme der Stuhlmenge beruht vermutlich auf einer Zunahme der Biomasse im Dickdarm (Cummings *et al.*, 2001). Der Verzehr von Fructooligosacchariden kann aber auch zu unangenehmen Begleiterscheinungen führen. Dazu gehören Blähungen, intestinale Geräusche, intestinale Krämpfe und Durchfall. Ab welcher verzehrten Menge der Fructooligosaccharide diese Begleiterscheinungen auftreten, scheint sehr individuell verschieden zu sein. Deshalb kann keine allgemein gültige Menge definiert werden, die ohne Beschwerden auszulösen aufgenommen werden kann (Coussement, 1999).

#### **2.4.1.2 Einfluss von Präbiotika auf das Immunsystem**

Pierre *et al.* (1997) untersuchten in einer **Tierstudie** *Min* Mäuse, die spontan Darmtumoren, vor allem im Dünndarm, entwickeln. Bei diesen Mäusen führte die Gabe von 5,8 % (w/w) Oligofructose zu einer höheren Anzahl Peyerscher Plaques im Dünndarm. In einer späteren Studie wurde, wiederum bei *Min* Mäusen, nach Aufnahme von 5,8 % (w/w) Oligofructose, im Darmgewebe eine höhere Menge IL-15-messenger-RNA festgestellt. Die Menge der messenger-RNA anderer Zytokine (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 und IFN- $\gamma$ ) wurde nicht beeinflusst (Bassonga *et al.*, 2001).

Bei Hunden beeinflusste die Aufnahme von Fructooligosacchariden (2 g/Tag) keinen der untersuchten Immunparameter. Die Gabe von Mannanligosacchariden (2 g/Tag) erhöhte jedoch die relative Zahl der Lymphozyten im Blut und die Konzentration von IgA im Serum. Die Kombination von Fructooligosacchariden und Mannanligosacchariden (insgesamt 4 g/Tag) führte zu einer Zunahme der IgA-Konzentration im Ileum (Swanson *et al.*, 2002).

In der **Humanstudie** von Guigoz *et al.* (2002) führte der Verzehr von Fructooligosacchariden (8 g/Tag, 3 Wochen lang) zu einem Anstieg der relativen Zahl der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut der Probanden. Die Phagozytoseaktivität der Granulozyten und der Monozyten wurde durch die Aufnahme von Fructooligosacchariden verringert. Die Menge der IL-6-messenger-RNA in den PMBZ war ebenfalls vermindert. Die Probanden hatten ein Durchschnittsalter von 84 Jahren. In einer weiteren Humanstudie, die ebenfalls mit älteren Probanden ( $\geq 70$  Jahre) durchgeführt wurde, führte der Verzehr einer Mischung von Inulin und Oligofructose (6 g/Tag, 28 Wochen lang) zu keiner Modulation des Immunsystems. Es wurden unter anderem die Immunglobuline im Blut, die Sekretion von IL-4 und IFN- $\gamma$  der Monozyten und die SIgA-Konzentration im Speichel bestimmt (Bunout *et al.*, 2002).

Einerseits stimulieren Präbiotika das Wachstum von Bifidobakterien im Darm, andererseits besitzen Bifidobakterien immunmodulatorische Fähigkeiten. Präbiotika könnten so möglicherweise indirekt zu einer Modulation des Immunsystems beitragen. Um diese Hypothese zu prüfen, sind weitere Tier- und Humanstudien notwendig.

### 2.4.1.3 Einfluss von Präbiotika auf die Karzinogenese

Vor allem in **Tierstudien** wurde bislang untersucht, ob die Aufnahme von Präbiotika möglicherweise eine antikanzerogene Wirkung hat. Als Modell hierfür wurden Mäusen Tumorzellen injiziert und das Tumorstadium untersucht. In der Studie von Taper *et al.* (1997) führte die Verabreichung von jeweils 15 % (w/w) Oligofruktose, Inulin oder Pektin zu einer signifikanten Verringerung des Tumorstadiums. In der Studie von Buddington *et al.* (2002) hatte jedoch die Gabe von jeweils 10 % (w/w) Oligofruktose oder Inulin keine Auswirkungen auf das Wachstum der injizierten Tumorzellen. In der letztgenannten Studie wurden weitere Mäuse mit dem Darmkanzerogen DMH behandelt. Die Zahl der aberranten Krypten im Darm wurde durch die Fütterung mit Inulin oder Oligofruktose verringert. Inulin und Oligofruktose entfalteten hierbei dieselbe Wirksamkeit. Im Gegensatz hierzu hatte die Aufnahme von Inulin, in den Untersuchungen von Reddy *et al.* (1997) und Poulsen *et al.* (2002) eine stärkere Wirkung als Oligofruktose. In der Studie von Reddy *et al.* (1997) wurden Ratten mit AOM behandelt und erhielten jeweils 10 % (w/w) Inulin oder Oligofruktose. Poulsen *et al.* (2002) behandelten Ratten mit DMH und verabreichten jeweils 5 bzw. 15 % (w/w) Inulin oder Oligofruktose. In beiden Studien führte die Fütterung von Inulin zu einer stärkeren Reduktion der Zahl aberranter Krypten.

Perrin *et al.* (2001) behandelten Ratten mit AOM und verabreichten ihnen stärkefreie Weizenkleie (7,6 % w/w), resistente Stärke (19,95 % w/w) oder kurzkettige Fructooligosaccharide (6,0 % w/w). Sowohl die Aufnahme von resistenter Stärke als auch die Aufnahme der kurzkettigen Fructooligosaccharide führte zu einer Verringerung der Zahl aberranter Krypten im Darm. Die Studie von Pierre *et al.* (1997) hatte teilweise konträre Ergebnisse hierzu. In diesem Versuch wurden *Min* Mäuse mit stärkefreier Weizenkleie (7,14 % w/w), resistenter Stärke (18,82 % w/w) oder kurzkettigen Fructooligosacchariden (5,8 % w/w) gefüttert. Hierbei zeigte sich, dass die Gabe der kurzkettigen Fructooligosaccharide die Zahl der Tumoren, vor allem im Dickdarm, reduzierte. Resistente Stärke und stärkefreie Weizenkleie hatten keine Auswirkung auf die Zahl der Tumoren.

Hughes & Rowland (2001) fütterten Ratten 3 Wochen lang mit jeweils 5 % (w/w) Oligofruktose oder Inulin. Anschließend wurden die Tiere mit DMH behandelt und 24 Stunden später getötet. Die Zahl der apoptotischen Zellen pro Krypte war in beiden Gruppen (Oligofruktose und Inulin) deutlich höher als in der Kontrollgruppe. Die Zahl der apoptotischen Zellen der Inulin-Gruppe war höher als die der Oligofruktose-Gruppe. Ebenfalls untersucht wurden die Aktivitäten der bakteriellen  $\beta$ -Glucuronidase und  $\beta$ -Glucosidase im Darminhalt. Inulin und Oligofruktose beeinflussten die Enzymaktivitäten nicht.

In der bereits erwähnten Studie von Perrin *et al.* (2001) wurde auch die Bildung von Butyrat im Darm untersucht. Nach der Adaptationszeit wurde bei Fütterung resistenter Stärke und kurzkettiger Fructooligosaccharide eine anhaltend hohe Konzentration von Butyrat gemessen. Butyrat induziert möglicherweise Mechanismen, die zu einer geringeren Zahl aberranter Krypten führen (Johnson, 1995).

In einer **Humanstudie** erhielten die Probanden Fructooligosaccharide (12,5 g/Tag, 12 Tage lang). Die Zahl der Bifidobakterien in den Fäzes war während der Intervention erhöht. Die Aktivität der bakteriellen Enzyme Nitroreduktase, Azoreduktase und  $\beta$ -Glucuronidase sowie der pH-Wert in den Fäzes wurde durch den Verzehr der Fructooligosaccharide nicht verändert (Bouhnik *et al.*, 1996b).

Die Ergebnisse der Tierstudien lassen vermuten, dass die Aufnahme von Präbiotika auch beim Menschen zu einer Prävention von Darmkrebs beitragen könnte.

## 2.5 Synbiotika

Synbiotika wurden von Gibson & Roberfroid (1995) als eine Kombination von Probiotika und Präbiotika definiert, die selektiv das Wachstum und/oder die Aktivität einzelner oder einer begrenzten Zahl gesundheitsförderlicher Darmbakterienstämme fördern und insbesondere das Überleben und die Ansiedlung der lebend zugeführten Mikroorganismen im Intestinaltrakt stimulieren und dadurch positive Wirkungen für die Gesundheit erzielen.

Durch die kombinierte Aufnahme von Probiotika und Präbiotika könnten möglicherweise additive oder synergistische Wirkungen entstehen, so dass die positiven Effekte des Synbiotikums stärker sind als die des einzelnen Prä- oder Probiotikums. Beispielsweise könnte die bifidogene Eigenschaft des Präbiotikums zur selektiven Wachstumsförderung der zugeführten probiotischen Bifidobakterien beitragen.

Entsprechend definierte das BgVV Synbiotika als eine Kombination von Pro –und Präbiotika, die deren Vorteile synergistisch in sich vereinigen (BgVV, 1999).

### 2.5.1 Auswirkungen von Synbiotika auf die Gesundheit

Sehr wenige Studien haben die Wirkungen der Synbiotika auf die Gesundheit untersucht.

#### 2.5.1.1 Einfluss von Synbiotika auf das Immunsystem

Herich *et al.* (2002) untersuchten an Ferkeln den Einfluss von *L. paracasei* und Oligofruktose auf das Immunsystem. Die Ferkel erhielten 10 Tage lang entweder direkt nach der Geburt oder nach der Entwöhnung *L. paracasei* und Oligofruktose (3 g/Tag) oder *L. paracasei* alleine. Die Fütterung des Synbiotikums direkt nach der Geburt verringerte die Zahl der Leukozyten im Blut sowie die Phagozytoseaktivität der Leukozyten. Die Verabreichung von *L. paracasei* alleine erhöhte geringfügig die Zahl der Leukozyten im Blut und hatte keinen Einfluss auf die Phagozytoseaktivität. Die Fütterung des Synbiotikums nach der Entwöhnung erhöhte die Zahl der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und die Zahl der B-Zellen im Blut. Die Aufnahme von *L. paracasei* alleine führte hingegen zu einer Verringerung der Zahl der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und der B-Zellen. Die Phagozytoseaktivität wurde in beiden Gruppen nicht beeinflusst.

Qiao *et al.* (2002) infizierten Mäuse mit Rotaviren und fütterten sie mit Bifidobakterien (*B. bifidum* und *B. infantis*), Bifidobakterien kombiniert mit Arabino-Galactan, Bifidobakterien mit Oligofruktose oder Bifidobakterien mit Maltodextrin. Die Verabreichung der Bifidobakterien verkürzte die Durchfalldauer und erhöhte den Spiegel der Rotavirus-spezifischen IgA im Serum nach 28 und 42 Tagen und in den Fäzes nach 5 Tagen. Die zusätzliche Aufnahme von Arabino-Galactan, Oligofruktose oder Maltodextrin verstärkte diese Effekte nicht. Vielmehr war die Durchfalldauer in diesen Gruppen, im Vergleich zu der Bifidobakterien-Gruppe, länger. Überdies war in den Synbiotikum-Gruppen die Konzentration von spezifischem IgA in Serum und Fäzes geringer, insbesondere in der Gruppe, die zusätzlich Oligofruktose erhielt.

#### 2.5.1.2 Einfluss von Synbiotika auf die Karzinogenese

In einer **Tierstudie** von Koo & Rao (1991) wurden Mäuse mit DMH behandelt und mit Bifidobakterien (die zuvor aus den Fäzes der Mäuse isoliert wurden) und 5 % (w/w) Neosugar gefüttert. Diese Tiere hatten signifikant weniger aberrante Krypten im Darm als die Tiere der

Kontrollgruppe, die mit einer Standarddiät gefüttert worden waren. In dieser Studie wurde jedoch weder die Verabreichung der Bifidobakterien alleine noch die einzelne Gabe von Neosugar untersucht.

In einer weiteren Tierstudie wurden Ratten mit DMH behandelt und mit Bifidobakterien, Oligofructose oder Bifidobakterien in Kombination mit Oligofructose gefüttert. In fünf der sechs Experimente war die Zahl aberranter Krypten durch die kombinierte Aufnahme von Bifidobakterien und Oligofructose verringert, jedoch nur in einem Experiment war die Reduktion signifikant. Die Verabreichung von Bifidobakterien oder Oligofructose alleine führte hingegen zu keiner Verringerung der aberranten Krypten (Gallaher & Khil, 1999). Rowland *et al.* (1998) behandelten Ratten mit AOM und fütterten sie anschließend mit *B. longum*, 5 % (w/w) Inulin oder *B. longum* in Kombination mit Inulin. Die Zahl aberranter Krypten war in allen Gruppen, im Vergleich zur Kontrollgruppe, reduziert. Allerdings hatte die Synbiotikum-Gruppe die geringste Zahl aberranter Krypten. Die Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase in den Fäzes war in allen drei Gruppen reduziert, dabei hatte die Synbiotikum-Gruppe die geringste Aktivität. Hingegen wurde eine erhöhte Aktivität der  $\beta$ -Glucosidase in den Fäzes der Inulin- und der Synbiotikum-Gruppe festgestellt. Die Fütterung der Tiere mit *B. longum* führte zu keiner Aktivitätsänderung der  $\beta$ -Glucosidase in den Fäzes.

In der **Humanstudie** von Bouhnik *et al.* (1996a) erhielten die Probanden 12 Tage lang fermentierte Milch mit Bifidobakterien alleine oder in Kombination mit Inulin (18 g/Tag). Die Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase in den Fäzes war in der Bifidobakterien-Gruppe verringert, in der Synbiotikum-Gruppe jedoch nicht. Die Aktivitäten der Nitroreduktase, Azoreduktase und Nitratreduktase waren in beiden Gruppen unverändert.

Die geringe Zahl der Untersuchungen lässt bislang keine Aussage über die Wirksamkeit der Synbiotika und über mögliche synergistische Wirkungen von Pro- und Präbiotika zu.

## 2.6 Zielsetzung

Bislang wurden in zahlreichen Studien verschiedene Mikroorganismen auf ihre probiotischen Eigenschaften hin untersucht. Schwachpunkte einiger Studien sind die unzureichende Charakterisierung der verabreichten Stämme sowie das teilweise Fehlen adäquater Kontrollgruppen. Studien, die den Einfluss von Probiotika auf das Immunsystem untersucht haben, führten zum Teil zu widersprüchlichen Ergebnissen. Sehr wenige Studien haben die Wirkungen von Probiotika auf das darmassoziierte Immunsystem untersucht. Im Gegensatz zu den Probiotika sind die Präbiotika und ihre Auswirkungen auf die Gesundheit bisher nur wenig untersucht. Weit gehend unerforscht sind die möglichen Einflüsse der Synbiotika auf die Gesundheit.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines von der Europäischen Union geförderten Projektes durchgeführt. Ziel dieses Projektes war die Klärung der Frage, ob durch die Aufnahme von Probiotika, Präbiotika oder Synbiotika eine Senkung des Darmkrebsrisikos möglich ist. Im Rahmen dieses Projektes sollten in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen der Pro-, Prä- oder Synbiotika auf das systemische und insbesondere auf das darmassoziierte Immunsystem untersucht werden.

Mit Hilfe dreier Tierstudien sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Führt die Aufnahme von Pro-, Prä- oder Synbiotika zu Modulationen des darmassoziierten und/oder des systemischen Immunsystems?
- Falls Pro- und Präbiotika Auswirkungen auf das Immunsystem haben, führt die Kombination von Pro- und Präbiotika zu einer additiven oder synergistischen Wirkung?
- Hat eine kurzfristige Aufnahme der Pro-, Prä- oder Synbiotika andere Wirkungen auf das Immunsystem als eine langfristige Aufnahme?
- Wird das Immunsystem gesunder Tiere durch die Aufnahme von Pro-, Prä- oder Synbiotika in anderer Weise beeinflusst als das Immunsystem von Tieren, die mit dem Darmkanzerogen Azoxymethan behandelt wurden?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen möglichen krebspräventiven Wirkungen von Pro-, Prä- oder Synbiotika und möglichen Modulationen des Immunsystems durch Pro-, Prä- oder Synbiotika?

Des Weiteren sollten in einer Humanstudie folgende Fragestellungen geklärt werden:

- Beeinflusst die Aufnahme eines Synbiotikums das Immunsystem von Krebspatienten bzw. von Patienten mit einem hohen Risiko für Darmkrebs?
- Nach welcher Zeit führt die Aufnahme des Synbiotikums zu möglichen Modulationen des Immunsystems?
- Unterscheiden sich mögliche Auswirkungen des Synbiotikums auf das Immunsystem hinsichtlich der verschiedenen Patientengruppen?

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Chemikalien waren von höchster erhaltlicher Reinheit und wurden, wenn nicht anders vermerkt, von der Firma VWR International (Bruchsal) bezogen.

12-Loch-Zellkulturplatte (Becton Dickinson)	VWR International, Bruchsal
3,3'-Diocetadecyloxycarbocyanin-Perchlorat	Molecular Probes, Leiden, NL
96-Loch-Mikrotiterplatte (MaxiSorp Surface, Nunc)	VWR International, Bruchsal
96-Loch-Zellkulturplatte (Becton Dickinson)	VWR International, Bruchsal
Antikörper IgA (Ratte, Bethyl)	Natutec, Frankfurt
Antikörper sekretorische Komponente (Ratte, Bethyl)	Natutec, Frankfurt
Baumwolle	Drogeriemarkt, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin	Boehringer, Mannheim
C18 Amprep Säule (2,8 ml)	Amersham, Freiburg
CD4-Antikörper (R-Phycoerythrin)	Caltag, Hamburg
CD8-Antikörper (Fluoreszein)	Caltag, Hamburg
Concanavalin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dihydrorhodamin 123	Molecular Probes, Leiden, NL
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>E. coli</i> (BODIPY FL markiert, opsonisiert)	Molecular Probes, Leiden, NL
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Flow™	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Lysing Solution (10x)	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
FACS-Röhrchen (Polystyrol, 12 x 75 mm, Falcon)	BD Biosciences, Heidelberg
Filter 0,2 µm (FP30/0,2 CA, Schleicher & Schuell)	VWR International, Bruchsal
Fötales Kälberserum	Life Technologies, Karlsruhe
Heparin-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
IFN-γ ELISA Reagenziensatz (human, DuoSet)	R+D, Wiesbaden
IFN-γ ELISA Reagenziensatz (Ratte, OptEIA™Set)	Pharmingen, Heidelberg
IL-10 ELISA Reagenziensatz (human, CytoSets™)	Biosource, Solingen
IL-10 ELISA Reagenziensatz (Ratte, OptEIA™Set)	Pharmingen, Heidelberg
IL-12+p40 ELISA Reagenziensatz (human, CytoSets™)	Biosource, Solingen
IL-2-Antikörper (biotinyliert, monoklonal)	R+D Systems, Wiesbaden
IL-2-Beschichtungs-Antikörper	R+D Systems, Wiesbaden
IL-2-Standard	R+D Systems, Wiesbaden
Isotyp-Kontrolle Maus IgG1 (R-Phycoerythrin, CD4)	Caltag, Hamburg
Isotyp-Kontrolle Maus IgG1 (Fluoreszein, CD8)	Caltag, Hamburg
Lektin von <i>Phaseolus vulgaris</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin (200 mM)	Life Technologies, Karlsruhe
Lipopolysaccharid ( <i>E. coli</i> 0111:B4)	BD Biosciences, Heidelberg
Lympholyte (Ratte, Cedarlane)	Biozol, Eching
Lysing Solution (10x)	BD Biosciences, Heidelberg
Meerrettichperoxidase-Streptavidin	R+D Systems, Wiesbaden
Penicillin (5000 E/ml)/Streptomycin (5000 µg/ml)	Life Technologies, Karlsruhe
Pentoxifyllin	Sigma-Aldrich, Steinheim

PGE <sub>2</sub> EIA Reagenziensatz (human, Biotrak)	Amersham, Freiburg
Phorbol-12-myristat-13-acetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polypropylen-Röhrchen (15 ml/50 ml)	VWR International, Bruchsal
Proliferation ELISA Reagenziensatz (BrdU)	Roche Diagnostics, Mannheim
Propidiumjodid	Molecular Probes, Leiden, NL
Reaktionsgefäße (Eppendorf)	VWR International, Bruchsal
RPMI 1640 Medium	Life Technologies, Karlsruhe
Schutztücher (Mölnlycke)	SCA Hygiene Products, Mainz
Siebgewebe (100 µm)	VWR International, Bruchsal
TGF-β1 ELISA Reagenziensatz (human, DuoSet)	R+D Systems, Wiesbaden
TMB Peroxidase Substrat (KPL)	Dunn Labortechnik, Asbach
TNF-α ELISA Reagenziensatz (human, CytoSets™)	Biosource, Solingen
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zellkulturflaschen (T <sub>80</sub> , T <sub>25</sub> , Nunc)	VWR International, Bruchsal

### 3.1.2 Lösungen

#### 1 % Paraformaldehyd zur Messung der Lymphozytensubpopulationen

1 g Paraformaldehyd in 100 ml 15 mM NaCl lösen, 1 ml 1 M NaCl zugeben, Ansatz auf 60°C erwärmen, pH 7,4

#### 2,5 M Essigsäure/10 M Urea

150,2 g Urea in 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> lösen, langsam 35,9 ml Eisessig zugeben, auf 250 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auffüllen

#### 2,7 M NaOH/1 M HEPES

27 g NaOH-Pellets in 150 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> lösen, 59,5 g HEPES zugeben, auf 250 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auffüllen

#### 0,5 % PTB

0,5 g BSA in 100 ml PBS/Tween 20 lösen, frisch ansetzen

#### 2 % PTB

2 g BSA in 100 ml PBS/Tween 20 lösen, frisch ansetzen

#### 4 % PTB

4 g BSA in 100 ml PBS/Tween 20 lösen, frisch ansetzen

#### 10x Lysing Solution

Verdünnung 1:10 mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

#### ACK-Lyse-Puffer

15 mM NH<sub>4</sub>Cl, 1 M KHCO<sub>3</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,2-7,4, steril filtriert

#### Concanavalin A

Stammlösung: 5 mg/ml PBS, Lagerung bei -20°C



**Dihydrorhodamin 123 zur Messung des oxidativen Burst**

10 mg Dihydrorhodamin 123 in 1 ml DMSO lösen, Aliquots mit N<sub>2</sub> überschichten, Lagerung bei -80°C

**DiO-Stammlösung zur Messung der Aktivität der NK-Zellen (3 mM)**

2,645 mg DiO in 1 ml DMSO lösen (Ultraschallbad), Lagerung bei 4°C, Dunkelheit

**Einfriermedium für humane mononukleäre Zellen**

RPMI 1640 Medium, 20 % (v/v) FCS, 10 % (v/v) DMSO

**Komplettmedium für die Immunzellen der Ratte**

RPMI 1640 Medium, 5 % (v/v) Fötale Kälberserum (30 min bei 56°C hitzeinaktiviert), 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin, 1 % (v/v) L-Glutamin, 25 mM HEPES

**Komplettmedium für die menschlichen Immunzellen, YAC-1 und K-562**

RPMI 1640 Medium, 5 % (v/v) Fötale Kälberserum (30 min bei 56°C hitzeinaktiviert), 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin, 1 % (v/v) L-Glutamin

**Lektin von *Phaseolus vulgaris***

Stammlösung: 1 mg/ml PBS

**Lipopolysaccharid**

Stammlösung: 20 µg/ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**PBS**

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2-7,4

**PBS/Tween 20**

0,05 % (v/v) Tween 20

**Pentoxifyllin zur Hemmung der Aktivität der NK-Zellen (1,5 mg/ml)**

1,5 mg Pentoxifyllin in 1 ml Komplettmedium (Ratte) lösen

**Phorbol-12-myristat-13-acetat zur Messung des oxidativen Burst**

5 mg Phorbol-12-myristat-13-acetat in 5 ml DMSO lösen (1,62 mM, Lagerung der Aliquots bei -20°C). Arbeitslösung: 5 µl der 1,62 mM Stammlösung in 1 ml PBS verdünnen (8,1 µM)

**Propidiumjodid zur Messung der Aktivität der NK-Zellen (0,525 mg/ml)**

5,25 mg Propidiumjodid in 10 ml Komplettmedium lösen (Ultraschallbad), Lagerung bei 4°C, Dunkelheit

**Propidiumjodid zur Messung der Phagozytoseaktivität/oxidativer Burst (33,3 µg/ml)**

0,1665 mg Propidiumjodid in 1 ml PBS lösen (Ultraschallbad). Diese Lösung 1:5 mit PBS verdünnen. Lagerung bei 4°C, Dunkelheit

**Quenchlösung zur Messung der Phagozytoseaktivität**

Trypanblau 1:10 mit PBS verdünnt

### 3.2 Versuchstiere

F344 Ratten (männlich), Tierstudie 1  
 F344 Ratten (männlich), Tierstudie 2 A und 2 B

Harlan Winkelmann, Borcheln  
 Harlan Nossan, Italien

### 3.3 Geräte

CO<sub>2</sub>-Inkubator IR 1500  
 Coulter Z2  
 Mikrotiterplatten-Lesegerät  
 Sicherheitswerkbank  
 Vakuumzentrifuge (Heto-Holten)

Flow Laboratories, Meckenheim  
 Beckman-Coulter, Krefeld  
 MWG-Biotech, Ebersberg  
 Heraeus Instruments, Hanau  
 Fisher Scientific, Ulm

#### Durchflusszytometer:

FACSCalibur™, BD Biosciences (Heidelberg). Die verwendeten Fluoreszenzkanäle sind in **Tab. 3.1** dargestellt. Verwendete Software: Cell-Quest™-Software Version 3.1f

**Tab. 3.1:** Verwendete Fluoreszenzkanäle

Kanal	Messparameter	Anregung (nm)	Emission (nm)	Farbstoff
FL1	Grünfluoreszenz	488	530	Rhodamin 123 3,3'-Diocetadecyloxacarbocyanin-Perchlorat (DiO)
FL1	Grünfluoreszenz	488	513	BODYPY FL Fluoreszein (FITC)
FL2	Orangefluoreszenz	488	575	R-Phycoerythrin (R-PE) Propidiumjodid
FL3	Rotfluoreszenz	488	630	Propidiumjodid

#### Durchflusszytometer für die Messungen in Cork (Irland):

Epics Elite, Coulter (USA)  
 Verwendete Software: Expo 32 Elite

### 3.4 Versuchsdesign der Tierstudie 1

Es wurden 80 männliche F344 Ratten verwendet. Da der überwiegende Teil der Untersuchungen im Anschluss an die Isolierung der Immunzellen der unterschiedlichen Organe durchgeführt wurde, konnten aus Kapazitätsgründen maximal 15 Tiere pro Woche untersucht werden. Infolgedessen wurde der Versuch gestaffelt durchgeführt. In den ersten 5 Wochen wurden jeweils 15 Tiere untersucht und in der letzten Woche die verbleibenden 5 Tiere. Die Tiere waren zu Versuchsbeginn 12-13 Wochen alt. Sie wurden paarweise bzw. einzeln

(aufgrund der ungeraden Anzahl der Versuchstiere, je Versuchswoche) in Käfigen, bei 21°C Raumtemperatur, gehalten. Die Tiere waren einem 12 Stunden hell/12 Stunden dunkel Rhythmus ausgesetzt. In der Eingewöhnungsphase, nach ihrer Ankunft, erhielten die Tiere eine Woche Standardfutter (Altromin, Lage). Anschließend wurden die Tiere eine weitere Woche mit der Versuchsdiät der Kontrollgruppe gefüttert. Die Tiere wurden mit einer modifizierten AIN76-Diät gefüttert. Diese Diät zeichnete sich durch einen hohen Fettanteil (23,10 % w/w Maisöl) und einen geringen Celluloseanteil (2 % w/w) aus.

### 3.4.1 Versuchsdiät

Die Tiere wurden in vier Gruppen eingeteilt: Kontrolle (KON), Probiotika (PRO), Präbiotikum (PRÄ) und Synbiotikum (SYN). In jeder Gruppe befanden sich 20 Tiere. Die Futterzusammensetzung für die einzelnen Gruppen ist in **Tab. 3.2** dargestellt.

**Tab. 3.2:** Futterzusammensetzung der einzelnen Gruppen (Angaben in % w/w)

Futterkomponente	KON	PRO	PRÄ	SYN
Saccharose	36,10	36,10	36,10	36,10
Casein	23,10	23,10	23,10	23,10
Cellulose	2,00	2,00	2,00	2,00
Maltodextrin	10,00	10,00	—	—
Mineral Mix (AIN-76)	4,00	4,00	4,00	4,00
Vitamin Mix (AIN-76)	1,20	1,20	1,20	1,20
Cholin	0,20	0,20	0,20	0,20
Methionin	0,30	0,30	0,30	0,30
Maisöl	23,10	23,10	23,10	23,10
LGG ( $6 \times 10^{11}$ cfu/g)	—	0,08	—	0,08
BB12 ( $3 \times 10^{10}$ cfu/g)	—	1,67	—	1,67
Raftilose® Synergy1	—	—	10,00	10,00

Raftilose® Synergy1 (Orafti, Belgien) besteht zu gleichen Teilen aus den langkettigen Fraktionen (Kettenlänge 10-65) und den kurzkettigen Fraktionen (Kettenlänge 3-8) von Inulin (aus Zichorienwurzeln extrahiert). *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) wurde von Valio (Helsinki, Finnland) hergestellt. *Bifidobacterium lactis* BB12 (BB12) wurde von Chr. Hansen (Horsholm, Dänemark) hergestellt. Alle weiteren Futter-Komponenten wurden von Laboratorio Piccioni (Gessate, Italien) bezogen. Das Futter wurde wöchentlich gemischt, portioniert und bei -20°C gelagert.

Die Tiere wurden 4 Wochen mit der Versuchsdiät gefüttert und erhielten Futter und Wasser *ad libitum*. Die tatsächliche Futtermenge wurde durch abwägen des nicht aufgenommenen Futters kontrolliert. Das Körpergewicht der Tiere wurde mindestens jeden dritten Tag kontrolliert.

### **3.4.2 Präparation der Organe**

Die nachfolgenden einzelnen Schritte zur Organpräparation und Zellisolierung wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei Raumtemperatur durchgeführt.

Am Ende der Fütterungsperiode wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> betäubt und guillotiniert. Das Blut wurde in einem 9 ml Heparin-Röhrchen aufgefangen. Die Tiere wurden am Bauch eröffnet. Zuerst wurde die Milz herausgeschnitten und in ein 15 ml Polypropylen-Röhrchen (mit 5 ml Komplettmedium) überführt und auf Eis gestellt. Anschließend wurde das Mesenterium, mit den darin enthaltenen Lymphknoten, mit einer Schere entfernt und in ein 15 ml Polypropylen-Röhrchen (mit 5 ml Komplettmedium) überführt und auf Eis gestellt. Die restlichen Mesenterien wurden entfernt, so dass der Darm gestreckt werden konnte und die Peyerschen Plaques wurden, möglichst ohne umgebendes Darmgewebe, mit Hilfe einer Schere und Pinzette aus dem Dünndarm isoliert. Die Peyerschen Plaques wurden, um anhaftenden Darminhalt zu entfernen, zweimal in einer Petrischale in Komplettmedium geschwenkt und in ein 15 ml Polypropylen-Röhrchen (mit 5 ml Komplettmedium) überführt. Ein Teil des Darminhalts aus Ileum und Caecum wurde direkt in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gedrückt und bis zur weiteren Bestimmung bei -20°C eingefroren.

Alle Arbeiten zur Isolierung der Immunzellen sowie die Kultivierung und Markierung der Zielzellen YAC-1 wurden in einer Sicherheitswerkbank mit laminarer Verdrängungsströmung durchgeführt.

### **3.4.3 Isolierung der mononukleären Zellen des Blutes**

Um die mononukleären Zellen des Blutes zu isolieren, wurden ~ 4 ml Vollblut mit 3 ml PBS gemischt. Zur Herstellung des Dichtegradienten wurde das verdünnte Blut über Lympholyte geschichtet und anschließend zentrifugiert (600 x g, 20°C, 20 min). Mit einer Pasteurpipette wurde die Phase der mononukleären Zellen abgenommen, in ein 15 ml Polypropylen-Röhrchen überführt und mit PBS aufgefüllt. Um die Zellen zu waschen, wurde die Zellsuspension zentrifugiert (400 x g, 20°C, 10 min) und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 14 ml PBS resuspendiert und die Zellsuspension erneut zentrifugiert (400 x g, 20°C, 10 min). Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 2 ml Komplettmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde am Coulter Z2 gemessen und auf eine Konzentration von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

### **3.4.4 Isolierung der Immunzellen der Milz**

Die Milz wurde in einer Petrischale (mit 7 ml Komplettmedium) zwischen zwei Pinzetten zerrieben, größere Gewebeteile wurden entfernt. Um Gewebedebris und tote Zellen zu entfernen, wurde die erhaltene Zellsuspension mit Hilfe einer Spritze durch Baumwollgewebe und Siebgewebe (100 µm) in ein 15 ml Polypropylen-Röhrchen filtriert. Anschließend wurde das Röhrchen mit Komplettmedium aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (200 x g, 4°C, 10 min) und der Überstand abgesaugt. Um die Erythrozyten zu entfernen, wurde das Zellpellet in 5 ml ACK-Lyse-Puffer aufgenommen und 5 Min lang, bei Raumtemperatur, gelegentlich geschwenkt. Anschließend wurden 10 ml Komplettmedium zugegeben und zentrifugiert (200 x g, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit 14 ml Komplettmedium gewaschen und erneut zentrifugiert (200 x g, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 16 ml Komplettmedium aufgenom-

men. Die Zellzahl wurde nach Färbung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für die nachfolgenden Versuche wurde die Zellsuspension aliquotiert und die Zellzahl auf die jeweils erforderliche Zellkonzentration eingestellt.

### **3.4.5 Isolierung der Immunzellen der mesenterialen Lymphknoten**

Zur Isolierung der Lymphknoten wurde das gesamte Gewebe auf eine Schutzauflage gelegt, das umgebende Fettgewebe mit einer Pinzette entfernt und die einzelnen Lymphknoten präpariert. Die Lymphknoten wurden, mit Hilfe eines Spritzenstempels, durch ein mit Komplettmedium befeuchtetes Metallsieb (224  $\mu\text{m}$ ) in eine Petrischale (mit 7 ml Komplettmedium) gedrückt. Die erhaltene Zellsuspension wurde mit einer Spritze über Baumwollgewebe und Siebgewebe (100  $\mu\text{m}$ ) in ein 15 ml Polypropylen-Röhrchen filtriert. Anschließend wurde das Röhrchen mit Komplettmedium aufgefüllt. Die Zellen wurden zentrifugiert (200 x g, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen mit 14 ml Komplettmedium gewaschen und erneut zentrifugiert (200 x g, 4°C, 10 min). Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 2,5 ml Komplettmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde nach Färbung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde aliquotiert und die Zellzahl auf die jeweils erforderliche Zellkonzentration eingestellt.

### **3.4.6 Isolierung der Immunzellen der Peyerschen Plaques**

Die einzelnen Peyerschen Plaques wurden mit einem Spritzenstempel durch ein mit Komplettmedium befeuchtetes Metallsieb (224  $\mu\text{m}$ ) in eine Petrischale (mit 7 ml Komplettmedium) gedrückt. Die erhaltene Zellsuspension wurde mit einer Spritze durch Baumwollgewebe und Siebgewebe (100  $\mu\text{m}$ ) in ein 15 ml Polypropylen-Röhrchen filtriert. Anschließend wurde das Röhrchen mit Komplettmedium aufgefüllt. Die Zellen wurden zentrifugiert (200 x g, 4°C, 10 min) und der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden mit 14 ml Komplettmedium gewaschen und erneut zentrifugiert (200 x g, 4°C, 10 min). Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde nach Färbung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach dem Aliquotieren der Zellsuspension wurden die unterschiedlichen Zellkonzentrationen für die nachfolgenden Versuche eingestellt.

### **3.4.7 Lymphozytensubpopulationen**

Der Anteil der Zellen, die den Korezeptor CD4 oder CD8 exprimieren wurde für die Immunzellen des Vollblutes, der Milz und der mesenterialen Lymphknoten am Durchflusszytometer gemessen. Es wurden 100  $\mu\text{l}$  Vollblut bzw. 100  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension (Zellkonzentration:  $1 \times 10^7$  Zellen/ml) in ein FACS-Röhrchen pipettiert und auf Eis gestellt.

In den ersten Ansatz wurden jeweils 5  $\mu\text{l}$  anti-CD4-R-PE und anti-CD8-FITC pipettiert. In den zweiten Kontrollansatz wurden je 5  $\mu\text{l}$  der beiden Isotyp-Kontrollen zugegeben und gemischt. Die Proben wurden für 30 min (Raumtemperatur und Dunkelheit) inkubiert. Um die Erythrozyten zu lysieren und die Leukozyten zu fixieren, erfolgte die Zugabe von 2 ml 1x Lysing Solution. Die Proben wurden gemischt und für 20 min (Raumtemperatur und Dunkelheit) inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert (250 x g, 4°C, 5 min), anschließend auf Eis gestellt und der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden mit 2 ml 0,1 % Natriumazid/PBS gewaschen. Die Proben wurden erneut zentrifugiert (250 x g, 4°C, 5 min), auf Eis gestellt und der Überstand abgesaugt. Um die Zellen zu fixieren, wurden 500  $\mu\text{l}$  einer

1 % Paraformaldehydlösung zugegeben, gemischt und auf Eis gestellt. Die Proben wurden innerhalb von 24 Stunden durchflusszytometrisch gemessen.

Anhand der Isotypkontrolle wurde bei der Auswertung im Punktediagramm (Vorwärtsstreulicht (FSC) gegen Seitwärtsstreulicht (SSC)) die Lymphozytenpopulation eingegrenzt. Im FL1-FL2 Punktediagramm wurde ein Fenster um die R-PE-negativen und FITC-negativen Zellen gesetzt. Diese Einstellung wurde für die nachfolgende Auswertung des CD4/CD8-Ansatzes beibehalten. Es wurde der prozentuale Anteil der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gemessen. Dieser Wert wurde jeweils um den Wert der Isotyp-Kontrolle bereinigt.

### **3.4.8 Messung der Phagozytoseaktivität**

Die Phagozytoseaktivität wurde am Durchflusszytometer gemessen (nach O'Gorman, 2002).

#### **3.4.8.1 Opsonisierung der *E. coli***

Die *E. coli* waren bereits mit dem Farbstoff BODYPY FL (Emission bei 513 nm) markiert. Die Opsonisierung der *E. coli* erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die opsonisierten *E. coli* wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für die Versuchsdurchführung wurden die *E. coli* aufgetaut, im Ultraschallbad vereinzelt, die Lösung 1:4 mit PBS verdünnt und auf Eis vorgekühlt.

#### **3.4.8.2 Versuchsansatz zur Messung der Phagozytoseaktivität**

Es wurde die Phagozytoseaktivität der Immunzellen des Vollblutes und der Milz gemessen. Opsonisierte *E. coli* können von phagozytischen Zellen aufgenommen werden. Für jede Probe wurde eine Negativkontrolle und ein Testansatz gemessen. Pro Ansatz wurden jeweils 100 µl Vollblut bzw. 100 µl der Zellsuspension (Zellkonzentration:  $1 \times 10^7$  Zellen/ml) in ein FACS-Röhrchen pipettiert und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 5 µl der vorgekühlten und verdünnten *E. coli*-Suspension zugegeben und gemischt. Der Kontrollansatz verblieb auf Eis, um die Phagozytoseaktivität zu hemmen. Der Testansatz wurde für 10 min bei 37°C in einem geschlossenen Wasserbad inkubiert. Um das Signal der nicht aufgenommenen adhärenen *E. coli* zu quenchen, wurde anschließend 100 µl eiskalte Quenchlösung zugegeben und gemischt. Es wurden 3 ml PBS zugegeben, gemischt, zentrifugiert (250 x g, 4°C, 5 min) und der Überstand abgesaugt. Dieser Waschschritt wurde wiederholt. Danach erfolgte die Lyse der Erythrozyten und die Fixierung der Leukozyten durch die Zugabe von 2 ml 1x Lysing Solution, kurzem Mischen und anschließender Inkubation von 20 min (Raumtemperatur, Dunkelheit). Nach der Lyse wurden die Ansätze zentrifugiert (250 x g, 4°C, 5 min). Die Proben wurden auf Eis gestellt, der Überstand abgesaugt, die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (250 x g, 4°C, 5 min). Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Proben auf Eis gelagert. Vor der durchflusszytometrischen Messung wurden 300 µl der DNA-Färbelösung Propidiumjodid (33,3 µg/ml) zugegeben und die Ansätze für 10 min auf Eis lichtgeschützt inkubiert. Die Proben wurden anschließend innerhalb von 60 min gemessen.

Bei der Auswertung wurde im FL3-Histogramm ein Fenster um die Leukozytenpopulation gesetzt. Im FSC gegen SSC Punktediagramm wurden die beiden Zellpopulationen der neutrophilen Granulozyten und Monozyten unterschieden. Die Negativkontrolle diente dazu, im FL1-Histogramm einen Marker zu setzen, um zwischen BODYPY FL-positiven und BODYPY FL-negativen Zellen zu unterscheiden. Dieser Marker wurde für die Auswertung

der jeweiligen Probe beibehalten. Es wurden der prozentuale Anteil der phagozytierenden Zellen und deren mittlere Fluoreszenzintensität (entspricht der Zahl aufgenommener Bakterien pro Zelle) gemessen.

### 3.4.9 Messung des oxidativen Burst

Die Messung des oxidativen Burst für die Immunzellen des Vollblutes erfolgte am Durchflusszytometer. Für jede Probe wurde ein Kontrollansatz und ein Ansatz mit einem starken Stimulus gemessen. Um die gebildete Menge der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu detektieren, wurde Dihydrorhodamin 123 (DHR) verwendet. DHR ist eine Substanz, die durch die Membran diffundiert und intrazellulär zu der fluoreszierenden Substanz Rhodamin 123 oxidiert werden kann. Für jeden Testansatz wurden 100 µl Vollblut in ein FACS-Röhrchen pipettiert und für 10 min auf Eis gekühlt. Zu den Proben wurden 20 µl PBS (Kontrolle) oder 20 µl PMA (starker Stimulus) gegeben. Die Proben wurden gemischt und für 10 min bei 37°C (im geschlossenen Wasserbad) inkubiert. Die Ansätze wurden auf Eis gestellt, jeweils 1,7 µl DHR-Stammlösung zugegeben, gemischt und erneut für 10 min bei 37°C (im geschlossenen Wasserbad) inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurden die Proben auf Eis gestellt. Anschließend wurde zur Lysierung der Erythrozyten und zur Fixierung der Leukozyten 2 ml 1x Lysing Solution zugegeben und die Testansätze für 20 min (lichtgeschützt, Raumtemperatur) inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert (250 x g, 4°C, 5 min), der Überstand abgesaugt und die Zellen mit jeweils 3 ml PBS gewaschen und zentrifugiert (250 x g, 4°C, 5 min). Die Ansätze wurden auf Eis gestellt und die Überstände abgesaugt. Durch Zugabe von 300 µl Propidiumjodid (33,3 µg/ml) und Inkubation für 10 min auf Eis wurde die DNA der Zellen angefärbt. Die Proben wurden innerhalb von 30 min durchflusszytometrisch gemessen.

Im FL3-Histogramm wurde in der Auswertung ein Fenster um die Population der Leukozyten gesetzt. Im FSC gegen SSC Punktediagramm wurden neutrophile Granulozyten und Monozyten unterschieden. Nur die neutrophilen Granulozyten zeigten einen deutlichen oxidativen Burst und deshalb wurde auch nur dieser ausgewertet. Der Kontrollansatz diente dazu, im FL1-Histogramm einen Marker zu setzen, um zwischen Rhodamin-positiven und Rhodamin-negativen Zellen zu unterscheiden. Dieser Marker wurde für die Auswertung der jeweiligen Probe beibehalten. Es wurden der prozentuale Anteil der Zellen, die ROS produziert hatten (hierbei wurde der Kontrollwert von dem Probenwert des starken Stimulus subtrahiert) und deren mittlere Fluoreszenzintensität (entspricht hier der Enzymaktivität pro Zelle) gemessen.

### 3.4.10 Messung der Aktivität der natürlichen Killerzellen

Die Messung der Aktivität der NK-Zellen erfolgte am Durchflusszytometer (nach Chang *et al.*, 1993). Als Effektorzellen wurden die mononukleären Zellen des peripheren Blutes und die Immunzellen der Milz, der mesenterialen Lymphknoten und der Peyerschen Plaques eingesetzt.

#### 3.4.10.1 Kultivierung der Zielzellen YAC-1

YAC-1-Zellen (ACC 96, DMSZ Braunschweig) sind Suspensionszellen eines murinen Lymphoms und werden als Zielzellen zur Messung der Aktivität der NK-Zellen der Ratte eingesetzt (DMSZ, 2002).

Die Kultivierung der YAC-1-Zellen erfolgte in Kompletmedium. Die Zellen wurden im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Subkultivierung erfolgte jeden zweiten Tag. Bei jeder Subkultivierung wurde die Zellzahl und die Vitalität, nach Färbung mit Trypanblau, in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Polypropylen-Röhrchen überführt und zentrifugiert (205 x g, 20°C, 5 min). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 10 ml Kompletmedium (im Wasserbad auf 37°C erwärmt) resuspendiert und in einer Konzentration von 5 x 10<sup>6</sup> Zellen/20 ml Medium in T<sub>80</sub>-Zellkulturflaschen (80 cm<sup>2</sup> Grundfläche) ausgesät.

### 3.4.10.2 Markierung der Zielzellen YAC-1

Bei der Subkultivierung wurde eine separate T<sub>80</sub>-Zellkulturflasche mit YAC-1-Zellen (Zellkonzentration: 1 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml) ausgesät. Die Zielzellen wurden jeweils am Vortag der Versuchsdurchführung markiert. Die Zellzahl und Vitalität der Zellen wurde nach Färbung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Polypropylen-Röhrchen überführt und zentrifugiert (205 x g, 20°C, 5 min). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in Kompletmedium resuspendiert, so dass die Zellkonzentration 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml betrug. Je Färbeansatz wurden 20 µl der 3 mM 3,3'-Diocetadecyloxycarbocyanin-Perchlorat (DiO)-Stammlösung in ein FACS-Röhrchen gegeben. Da der Membranfarbstoff DiO lichtempfindlich ist, wurde in der unbeleuchteten Sicherheitswerkbank gearbeitet. Anschließend wurden 2 ml der YAC-1-Suspension zugegeben, jedoch nicht gemischt. Die Zellen wurden für 20 min im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert und nachfolgend zentrifugiert (200 x g, 20°C, 5 min). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 4 ml PBS resuspendiert. Die einzelnen Ansätze wurden in einem 15 ml Polypropylen-Röhrchen vereinigt und das Röhrchen wurde mit PBS aufgefüllt. Nach einer weiteren Zentrifugation (200 x g, 20°C, 5 min) wurde der Überstand abgesaugt und die markierten Zellen mit 14 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden zentrifugiert (200 x g, 20°C, 5 min), anschließend in 5 ml Kompletmedium resuspendiert und in einer T<sub>25</sub>-Zellkulturflasche ausgesät. Am darauffolgenden Versuchstag wurde die Zellzahl (Neubauer Zählkammer) bestimmt und die Zellkonzentration auf 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt.

### 3.4.10.3 Versuchsansatz zur Messung der Aktivität der natürlichen Killerzellen

Für die Versuchsdurchführung wurden die markierten YAC-1-Zellen auf eine Zellkonzentration von 1 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml verdünnt. Die Zellzahl der Effektorzellen wurde auf 2,5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt. Effektorzellen und markierte Zielzellen wurden gemäß Pipettierschema (Tab. 3.3) in FACS-Röhrchen pipettiert. Der Kontrollansatz enthielt ausschließlich Zielzellen und diente dazu den spontanen Zelltod der Zielzellen zu bestimmen.

**Tab. 3.3:** Pipettierschema der Testansätze (Angaben in µl)

Verhältnis Effektorzellen:YAC-1	Kompletmedium	Effektorzellen	Propidiumjodid	YAC-1-Suspension
Kontrolle	300	0	30	300
12,5:1	150	150	30	300



Die Ansätze wurden kurz gemischt und anschließend zentrifugiert (120 x g, 20°C, 2,5 min). Die Proben wurden für 135 min im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben lichtgeschützt auf Eis gestellt, um die Aktivität der NK-Zellen abzustoppen. Unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Messung wurden die Proben kurz gemischt.

Bei der Auswertung wurde im FL1 gegen FL3 Punktediagramm ein Fenster um alle lebenden und toten Zielzellen gesetzt. Der Kontrollansatz diente dazu im FL3-Histogramm einen Marker zu setzen, der alle apoptotischen und toten Zielzellen umfasste (Propidiumjodid färbt die DNA membrangeschädigter Zellen). Um die spezifische Aktivität der NK-Zellen zu bestimmen, wurde jeweils der Anteil der apoptotischen und toten Zielzellen des Kontrollansatzes vom Anteil des Probenansatzes subtrahiert.

#### 3.4.10.4 Kontrollansatz mit Pentoxifyllin

Dieser zusätzliche Kontrollansatz wurde für einen Teil der Immunzellen der Peyerschen Plaques durchgeführt. Die Ansätze wurden nach dem Pipettierschema (Tab. 3.4) in FACS-Röhrchen pipettiert. Die Zellsuspension der Effektorzellen wurde mit Komplettmedium und Pentoxifyllin gemischt und anschließend zentrifugiert (120 x g, 20°C, 2,5 min). Diese Proben wurden für 60 min im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Propidiumjodid und YAC-1-Suspension. Danach wurden diese Ansätze wie oben beschrieben (siehe 3.4.10.3) weiter behandelt.

Tab. 3.4: Pipettierschema mit Pentoxifyllin (Angaben in µl)

Verhältnis Effektorzellen:YAC-1	Komplettmedium	Effektorzellen	Pentoxifyllin	Propidiumjodid	YAC-1-Suspension
Kontrolle	290	0	10	30	300
12,5:1	140	150	10	30	300

#### 3.4.11 Messung der Proliferation

Die Messung der Proliferation wurde für die Immunzellen der Milz, der mesenterialen Lymphknoten und der Peyerschen Plaques durchgeführt.

Folgende Zellkonzentrationen wurden für diese Messung eingesetzt:

- Immunzellen der Milz: 5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml
- Immunzellen der mesenterialen Lymphknoten: 5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml
- Immunzellen der Peyerschen Plaques: 7 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml

Pro Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden 100 µl der Zellsuspension (Vierfachansatz) kultiviert. Die Zellen wurden mit je 100 µl Concanavalin A (ConA; Endkonzentration 1 µg/ml) stimuliert. Die Zellen wurden für 72 Stunden im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Zur Messung der Proliferation wurde ein enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), (Roche Diagnostics) verwendet. Dieser Assay detektiert, innerhalb einer bestimmten Zeit, die Aufnahme von markiertem 5-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU) in die Zelle. Der Proliferationsassay wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden 3 Stunden mit BrdU inkubiert. Die Inkubation mit dem BrdU-Antikörper erfolgte für 1 Stunde und die

Inkubationszeit für die Substratumsetzung betrug 20 min. Nach dem Abstoppen der Reaktion erfolgte eine Endpunkt-Messung bei 450 nm (Wellenlängenkorrektur bei 650 nm) in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät. Ein Loch des Vierfachansatzes wurde ohne BrdU inkubiert und diente als Hintergrund-Kontrolle. Aus den Werten dreier Parallelansätze wurde der Mittelwert gebildet und hiervon der Hintergrund-Wert subtrahiert.

### **3.4.12 Messung der Sekretion von Interleukin-10**

Die Konzentration von IL-10 wurde im Zellkulturüberstand der Immunzellen der Milz, der mesenterialen Lymphknoten und der Peyerschen Plaques gemessen. Alle Immunzellen wurden in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml kultiviert.

Pro Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden 100  $\mu$ l der Zellsuspension (Doppelansatz) kultiviert und die Zellen wurden mit 100  $\mu$ l ConA (Endkonzentration 5  $\mu$ g/ml) stimuliert. Die Zellen wurden für 24 Stunden im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte zentrifugiert (50 x g, 20°C, 5 min) und 110  $\mu$ l des Zellkulturüberstandes abgenommen (die Überstände des Doppelansatzes wurden vereinigt). Der abgenommene Überstand wurde bis zur Messung der Zytokinkonzentration bei -20°C eingefroren

Zur Messung von IL-10 wurde der OptEIA™ ELISA Reagenziensatz (BD Pharmingen) eingesetzt. Der ELISA wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Messung wurde jeweils im Doppelansatz durchgeführt.

### **3.4.13 Messung der Sekretion von Interferon- $\gamma$**

Die Konzentration von IFN- $\gamma$  wurde im Zellkulturüberstand der Immunzellen der Milz, der mesenterialen Lymphknoten und der Peyerschen Plaques gemessen.

Folgende Zellkonzentrationen wurden eingesetzt:

- Immunzellen der Milz:  $1 \times 10^6$  Zellen/ml
- Immunzellen der mesenterialen Lymphknoten:  $1 \times 10^6$  Zellen/ml
- Immunzellen der Peyerschen Plaques:  $5 \times 10^6$  Zellen/ml

Die Versuchsdurchführung erfolgte wie unter 3.4.12 beschrieben.

Zur Messung von IFN- $\gamma$  wurde der OptEIA™ ELISA Reagenziensatz (BD Pharmingen) verwendet. Die Durchführung des ELISA erfolgte überwiegend nach den Angaben des Herstellers. Abweichend hiervon wurde der biotinylierte Antikörper und das Meerrettichperoxidase-Substrat in einem Inkubationsschritt (Inkubationszeit: 1 Stunde) auf die Platte gegeben. Die Messung wurde jeweils im Doppelansatz durchgeführt.

### **3.4.14 Messung der SIgA-Konzentration im Darminhalt**

Die Konzentration von SIgA im Ileum- und im Caecum-Inhalt wurde mit Hilfe eines ELISAs gemessen.

#### **3.4.14.1 Probenaufbereitung des Ileum-Inhalts**

Der Ileum-Inhalt wurde aufgetaut. Zu 0,01 g der Probe wurde 1 ml 1 % BSA (in PBS) zugegeben, gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die

Probe zentrifugiert (4000 x g, Raumtemperatur, 30 min), der Probenüberstand abgenommen und bis zur weiteren Bestimmung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### **3.4.14.2 Probenaufbereitung des Caecum-Inhalts**

Die Probenaufbereitung erfolgte im Prinzip wie die Aufbereitung der Ileum-Proben. Abweichend hiervon wurden 0,14 g der Probe mit 1 ml 1 % BSA (in PBS) gemischt und inkubiert.

#### **3.4.14.3 SIgA ELISA**

Hierfür wurden 96-Loch-Mikrotiterplatten (MaxiSorp Surface) verwendet. Die Messung wurde jeweils im Doppelansatz durchgeführt. Da SIgA der Ratte als gereinigtes Protein nicht verfügbar war, wurde bei diesem ELISA keine Standardreihe bestimmt.

- Beschichtung der Platte mit Antikörper gegen die sekretorische Komponente (1:1000 verdünnt mit PBS/Tween 20), 100  $\mu\text{l}$  je Vertiefung. Inkubation über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Alle weiteren Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.
- Der Überstand wurde dekantiert und die Platte 5-mal mit PBS/Tween 20 gewaschen. Zur Blockierung freier Proteinbindungsstellen auf der Platte wurden 100  $\mu\text{l}$  4 % PTB, je Vertiefung, zugegeben. Inkubation für 1 Stunde.
- Der Überstand wurde dekantiert und die Platte 5-mal mit PBS/Tween 20 gewaschen.
- Es wurden 100  $\mu\text{l}$  der unverdünnten Probe aufgetragen. Inkubation für 2 Stunden.
- Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Meerrettichperoxidase-konjugiertem IgA Antikörper (1:500 verdünnt mit 4 % PTB). Inkubation für 2 Stunden.
- Der Überstand wurde dekantiert und die Platte 7-mal mit PBS/Tween 20 gewaschen.
- Substrat-Zugabe: je Vertiefung 100  $\mu\text{l}$  TMB Peroxidase Substrat. Inkubation für 30 min, lichtgeschützt.
- Die Enzymreaktion wurde mit 100  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  abgestoppt.
- Messung der relativen Menge von SIgA durch Messung der Absorption bei 450 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät.

### **3.5 Versuchsdesign der Tierstudie 2 A**

Diese Tierstudie wurde in Florenz (Italien) durchgeführt. Es wurden 110 männliche F344 Ratten (Harlan Nossan, Italien) verwendet. Aus logistischen Gründen wurden nur 60 Tiere bzw. ihre Organe in Deutschland untersucht. Die Tiere waren zu Versuchsbeginn 4-5 Wochen alt. Zehn Tage nach erstmaliger Fütterung mit der Versuchsdiät wurden die Tiere mit Azoxy-methan (15 mg/kg Körpergewicht) behandelt. Die Behandlung erfolgte zweimalig, im Abstand von einer Woche. Die Tiere erhielten insgesamt 33 Wochen lang die Versuchsdiät.

#### **3.5.1 Versuchsdiät**

Die Tiere erhielten die gleiche Versuchsdiät wie die Tiere der Tierstudie 1 (vgl. 3.4.1). Aus jeder Gruppe wurden 15 Tiere untersucht.

### **3.5.2 Präparation der Organe**

Am Versuche wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> getötet. Die Präparation der Organe wurde wie unter 3.4.2 beschrieben durchgeführt. Es wurden jedoch keine Blutproben entnommen. Die Organe wurden in Florenz präpariert und eisgekühlt, innerhalb von 24 Stunden, nach Karlsruhe verschickt. Der Darminhalt war in dieser Studie für die immunologischen Untersuchungen nicht verfügbar.

### **3.5.3 Isolierung der Immunzellen der Organe**

Die Isolierung der Immunzellen erfolgte wie unter 3.4.4, 3.4.5 und 3.4.6 beschrieben.

### **3.5.4 Lymphozytensubpopulationen**

Der Anteil der Zellen, die den Korezeptor CD4 oder CD8 exprimieren, wurde für die Immunzellen der Milz und der mesenterialen Lymphknoten gemessen. Die Durchführung dieser Messung erfolgte wie unter 3.4.7 beschrieben.

### **3.5.5 Messung der Phagozytoseaktivität**

Die Phagozytoseaktivität wurde für die Immunzellen der Milz gemessen. Die Messung erfolgte wie unter 3.4.8 beschrieben.

### **3.5.6 Messung der Aktivität der natürlichen Killerzellen**

Die Aktivität der NK-Zellen wurde für die Immunzellen der Milz, der mesenterialen Lymphknoten und der Peyerschen Plaques gemessen. Die Durchführung erfolgte wie unter 3.4.10 beschrieben.

### **3.5.7 Messung der Proliferation**

Die Messung der Proliferation wurde für die Immunzellen der Milz, der mesenterialen Lymphknoten und der Peyerschen Plaques durchgeführt. Die Durchführung erfolgte wie unter 3.4.11 beschrieben.

### **3.5.8 Messung der Sekretion von Interleukin-10**

Die Konzentration von IL-10 wurde im Zellkulturüberstand der Immunzellen der Milz, der mesenterialen Lymphknoten und der Peyerschen Plaques gemessen. Die Messung erfolgte wie unter 3.4.12 beschrieben.

### 3.5.9 Messung der Sekretion von Interferon- $\gamma$

Die Konzentration von IFN- $\gamma$  wurde im Zellkulturüberstand der Immunzellen der Milz, der mesenterialen Lymphknoten und der Peyerschen Plaques gemessen. Die Messung wurde wie unter 3.4.13 beschrieben durchgeführt.

### 3.6 Versuchsdesign der Tierstudie 2 B

Diese Tierstudie wurde parallel und entsprechend der Tierstudie 2 A durchgeführt, vgl. 3.5. Es wurden insgesamt 18 Tiere verwendet (Kontroll- und PRO-Gruppe: je 4 Tiere, PRÄ- und SYN-Gruppe: je 5 Tiere). Abweichend von der Tierstudie 2 A wurden diese Tiere jedoch nicht mit Azoxymethan behandelt.

Die Tiere erhielten die gleiche Versuchsdät, vgl. 3.5.1. Die Präparation der Organe, die Isolierung der Immunzellen und die verschiedenen Messungen wurden entsprechend der Tierstudie 2 A durchgeführt, vgl. 3.5.2-3.5.9.

### 3.7 Versuchsdesign der Humanstudie

Die Humanstudie wurde in Cork (Irland), als Doppelblind-Studie mit zwei Patientengruppen, durchgeführt. Die erste Gruppe bestand aus 34 Patienten mit resezierten Darmtumoren (innerhalb der letzten 5 Jahre). Die zweite Gruppe bestand aus 40 Patienten mit bereits resezierten Darmpolypen (innerhalb der letzten 5 Jahre) oder noch zu entfernenden Darmpolypen. Beide Patientengruppen wurden in zwei Behandlungsgruppen unterteilt: Kontrollgruppe (KON) und Synbiotikum-Gruppe (SYN). Die anthropometrischen Daten der Patientengruppen sind in **Tab. 3.5** dargestellt. Die Patienten der Kontrollgruppe erhielten für jeden Versuchstag eine Kapsel mit Maltodextrin sowie ein Tütchen mit 10 g Maltodextrin. Die Patienten der SYN-Gruppe erhielten für jeden Versuchstag, zur gleichzeitigen Einnahme, eine Kapsel mit LGG ( $1 \times 10^{10}$  cfu) und BB12 ( $1 \times 10^{10}$  cfu) sowie ein Tütchen mit 10 g Raftilose<sup>®</sup> Synergy1. Die Versuchsdauer betrug 12 Wochen. Die Patienten bekamen Kapseln und Tütchen für jeweils 6 Wochen ausgehändigt.

**Tab. 3.5:** Anthropometrische Daten der Patientengruppen. MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung

Parameter	Krebspatienten		Patienten mit Polypen	
	KON	SYN	KON	SYN
<b>Geschlecht</b>	10 Männer 5 Frauen	11 Männer 8 Frauen	14 Männer 7 Frauen	8 Männer 11 Frauen
<b>Alter in Jahren (MW <math>\pm</math> SD)</b>	61 $\pm$ 5	61 $\pm$ 6	60 $\pm$ 10	54 $\pm$ 8
<b>BMI (MW <math>\pm</math> SD)</b>	23 $\pm$ 4	25 $\pm$ 5	24 $\pm$ 3	24 $\pm$ 4

Am 1. Tag der Intervention (T 1) gaben die Probanden eine Blut- und eine Stuhlprobe. Nach 6 Wochen (T 2) sowie nach 12 Wochen (T 3) gaben die Probanden weitere Blut- und Stuhlproben.

Aus logistischen Gründen wurde die Messung der Phagozytoseaktivität und des oxidativen Burst in Cork durchgeführt. Die Isolierung, Stimulierung und Kryokonservierung der mononukleären Zellen erfolgte ebenfalls in Cork. Die Zellkulturüberstände der stimulierten Zellen wurden auf Trockeneis (innerhalb von 24 Stunden) nach Karlsruhe versandt, um hier die Zytokinkonzentrationen der Überstände zu messen. Die kryokonservierten mononukleären Zellen wurden ebenfalls auf Trockeneis nach Karlsruhe versandt, um hier die Aktivität der NK-Zellen zu messen.

### **3.7.1 Isolierung der mononukleären Zellen des Blutes**

Zur Isolierung der mononukleären Zellen des Blutes wurden 4,5 ml Vollblut mit 3 ml PBS gemischt. Zur Herstellung des Dichtegradienten wurde das verdünnte Blut über Lymphoprep geschichtet und anschließend zentrifugiert (400 x g, 20°C, 20 min). Mit einer Pasteurpipette wurde die Phase der mononukleären Zellen abgenommen, in ein 15 ml Polypropylen-Röhrchen überführt und mit PBS aufgefüllt. Die Zellen wurden zentrifugiert (400 x g, 20°C, 10 min), der Überstand abgesaugt und in 14 ml PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (400 x g, 20°C, 10 min) und Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 2 ml Kompletmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

### **3.7.2 Kryokonservierung der mononukleären Zellen**

Die isolierten mononukleären Zellen wurden zentrifugiert (400 x g, 20°C, 10 min) und anschließend in Einfriermedium aufgenommen (Konzentration:  $2 \times 10^7$  Zellen/ml). Jeweils 300 µl dieser Zellsuspension wurden in ein Kryoröhrchen pipettiert. Um ein langsames Abkühlen der Zellen zu gewährleisten, wurden sie in einem Kryo-Einfriergerät (befüllt mit Isopropylalkohol) bei -80°C über Nacht eingefroren. Anschließend wurden die Zellen, bis zur Versendung nach Karlsruhe, in flüssigem Stickstoff gelagert. In Karlsruhe wurden die Zellen über Nacht bei -80°C gelagert und bis zur weiteren Versuchsdurchführung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

### **3.7.3 Aufbereitung von Fäzeswasser**

Die komplette Menge eines Stuhlganges wurde gesammelt, gewogen und 1:1 mit eiskaltem DMEM verdünnt. Die Probe wurde 2 min homogenisiert (Stomacher). Anschließend wurde das Homogenat in Ultrazentrifugen-Röhrchen überführt und zentrifugiert (60.000 x g, 4°C, 2 Stunden). Der erhaltene Überstand wurde steril filtriert (0,45 µm Glasfaserfilter, Nalgene), aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### **3.7.4 Messung der Phagozytoseaktivität**

Die Phagozytoseaktivität der Immunzellen des Blutes wurde am Durchflusszytometer gemessen.

### 3.7.4.1 Oponisierung der *E. coli*

Die mit dem Farbstoff BODYPY FL (Emission 513 nm) markierten *E. coli* wurden nach den Angaben des Herstellers opsonisiert. Die opsonisierten *E. coli* wurden aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für den Versuchsansatz wurden die *E. coli* aufgetaut, im Ultraschallbad vereinzelt, die Lösung 1:8 mit PBS verdünnt und anschließend auf Eis vorgekühlt.

### 3.7.4.2 Versuchsansatz zur Messung der Phagozytoseaktivität

Für jede Probe wurde eine Negativkontrolle und ein Testansatz gemessen. Pro Ansatz wurden 100  $\mu\text{l}$  Vollblut in ein FACS-Röhrchen pipettiert und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 5  $\mu\text{l}$  der gekühlten, opsonisierten *E. coli*-Suspension zugegeben und gemischt. Der Kontrollansatz verblieb auf Eis. Der Testansatz wurde für 10 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einem geschlossenen Wasserbad inkubiert. Um das Signal der nicht aufgenommenen, adhärenen *E. coli* zu quenchen, wurden 100  $\mu\text{l}$  eiskalte Quenchlösung in beide Ansätze pipettiert und gemischt. Die Zellen wurden durch Zugabe von 3 ml PBS und anschließender Zentrifugation (250 x g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 5 min) gewaschen. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Anschließend erfolgte die Lyse der Erythrozyten und die Fixierung der Leukozyten durch Zugabe von 2 ml 1x Lysing Solution, kurzem Mischen und anschließender Inkubation von 20 min (Raumtemperatur, Dunkelheit). Die Ansätze wurden zentrifugiert (250 x g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 5 min), auf Eis gestellt, der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden zentrifugiert (250 x g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 5 min) und der Überstand abgesaugt. Bis zur durchflusszytometrischen Messung verblieben die Proben auf Eis. Vor der Messung wurden 300  $\mu\text{l}$  der DNA-Färbelösung Propidiumjodid (33,3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zugegeben und die Ansätze für 10 min lichtgeschützt auf Eis inkubiert.

Bei der Auswertung wurde die Leukozytenpopulation im FL3-Histogramm durch ein Fenster eingegrenzt. Die neutrophilen Granulozyten und Monozyten wurden im FSC gegen SSC Punktediagramm unterschieden. Im FL1-Histogramm wurde anhand der Negativkontrolle ein Marker gesetzt, um zwischen BODYPY FL-positiven und BODYPY FL-negativen Zellen zu unterscheiden. Dieser Marker wurde für die Auswertung der jeweiligen Probe beibehalten. Es wurden der prozentuale Anteil der phagozytierenden Zellen und deren mittlere Fluoreszenzintensität (entspricht hier der Zahl aufgenommener Bakterien pro Zelle) gemessen.

### 3.7.5 Messung des oxidativen Burst

Der oxidative Burst der Immunzellen des Blutes wurde durchflusszytometrisch gemessen.

Für jede Probe wurde ein Kontrollansatz und ein Ansatz mit starkem Stimulus gemessen. Die Menge der gebildeten ROS wurde anhand der oxidierten Menge DHR gemessen. Pro Ansatz wurden 100  $\mu\text{l}$  Vollblut in ein FACS-Röhrchen pipettiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Zu den Proben wurden 20  $\mu\text{l}$  PBS (Kontrolle) oder 20  $\mu\text{l}$  PMA (starker Stimulus) gegeben. Die Ansätze wurden gemischt und im geschlossenen Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Proben wurden auf Eis gestellt, jeweils 1,7  $\mu\text{l}$  DHR-Stammlösung zugegeben, gemischt und erneut für 10 min im geschlossenen Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurden die Proben auf Eis gestellt. Um die Erythrozyten zu lysieren und die Leukozyten zu fixieren, wurden 2 ml 1x Lysing Solution zugegeben und die Ansätze für 20 min (Raumtemperatur, Dunkelheit) inkubiert. Nach Zentrifugation der Proben (250 x g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 5 min), wurde der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden mit 3 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (250 x g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 5 min). Die Proben wurden auf Eis gestellt und der Überstand abgesaugt.

Zu den Ansätzen wurden 300 µl Propidiumjodid (33,3 µg/ml) gegeben. Anschließend wurden sie für 10 min auf Eis inkubiert. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte innerhalb von 30 min.

Bei der Auswertung wurde im FL3-Histogramm ein Fenster um die Leukozytenpopulation gesetzt. Neutrophile Granulozyten und Monozyten wurden im FSC gegen SSC Punktediagramm unterschieden. Anhand des Kontrollansatzes wurde im FL1-Histogramm ein Marker gesetzt, um zwischen Rhodamin-positiven und Rhodamin-negativen Zellen zu unterscheiden. Dieser Marker wurde für die Auswertung des stimulierten Ansatzes beibehalten. Der prozentuale Anteil der Zellen, die ROS produziert hatten (hierbei wurde der Kontrollwert von dem Probenwert des starken Stimulus subtrahiert) sowie deren mittlere Fluoreszenzintensität (entspricht hier der Enzymaktivität pro Zelle) wurden gemessen.

### **3.7.6 Messung der Aktivität der natürlichen Killerzellen**

Die Messung der Aktivität der NK-Zellen erfolgte am Durchflusszytometer. Als Effektorzellen wurden kryokonservierte mononukleäre Zellen verwendet (nach Fujiwara *et al.*, 1986).

#### **3.7.6.1 Kultivierung der Zielzellen K-562**

K-562-Zellen (ACC 10, DMSZ Braunschweig) sind Suspensionszellen, die aus dem Pleuraerguss einer Patientin mit chronisch-myeloischer Leukämie isoliert wurden. Sie werden als Zielzellen zur Messung der Aktivität humaner NK-Zellen eingesetzt (DMSZ, 2002).

Die Kultivierung der K-562-Zellen erfolgte in Kompletmedium. Die Zellen wurden im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Subkultivierung erfolgte jeden zweiten Tag. Die Zellzahl und Vitalität wurde bei jeder Subkultivierung, nach Färbung mit Trypanblau, in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Polypropylen-Röhrchen überführt und zentrifugiert (205 x g, 20°C, 5 min). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 10 ml Kompletmedium (im Wasserbad auf 37°C erwärmt) resuspendiert und in einer Konzentration von 5 x 10<sup>6</sup> Zellen/20 ml Medium in T<sub>80</sub>-Zellkulturflaschen ausgesät.

#### **3.7.6.2 Markierung der Zielzellen K-562**

Für die Markierung der Zielzellen wurde eine separate T<sub>80</sub>-Zellkulturflasche (Zellkonzentration 1 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml) verwendet, die bei der Subkultivierung ausgesät worden war. Die Zellen wurde jeweils am Tag der Versuchsdurchführung mit DiO markiert. Die Markierung der K-562-Zielzellen wurde identisch zur Markierung der YAC-1-Zielzellen durchgeführt (vgl. 3.4.10.2).

#### **3.7.6.3 Rekultivierung kryokonservierter humaner mononukleärer Zellen**

Die Zellen wurden in den Einfrierröhrchen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, umgehend in ein 15 ml Polypropylen-Röhrchen mit 10 ml Kompletmedium überführt und durch kurzes Schwenken gemischt. Die Zellen wurden zentrifugiert (400 x g, 20°C, 10 min). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen wurden in 3 ml Kompletmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in 12-Loch-Zellkulturplatten für 18 Stunden im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Danach wurden die Zellen in ein 15 ml



Polypropylen-Röhrchen überführt und zentrifugiert (400 x g, 20°C, 10 min). Das Zellpellet wurde in 1 ml Komplettmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde am Coulter Z2 gemessen und die Konzentration auf  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

### 3.7.6.4 Versuchsansatz zur Messung der Aktivität der natürlichen Killerzellen

Für die Versuchsdurchführung wurden die markierten K-562-Zellen auf eine Zellkonzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml verdünnt. Effektorzellen und markierte Zielzellen wurden gemäß Pipettierschema (Tab. 3.6) in FACS-Röhrchen pipettiert. Der Kontrollansatz enthielt ausschließlich Zielzellen und diente dazu den spontanen Zelltod der Zielzellen zu bestimmen.

Tab. 3.6: Pipettierschema der Testansätze (Angaben in  $\mu\text{l}$ )

Verhältnis Effektorzellen:K-562	Komplett-medium	Effektorzellen	Propidium-jodid	K-562-Suspension
Kontrolle	200	0	20	200
12,5:1	100	100	20	200

Die Durchführung des Versuches und die Messung am Durchflusszytometer erfolgte identisch zu der Messung der Aktivität der NK-Zellen der Ratte (vgl. 3.4.10.3).

### 3.7.7 Stimulation der mononukleären Zellen zur Zytokinsekretion

Die Zellzahl der isolierten mononukleären Zellen wurde auf  $1 \times 10^9$  Zellen/ml eingestellt. Pro Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden 100  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension (Doppelansatz) kultiviert. Um die Zellen zur Ausschüttung der verschiedenen Zytokine zu stimulieren wurden unterschiedliche Mitogene verwendet.

#### Stimulation der IL-2- und IFN- $\gamma$ -Sekretion:

Die Zellen wurden mit 100  $\mu\text{l}$  ConA (Endkonzentration 5  $\mu\text{g/ml}$ ) zur Zytokinsekretion angeregt.

#### Stimulation der TNF- $\alpha$ - und IL-12-Sekretion:

Die Stimulation der Zellen erfolgte mit 100  $\mu\text{l}$  Lipopolysaccharid (LPS) (Endkonzentration 1 ng/ml).

#### Stimulation der IL-10-Sekretion:

Um die Sekretion von IL-10 anzuregen wurden 100  $\mu\text{l}$  Lektin von *Phaseolus vulgaris* (PHA) (Endkonzentration 1  $\mu\text{g/ml}$ ) zugegeben.

Die Zellen wurden für 24 Stunden im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte zentrifugiert (200 x g, 20°C, 5 min) und 110  $\mu\text{l}$  des Zellkulturüberstandes abgenommen (die Überstände des Doppelansatzes wurden vereinigt). Der abgenommene Überstand wurde bis zur Messung der Zytokinkonzentration bei -80°C eingefroren.

### 3.7.8 Messung der Sekretion von Interleukin-2

Die Konzentration von IL-2 im Zellkulturüberstand wurde mit Hilfe eines ELISAs gemessen. Hierfür wurden 96-Loch-Mikrotiterplatten (MaxiSorp Surface) verwendet. Die Messung wurde jeweils im Doppelansatz durchgeführt.

- Beschichtung der Platte mit IL-2-Beschichtungs-Antikörper (3 µg/ml PBS), 50 µl je Vertiefung. Inkubation über Nacht bei 4°C.  
Alle weiteren Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.
- Der Überstand wurde dekantiert und die Platte 5-mal mit PBS/Tween 20 gewaschen.
- Zur Blockierung freier Proteinbindungsstellen auf der Platte wurden 100 µl 2 % PTB, je Vertiefung, zugegeben. Inkubation für 1 Stunde.
- Der Überstand wurde dekantiert und die Platte 5-mal mit PBS/Tween 20 gewaschen.
- Die Proben wurden unverdünnt aufgetragen, in einem Volumen von 50 µl je Vertiefung. Die IL-2-Standard-Reihe (10 ng/µl, Verdünnung in Kompletmedium) wurde in den Konzentrationen 2.000; 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 0 pg/ml, ebenfalls 50 µl je Konzentration aufgetragen. Inkubation für 2 Stunden.
- Zugabe des biotinylierten, monoklonalen IL-2-Antikörpers (eingesetzte Konzentration 50 ng/ml, Verdünnung in 2 % PTB), 50 µl je Vertiefung. Inkubation für 2 Stunden.
- Der Überstand wurde dekantiert und die Platte 5-mal mit PBS/Tween 20 gewaschen.
- Zugabe von Meerrettichperoxidase-Streptavidin (1:200 verdünnt in 2 % PTB), 100 µl je Vertiefung. Inkubation für 30 min.
- Der Überstand wurde dekantiert und die Platte 5-mal mit PBS gewaschen.
- Substrat-Zugabe: je Vertiefung 100 µl TMB Peroxidase Substrat. Inkubation für 30 min, lichtgeschützt.
- Die Enzymreaktion wurde mit 100 µl 1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> abgestoppt.
- Endpunkt-Messung bei 450 nm (Wellenlängenkorrektur bei 570 nm), im Mikrotiterplatten-Lesegerät.

### 3.7.9 Messung der Sekretion von Interleukin-10

Die Konzentration von IL-10 im Zellkulturüberstand wurde mit dem CytoSets™ ELISA Reagenziensatz (Biosource) gemessen.

Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Es wurde 0,5 % PTB als Blockierungssubstanz verwendet. Die Messung wurde im Doppelansatz durchgeführt.

### 3.7.10 Messung der Sekretion von Interleukin-12

Für die Messung der Konzentration von IL-12 im Zellkulturüberstand wurde der CytoSets™ ELISA Reagenziensatz (Biosource) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Als Blockierungssubstanz wurde 0,5 % PTB verwendet und die Probenbestimmung wurde im Doppelansatz durchgeführt.

### 3.7.11 Messung der Sekretion von Tumornekrosefaktor-α

Die Konzentration von TNF-α im Zellkulturüberstand wurde mit dem CytoSets™ ELISA Reagenziensatz (Biosource) gemessen. Der ELISA wurde entsprechend den Angaben des

Herstellers durchgeführt. Als Blockierungssubstanz wurde 0,5 % PTB verwendet. Die Messung der Proben erfolgte im Doppelansatz.

### **3.7.12 Messung der Sekretion von Interferon- $\gamma$**

Zur Messung der Konzentration von IFN- $\gamma$  im Zellkulturüberstand wurde der DuoSet ELISA Reagenziensatz (R+D Systems) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Proben wurden jeweils im Doppelansatz bestimmt. Als Verdünnungsmittel für die Reagenzien wurde 0,1 % BSA, 0,05 % Tween 20 in Tris-gepuffertem Salz (20 mM Trizma Base, 150 mM NaCl) ohne Ziegen Serum verwendet.

### **3.7.13 Messung von Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 in Fäzeswasser**

Die Messung der Konzentration von TGF- $\beta$ 1 in Fäzeswasser wurde mit dem DuoSet ELISA Reagenziensatz (R+D Systems) durchgeführt. TGF- $\beta$ 1 liegt in inaktiver Form vor und muss vor der Messung aktiviert werden. Für die Aktivierung wurde das Fäzeswasser zentrifugiert (2.500 x g, Raumtemperatur, 5 min). Es wurden 80  $\mu$ l der Probe abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 80  $\mu$ l 2,5 M Essigsäure/10 M Harnstoff zugegeben, gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Neutralisierung der Probe wurden 80  $\mu$ l 2,7 M NaOH/1 M HEPES zugegeben und gemischt. Im Anschluss daran wurden die aktivierten Proben analysiert. Die Durchführung des ELISAs erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

### **3.7.14 Messung von Prostaglandin E<sub>2</sub> in Fäzeswasser**

Um die Konzentration von PGE<sub>2</sub> in Fäzeswasser zu messen, muss die Probe über eine C18 Säule aufgereinigt werden. Das Fäzeswasser wurde zentrifugiert (2.500 x g, Raumtemperatur, 5 min). 100  $\mu$ l der Probe wurden 1:10 mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> verdünnt und gemischt. Die verdünnte Probe wurde filtriert (0,2  $\mu$ m). Zu 500  $\mu$ l der filtrierten Probe wurden 500  $\mu$ l kaltes Wasser-Ethanol-Gemisch (1:4) und 10  $\mu$ l Eisessig zugegeben und gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min (Raumtemperatur) wurden die Ansätze zentrifugiert (2.500 x g, Raumtemperatur, 5 min). Die Säule wurde mit 10 % Ethanol (2 Säulenvolumen) aktiviert. Anschließend wurde die Probe auf die Säule gegeben. Die Säule wurde mit H<sub>2</sub>O (1 Säulenvolumen) und Hexan (1 Säulenvolumen) gewaschen. PGE<sub>2</sub> wurde mit 3 ml Ethylacetat aus der Säule eluiert. Das Eluat wurde in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Das erhaltene Pellet wurde bis zur Messung bei -80°C gelagert.

Für die Messung wurde ein Enzymimmunoassay Reagenziensatz (Amersham) verwendet. Hierfür wurde das Probenpellet in 500  $\mu$ l Assaypuffer aufgenommen. Der Assay wurde nach den Angaben des Herstellers (Protokoll 1) durchgeführt.

### **3.8 Statistische Auswertung der Daten**

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde StatView (SAS Institute 1998, Cary, NC, USA) verwendet.

Die Daten der Tierstudien wurden auf Fütterungseffekte mit der Varianzanalyse (ANOVA) untersucht. Die Fütterungsgruppen PRO, PRÄ oder SYN wurden mit dem Tukey-Kramer Test auf Unterschiede zur Kontrollgruppe getestet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

Die Daten der Humanstudie wurden auf Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und SYN-Gruppe sowie den drei untersuchten Zeitpunkten mit der Varianzanalyse (wiederholte Messungen ANOVA) und Tukey-Kramer-Test untersucht. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt. Zusätzlich wurde die SYN-Gruppe und die Kontrollgruppe nach Geschlecht, BMI und Dukes-Klassifikation (Krebspatienten) unterschieden und auf signifikante Unterschiede mit der Varianzanalyse (wiederholte Messung ANOVA) untersucht. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

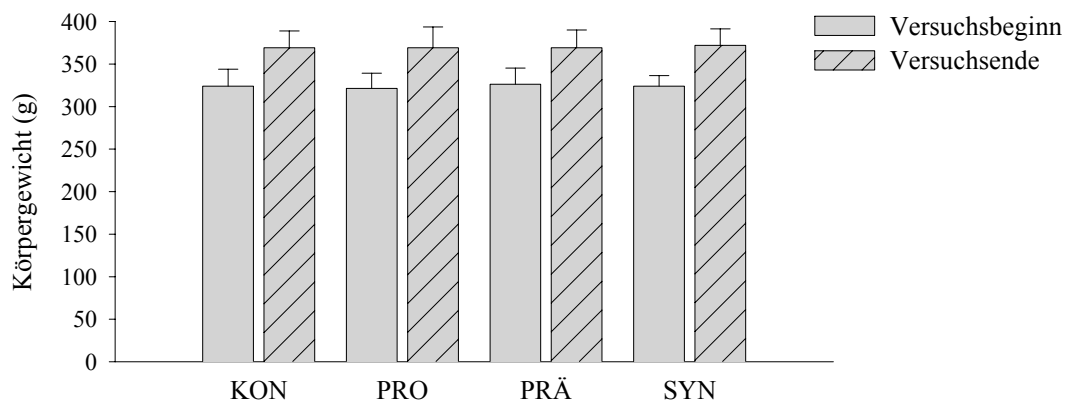
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Tierstudie 1

In dieser Studie wurden die Versuchstiere (F344 Ratten) vier Wochen lang mit dem Kontrollfutter (KON), den Probiotika LGG und BB12 (PRO), dem Präbiotikum Raftilose® Synergy1 (PRÄ) oder dem Synbiotikum (SYN; Kombination von PRO und PRÄ) gefüttert. In jeder Versuchsgruppe waren 20 Tiere. Aus technischen Gründen war es nicht immer möglich die verschiedenen Messungen für alle Versuchstiere bzw. alle Organe durchzuführen. Infolge dessen ist die Anzahl der Versuchstiere (n) pro Gruppe und gemessenem Parameter nicht immer gleich. Die Einzelwerte und n sind im Tabellenanhang angegeben. In den Diagrammen sind die Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichungen (SD) dargestellt.

#### 4.1.1 Körpergewicht

Das durchschnittliche Gewicht der Versuchstiere betrug zu Beginn des Versuches 323,9 g ( $\pm$  17,2 g) und am Ende des Versuches 369,9 g ( $\pm$  20,8 g). Das Gewicht der PRO-, PRÄ- bzw. SYN-ernährten Versuchstiere unterschied sich weder zu Beginn noch am Ende des Versuches vom Gewicht der Kontrolltiere (**Abb. 4.1**).

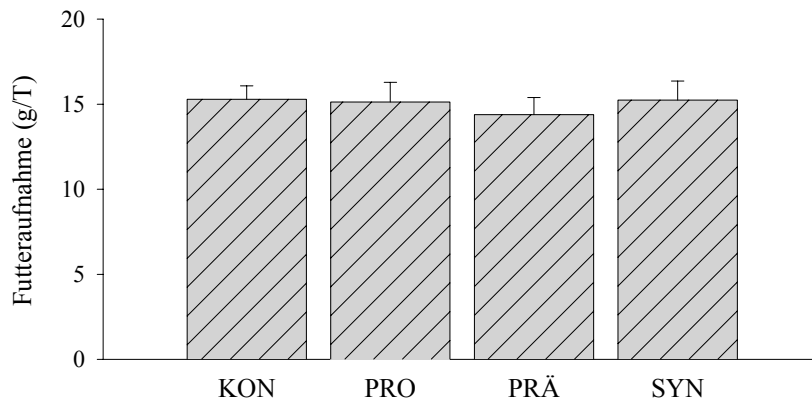


**Abb. 4.1:** Körpergewicht der Versuchstiere zu Beginn des Versuches und nach 4-wöchiger Aufnahme von KON, PRO, PRÄ oder SYN. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.1.

#### 4.1.2 Futteraufnahme

Futter und Wasser wurden *ad libidum* verabreicht. Die Fütterung der Tiere mit den unterschiedlichen Versuchsdieten (KON, PRO, PRÄ oder SYN) beeinflusste die Futteraufnahme nicht. Die Versuchstiere nahmen täglich 15,0 g ( $\pm$  1,1 g) auf (**Abb. 4.2**).

Die Tiere der PRO- und der SYN-Gruppe nahmen pro Tag  $\sim 7,2 \times 10^9$  cfu *Lactobacillus rhamnosus* GG und  $\sim 7,5 \times 10^9$  cfu *Bifidobacterium lactis* BB12 auf. Die tägliche Aufnahme von Raftilose® Synergy1 betrug in der PRÄ- und in der SYN-Gruppe  $\sim 1,5$  g.



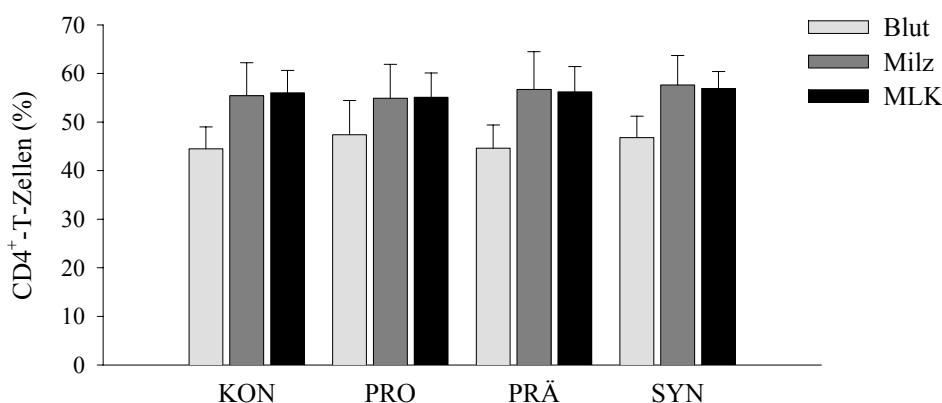
**Abb. 4.2:** Futteraufnahme pro Tag und Tier während der 4-wöchigen Fütterung mit KON, PRO, PRÄ oder SYN. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.2.

### 4.1.3 Lymphozytensubpopulationen

Für die Lymphozyten des Blutes, der Milz und der mesenterialen Lymphknoten (MLK) wurde der Anteil der T-Zellen gemessen, die den Korezeptor CD4 (CD4<sup>+</sup>-T-Zellen) oder CD8 (CD8<sup>+</sup>-T-Zellen) exprimieren.

#### 4.1.3.1 CD4<sup>+</sup>-T-Zellen

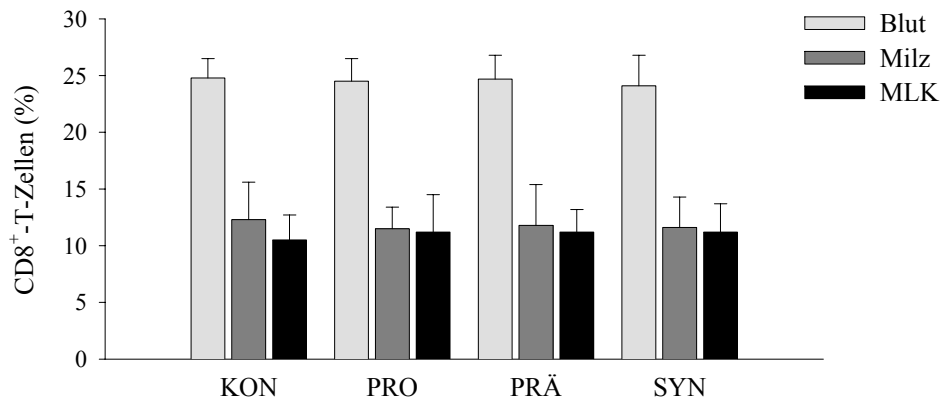
Der Anteil der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut, in der Milz und in den MLK war in den Fütterungsgruppen PRO, PRÄ und SYN nicht verschieden zur Kontrollgruppe (**Abb. 4.3**).



**Abb. 4.3:** Prozentualer Anteil der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen der Lymphozyten des Blutes, der Milz und der MLK. Die Versuchstiere wurden 4 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.3.

#### 4.1.3.2 CD8<sup>+</sup>-T-Zellen

Der Anteil der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut und in den untersuchten Organen wurde durch die Fütterung der Versuchstiere mit PRO, PRÄ oder SYN nicht beeinflusst (**Abb. 4.4**).



**Abb. 4.4:** Prozentualer Anteil der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen der Lymphozyten des Blutes, der Milz und der MLK. Die Versuchstiere wurden 4 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.4.

#### 4.1.3.3 Verhältnis CD4<sup>+</sup>-T-Zellen/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen

Das Verhältnis von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurde weder im Blut noch in der Milz oder den MLK durch die Fütterung der Versuchstiere signifikant beeinflusst. Jedoch führte die Fütterung der Versuchstiere mit PRO oder SYN tendenziell zu einem höheren Verhältnis CD4<sup>+</sup>-T-Zellen/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut (Fütterungseffekt  $p = 0,085$ ) (**Tab. 4.1**).

**Tab. 4.1:** Verhältnis CD4<sup>+</sup>-T-Zellen/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen der Lymphozyten des Blutes, der Milz und der MLK. Die Versuchstiere wurden 4 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. <sup>1</sup>: Fütterungseffekt  $p = 0,085$ . Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.5.

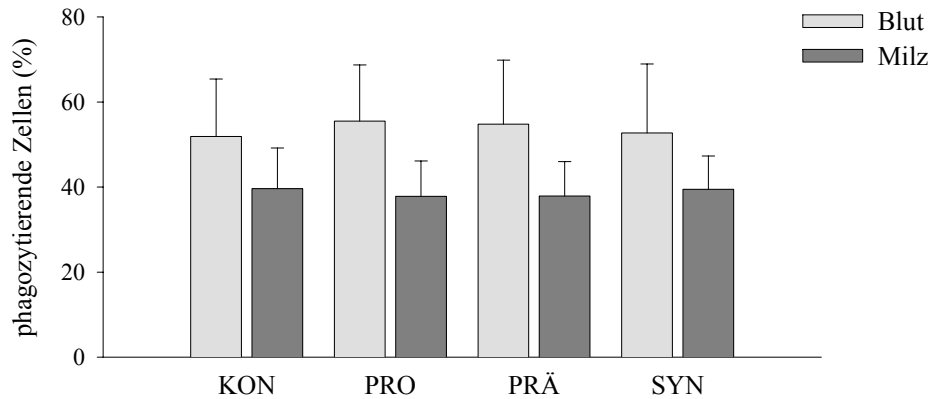
	KON	PRO	PRÄ	SYN
<b>Blut<sup>1</sup></b>	1,80 ± 0,22	1,95 ± 0,35	1,81 ± 0,16	1,95 ± 0,21
<b>Milz</b>	4,79 ± 1,30	4,89 ± 0,97	5,63 ± 3,62	5,25 ± 1,60
<b>MLK</b>	5,62 ± 1,48	5,38 ± 1,91	5,25 ± 1,41	5,39 ± 1,47

#### 4.1.4 Phagozytoseaktivität

Die Phagozytoseaktivität wurde für die Immunzellen des Blutes und der Milz gemessen. Hierbei wurden neutrophile Granulozyten und Monozyten getrennt betrachtet. Das Maß für die Phagozytoseaktivität ist der Anteil der Zellen, die opsonisierte *E. coli* aufgenommen haben.

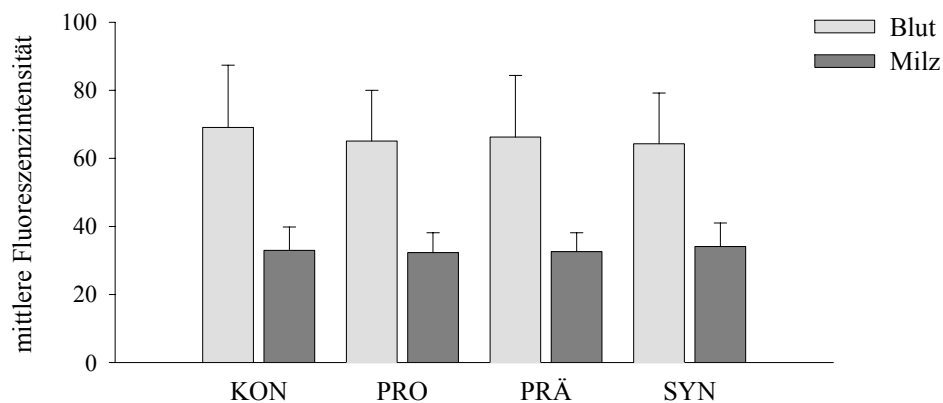
#### 4.1.4.1 Phagozytoseaktivität der neutrophilen Granulozyten

Die Fütterung der Versuchstiere mit PRO, PRÄ oder SYN beeinflusste weder im Blut noch in der Milz die Phagozytoseaktivität der Granulozyten (**Abb. 4.5**).



**Abb. 4.5:** Anteil phagozytierender Zellen der Granulozytenpopulation des Blutes bzw. der Milz. Die Versuchstiere wurden 4 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.6 und Tab. 8.7.

Für die phagozytierenden Granulozyten wurde die mittlere Fluoreszenzintensität gemessen. Die mittlere Fluoreszenzintensität ist ein Maß für die Zahl aufgenommener Bakterien pro aktivem Phagozyt. Die mittlere Fluoreszenzintensität wurde durch die unterschiedliche Fütterung der Versuchstiere nicht beeinflusst (**Abb. 4.6**).

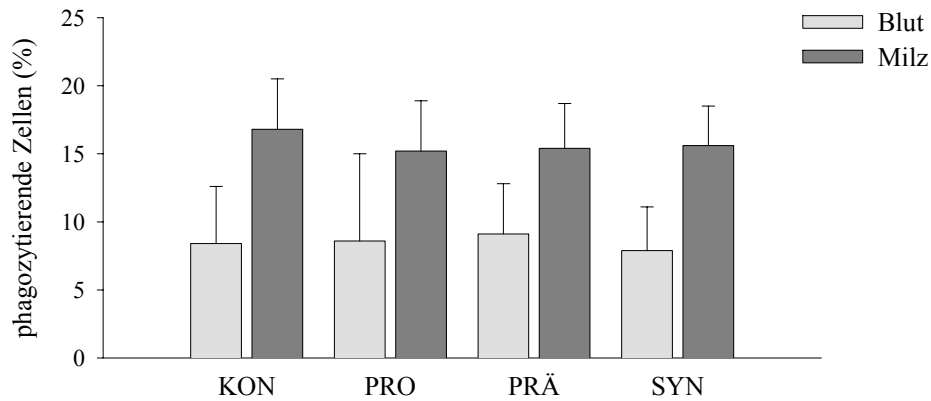


**Abb. 4.6:** Mittlere Fluoreszenzintensität der aktiven Granulozyten des Blutes bzw. der Milz. Die Versuchstiere wurden 4 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.6 und Tab. 8.7.



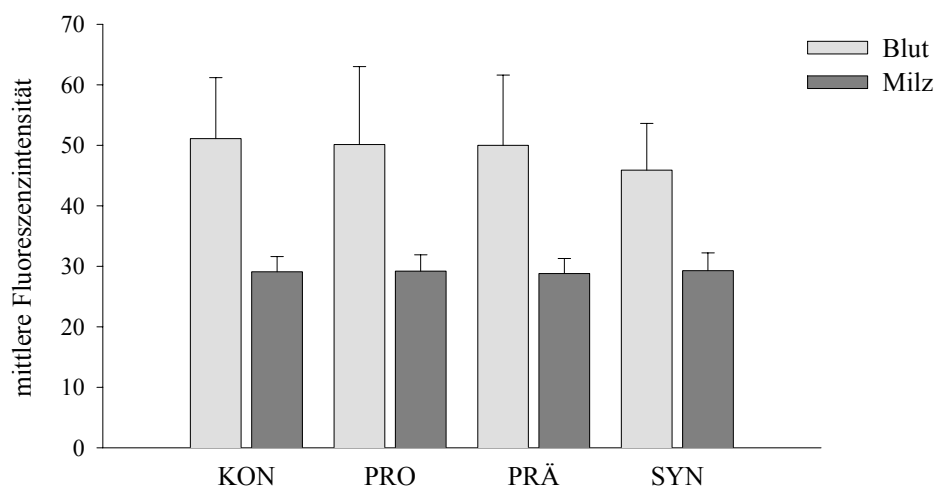
#### 4.1.4.2 Phagozytoseaktivität der Monozyten

Die Bestimmung der Phagozytoseaktivität der Monozyten im Blut und in der Milz zeigte keinen Unterschied zwischen den Fütterungsgruppen PRO, PRÄ oder SYN und der Kontrollgruppe (**Abb. 4.7**).



**Abb. 4.7:** Anteil phagozytischer Zellen der Monozytenpopulation des Blutes bzw. der Milz. Die Versuchstiere wurden 4 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.6 und Tab. 8.7.

Die Fütterung der Versuchstiere mit PRO, PRÄ oder SYN beeinflusste die mittlere Fluoreszenzintensität der aktiven Monozyten des Blutes bzw. der Milz nicht (**Abb. 4.8**).

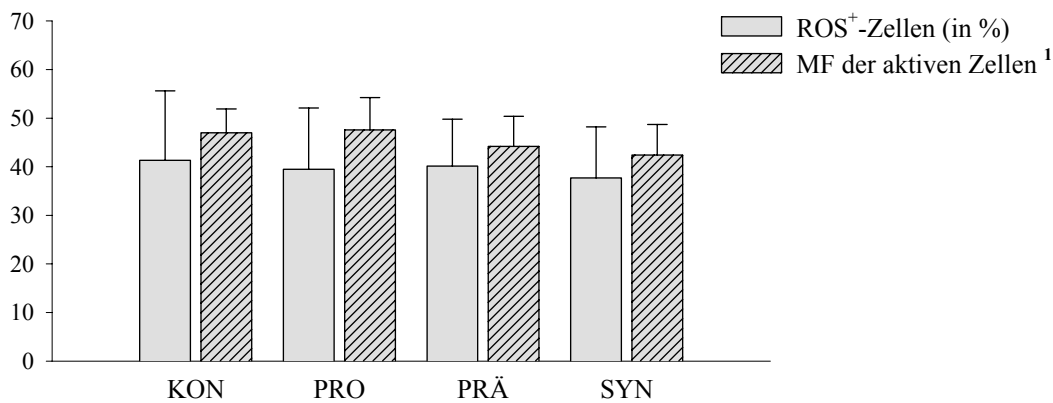


**Abb. 4.8:** Mittlere Fluoreszenzintensität der aktiven Monozyten des Blutes bzw. der Milz. Die Versuchstiere wurden 4 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.6 und Tab. 8.7.

### 4.1.5 Oxidativer Burst

Die Aufnahme opsonisierter Partikel durch Phagozyten führt zu einem oxidativen Burst, der in der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) resultiert. In dieser Untersuchung wurden die neutrophilen Granulozyten des Blutes durch PMA zum oxidativen Burst angeregt. Der Anteil der aktiven Granulozyten, die ROS gebildet hatten, unterschied sich in den Fütterungsgruppen nicht von dem der Kontrollgruppe (**Abb. 4.9**).

Für die Granulozyten, die ROS gebildet hatten, wurde die mittlere Fluoreszenzintensität gemessen. Die mittlere Fluoreszenzintensität ist in dieser Untersuchung das Maß für die Enzymaktivität pro aktivem Granulozyt. Die Fütterung der Versuchstiere mit PRO, PRÄ oder SYN beeinflusste die mittlere Fluoreszenzintensität der aktiven Granulozyten nicht signifikant. Die Fütterung der Tiere mit SYN führte jedoch tendenziell zu einer geringeren mittleren Fluoreszenzintensität der aktiven Granulozyten (Fütterungseffekt  $p = 0,027$ ) (**Abb. 4.9**).



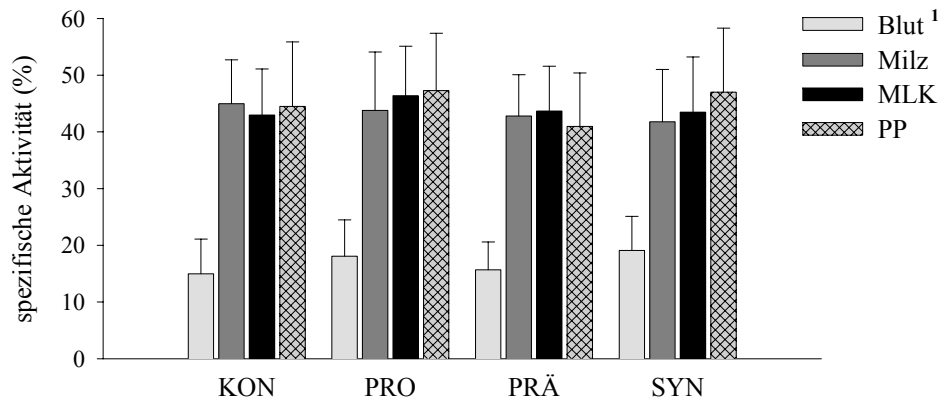
**Abb. 4.9:** Oxidativer Burst der Granulozyten des Blutes. Die Zellen wurden zur Bildung von ROS durch Stimulation mit PMA angeregt. Anteil aktiver Zellen der Granulozytenpopulation, die ROS gebildet hatten (in %) sowie deren mittlere Fluoreszenzintensität (MF). Die Versuchstiere wurden 4 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. <sup>1</sup>: Fütterungseffekt  $p = 0,027$ . Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.8.

### 4.1.6 Aktivität der natürlichen Killerzellen

Die NK-Aktivität der mononukleären Zellen des Blutes sowie der isolierten Immunzellen aus Milz, MLK und Peyerschen Plaques (PP) wurde gemessen.

#### 4.1.6.1 NK-Aktivität

Die unterschiedliche Fütterung der Versuchstiere hatte keinen signifikanten Einfluss auf die NK-Aktivität der Immunzellen aus dem Blut, der Milz, den MLK oder den PP. Tendenziell erhöhte jedoch die Aufnahme von SYN die NK-Aktivität der mononukleären Zellen des Blutes (Fütterungseffekt  $p = 0,093$ ) (**Abb. 4.10**).



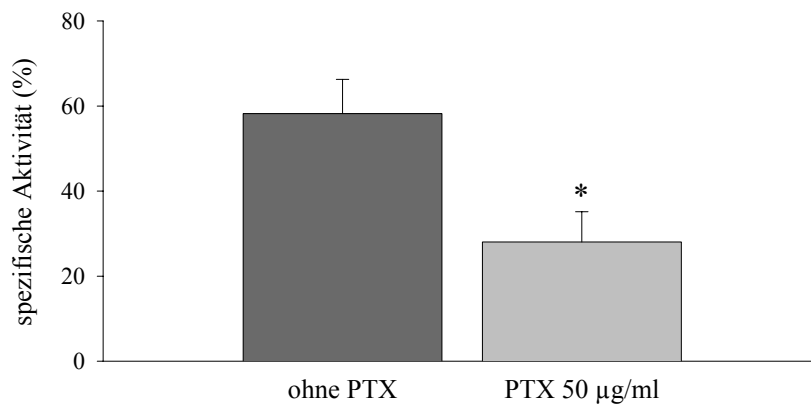
**Abb. 4.10:** NK-Aktivität der mononukleären Zellen des Blutes und der isolierten Immunzellen aus Milz, MLK und PP. Die Immunzellen wurden mit den Zielzellen YAC-1 im Verhältnis 12,5:1 inkubiert. Die spezifische Aktivität entspricht dem Anteil toter Zielzellen innerhalb der Zielzellpopulation. Die Versuchstiere wurden 4 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. <sup>1</sup>: Fütterungseffekt  $p = 0,093$ . Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.9 und Tab. 8.10.

#### 4.1.6.2 Hemmung der NK-Aktivität mit Pentoxifyllin

Bislang wurden in zwei Studien bei Mäusen die Immunzellen der PP auf die Aktivität von NK-Zellen hin untersucht. Diese Studien kamen zu widersprüchlichen Ergebnissen. Bei den Untersuchungen von Tagliabue *et al.*, (1983) zeigten die Immunzellen der PP keine natürliche Killerzellaktivität. Im Gegensatz hierzu beobachteten Gautam *et al.*, (1986) eine eindeutige natürliche Killerzellaktivität der Immunzellen aus den PP. Mit Ratten wurde bisher keine entsprechende Studie durchgeführt. Bei F344 Ratten wurden jedoch, wenn auch in geringer Zahl, NK-Zellen in den PP nachgewiesen. Im Bereich zwischen PP und Lamina propria wurden NK-Zellen in größerer Zahl gefunden (van den Brink *et al.*, 1991). In der vorliegenden Studie wurde bei der Isolierung der PP auch der Bereich zwischen PP und Lamina propria entnommen und entsprechend bei der Gewinnung der Immunzellsuspension mit verwendet. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass in der Immunzellsuspension aus den PP NK-Zellen vorhanden waren.

Da bekannt ist, dass Pentoxifyllin (PTX) *in vitro* die Aktivität der NK-Zellen hemmt (Reed & DeGowin, 1992), wurde in einem parallelen Ansatz überprüft, ob durch PTX ebenfalls eine Hemmung der spezifischen Aktivität der Immunzellen aus den PP zu beobachten ist. PTX (50 µg/ml) führte tatsächlich zu einer signifikanten Hemmung (48 %) der NK-Aktivität der isolierten Immunzellen aus den PP (**Abb. 4.11**).

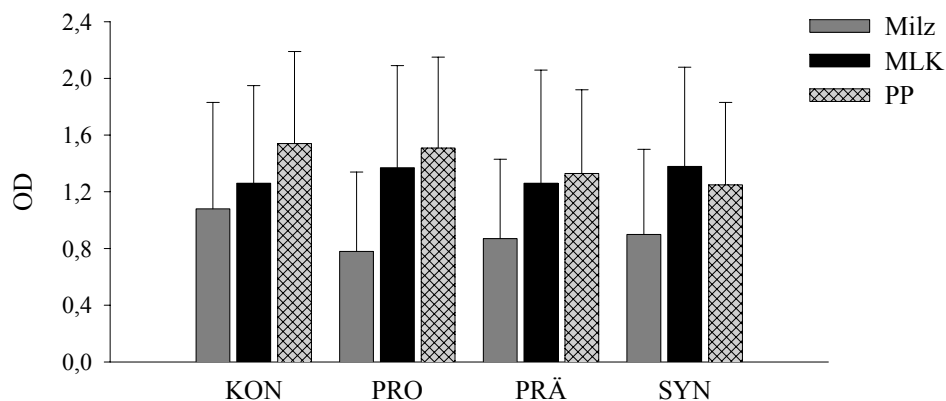
Es kann also davon ausgegangen werden, dass die in der vorliegenden Arbeit gemessene spezifische Aktivität der Immunzellen aus den PP, tatsächlich auf eine Aktivität der NK-Zellen zurückzuführen ist.



**Abb. 4.11:** NK-Aktivität der isolierten Immunzellen aus den PP. Die Immunzellen wurden mit den Zielzellen YAC-1 im Verhältnis 12,5:1 inkubiert. In zwei parallelen Ansätzen wurden die Zellen ohne und mit PTX inkubiert (n = 5). Die spezifische Aktivität entspricht dem Anteil toter Zielzellen innerhalb der Zielzellpopulation. \* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle  $p < 0,01$  (ungepaarter t-Test). Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.11.

#### 4.1.7 Proliferation

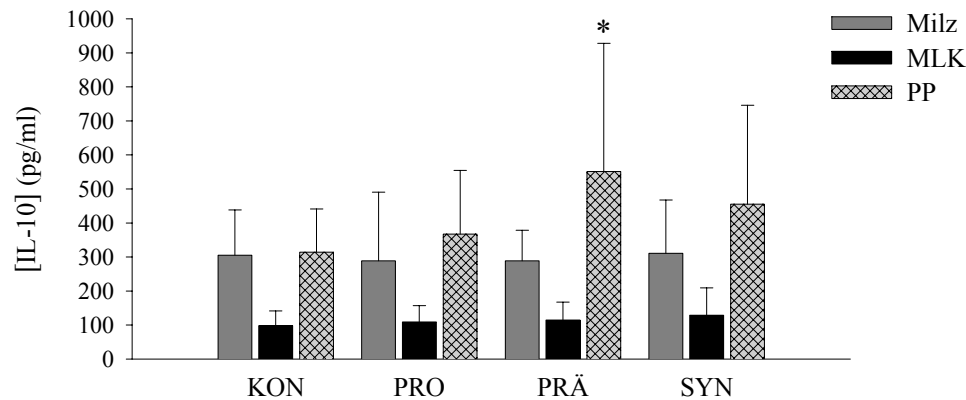
Die Proliferation wurde für die isolierten Immunzellen aus der Milz, den MLK und den PP gemessen. Die Fütterung der Tiere mit PRO, PRÄ oder SYN beeinflusste die Proliferationsrate der untersuchten Immunzellen nicht (**Abb. 4.12**).



**Abb. 4.12:** Proliferation der isolierten Immunzellen aus der Milz, den MLK und den PP. Die Zellen wurden 72 Stunden inkubiert. Stimulation der Zellen mit ConA (1 µg/ml). Die Versuchstiere wurden 4 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.12.

### 4.1.8 Sekretion von Interleukin-10

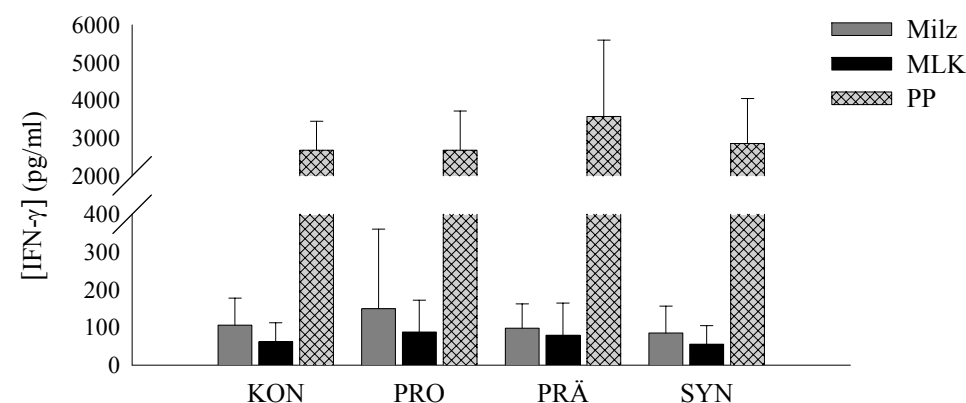
Die isolierten Immunzellen aus der Milz, den MLK und den PP wurden auf die Sekretion von IL-10 hin untersucht. Die IL-10-Sekretion der Immunzellen aus der Milz und den MLK wurde durch die Fütterung der Versuchstiere mit PRO, PRÄ oder SYN nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu führte die Fütterung der Versuchstiere mit PRÄ zu einer signifikant höheren IL-10-Sekretion der Immunzellen aus den PP ( $p < 0,05$ ) (Abb. 4.13).



**Abb. 4.13:** IL-10-Sekretion der isolierten Immunzellen aus der Milz, den MLK und den PP. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert. Stimulation der Zellen mit ConA ( $5 \mu\text{g/ml}$ ). Die Versuchstiere wurden 4 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. \*:  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.13.

### 4.1.9 Sekretion von Interferon- $\gamma$

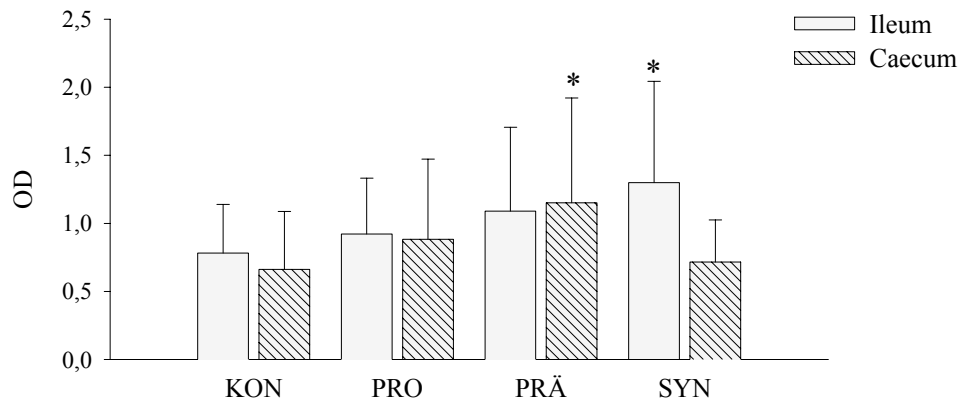
Die isolierten Immunzellen aus der Milz, den MLK und den PP wurden auf die Sekretion von IFN- $\gamma$  hin untersucht. Die unterschiedliche Fütterung der Versuchstiere beeinflusste die IFN- $\gamma$ -Sekretion der untersuchten Immunzellen nicht (Abb. 4.14).



**Abb. 4.14:** IFN- $\gamma$ -Sekretion der isolierten Immunzellen aus der Milz, den MLK und den PP. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert. Stimulation der Zellen mit ConA ( $5 \mu\text{g/ml}$ ). Die Versuchstiere wurden 4 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.14.

### 4.1.10 Sekretion von SIgA

Die relative SIgA-Konzentration wurde im Ileum- bzw. Caecum-Inhalt gemessen. Versuchstiere, die mit PRÄ gefüttert wurden, hatten eine signifikant höhere SIgA-Konzentration im Caecum, verglichen mit den Versuchstieren der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ). Die Fütterung der Versuchstiere mit SYN resultierte in einer signifikant höheren SIgA-Konzentration im Ileum, im Vergleich mit der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ) (**Abb. 4.15**).



**Abb. 4.15:** Relative SIgA-Konzentration des Ileum- bzw. Caecum-Inhalts. Das Maß für die SIgA-Konzentration ist die OD der Enzym-Farb-Reaktion. Die Versuchstiere wurden 4 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. \*:  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.15.

## 4.2 Tierstudie 2 A

In dieser Studie wurden die Versuchstiere (F344 Ratten) 33 Wochen lang mit der Kontrolldiät, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. Die Tiere wurden zehn Tage nach Fütterungsbeginn mit Azoxymethan (AOM) behandelt. In jeder Versuchsgruppe waren 15 Tiere. Es war nicht immer möglich die verschiedenen Messungen für alle Versuchstiere bzw. alle Organe durchzuführen. Infolgedessen ist die Anzahl der Versuchstiere ( $n$ ) pro Gruppe und gemessenem Parameter nicht immer gleich. Die Einzelwerte und  $n$  sind im Tabellenanhang angegeben. In den Diagrammen sind jeweils die  $MW \pm SD$  dargestellt.

### 4.2.1 Körpergewicht

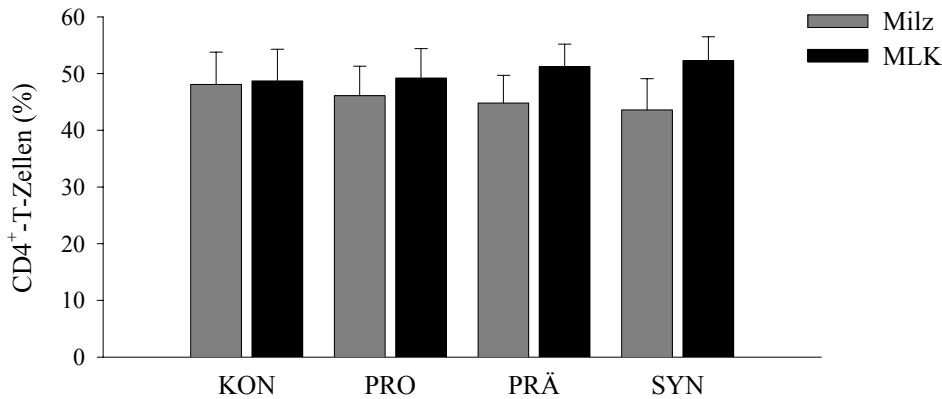
Zu Versuchsbeginn hatten die Versuchstiere ein durchschnittliches Gewicht von 108,8 g ( $\pm 12,2$  g). Am Ende des Versuches hatten die Tiere ein Gewicht von 479,5 g ( $\pm 34,0$  g). Das Gewicht der Versuchstiere der unterschiedlichen Fütterungsgruppen unterschied sich weder zu Beginn noch am Ende des Versuches (Daten nicht gezeigt).

### 4.2.2 Lymphozytensubpopulationen

Für die Lymphozyten der Milz und der MLK wurde der Anteil der  $CD4^+$ -T-Zellen sowie der  $CD8^+$ -T-Zellen gemessen.

#### 4.2.2.1 CD4<sup>+</sup>-T-Zellen

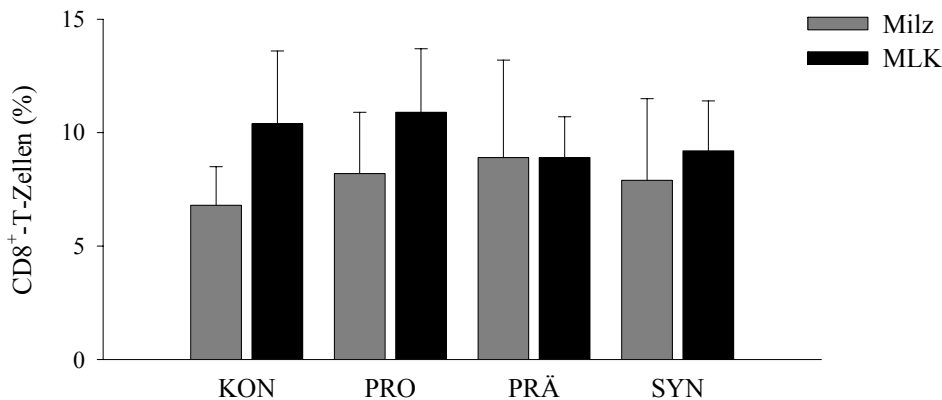
Die Fütterung der Tiere mit PRO, PRÄ oder SYN beeinflusste weder in der Milz noch in den MLK den Anteil der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (**Abb. 4.16**).



**Abb. 4.16:** Prozentualer Anteil der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen der Lymphozyten der Milz und der MLK. Die Versuchstiere wurden mit AOM behandelt und 33 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.16.

#### 4.2.2.2 CD8<sup>+</sup>-T-Zellen

Der Anteil der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in den untersuchten Organen wurde durch die Fütterung der Versuchstiere mit PRO, PRÄ oder SYN nicht beeinflusst (**Abb. 4.17**).



**Abb. 4.17:** Prozentualer Anteil der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen der Lymphozyten der Milz und der MLK. Die Versuchstiere wurden mit AOM behandelt und 33 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.17.

#### 4.2.2.3 Verhältnis CD4<sup>+</sup>-T-Zellen/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen

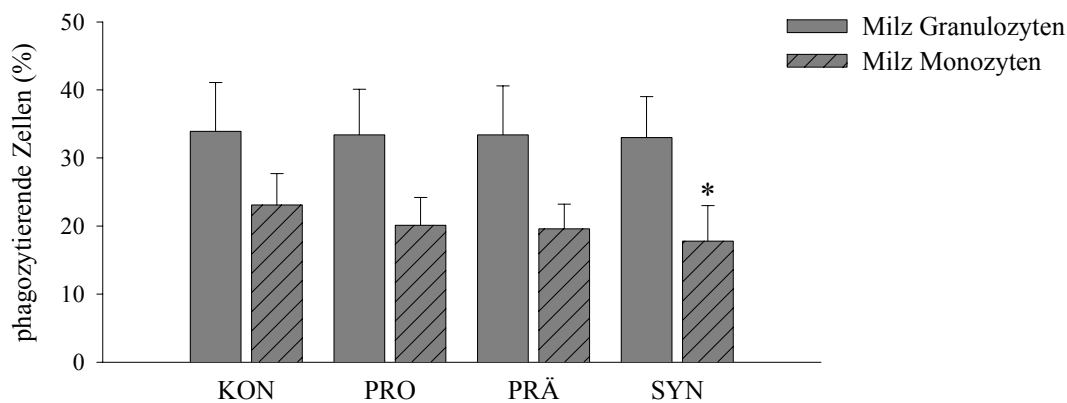
Das Verhältnis von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurde weder in der Milz noch in den MLK durch die Fütterung mit PRO, PRÄ oder SYN beeinflusst (**Tab. 4.2**).

**Tab. 4.2:** Verhältnis  $CD4^+$ -T-Zellen/ $CD8^+$ -T-Zellen der Lymphozyten aus Milz und MLK. Die Versuchstiere wurden mit AOM behandelt und 33 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.18.

	KON	PRO	PRÄ	SYN
Milz	$7,61 \pm 2,76$	$6,12 \pm 2,18$	$5,97 \pm 2,40$	$6,21 \pm 2,13$
MLK	$5,11 \pm 1,66$	$4,81 \pm 1,26$	$5,94 \pm 1,10$	$5,93 \pm 1,30$

### 4.2.3 Phagozytoseaktivität

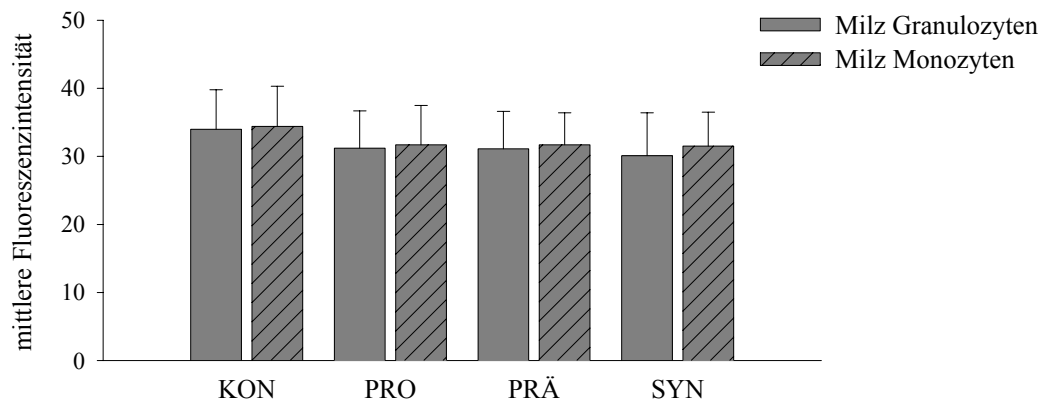
Die Phagozytoseaktivität wurde für die Immunzellen der Milz gemessen. Dabei wurden neutrophile Granulozyten und Monozyten getrennt untersucht. Die Phagozytoseaktivität der Granulozyten wurde durch die Fütterung der Versuchstiere nicht beeinflusst. Hingegen hatten Versuchstiere, die mit SYN gefüttert wurden, eine signifikant geringere Zahl aktiver Monozyten, verglichen mit den Versuchstieren der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ) (**Abb. 4.18**).



**Abb. 4.18:** Anteil phagozytierender Zellen der Granulozyten- bzw. Monozytenpopulation der Milz. Die Versuchstiere wurden mit AOM behandelt und 33 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. \*:  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.19.



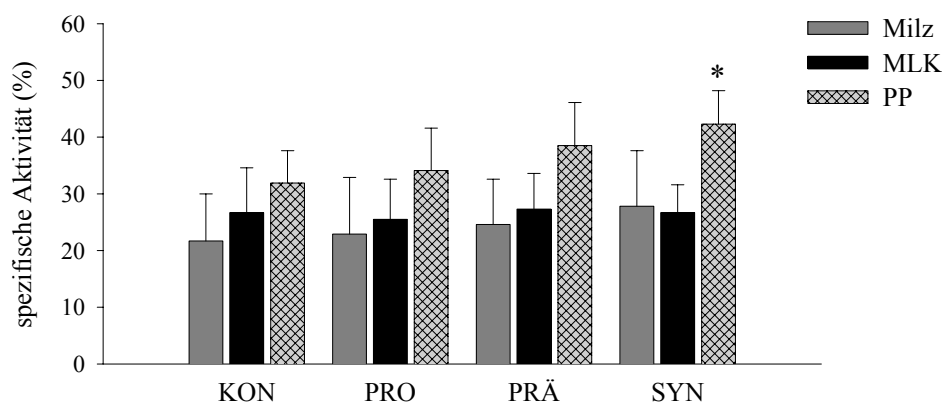
Die mittlere Fluoreszenzintensität der aktiven Granulozyten und aktiven Monozyten wurde durch die Fütterung der Tiere mit PRO, PRÄ oder SYN nicht beeinflusst (**Abb. 4.19**).



**Abb. 4.19:** Mittlere Fluoreszenzintensität der aktiven Granulozyten und aktiven Monozyten der Milz. Die Versuchstiere wurden mit AOM behandelt und 33 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.19.

#### 4.2.4 Aktivität der natürlichen Killerzellen

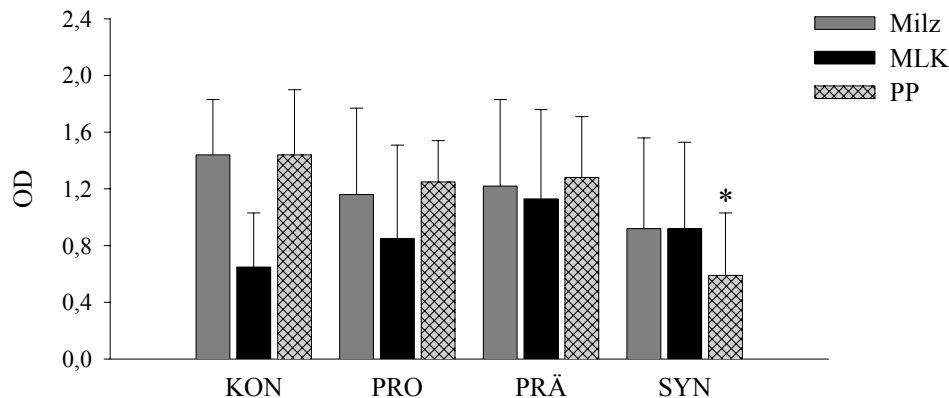
Die NK-Aktivität der isolierten Immunzellen aus der Milz, den MLK und den PP wurde gemessen. Die NK-Aktivität der Immunzellen aus der Milz und den MLK wurde durch die unterschiedliche Fütterung der Versuchstiere nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu war die NK-Aktivität der Immunzellen aus den PP bei SYN-gefütterten Versuchstieren signifikant höher ( $p < 0,01$ ) (**Abb. 4.20**).



**Abb. 4.20:** NK-Aktivität der isolierten Immunzellen aus der Milz, den MLK und den PP. Die Immunzellen wurden mit den Zielzellen YAC-1 im Verhältnis 12,5:1 inkubiert. Die spezifische Aktivität entspricht dem Anteil toter Zielzellen innerhalb der Zielzellpopulation. Die Versuchstiere wurden mit AOM behandelt und 33 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. \*:  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.20.

### 4.2.5 Proliferation

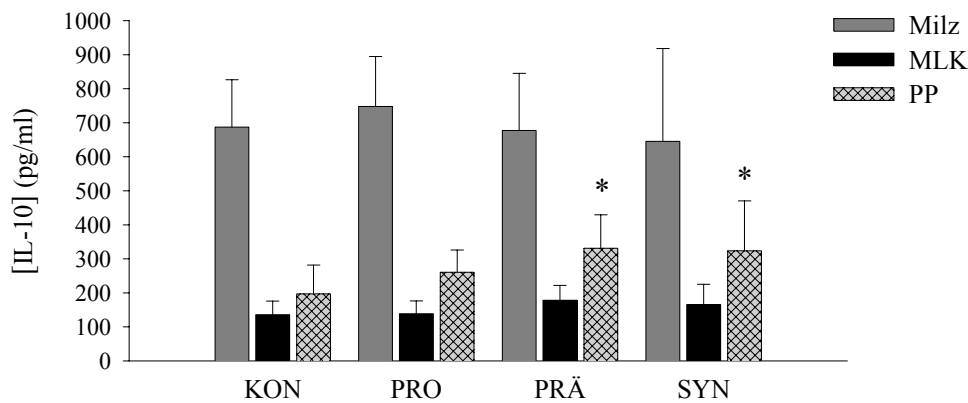
Die Proliferation wurde für die isolierten Immunzellen aus der Milz, den MLK und den PP gemessen. Die Fütterung der Versuchstiere mit PRO, PRÄ oder SYN beeinflusste die Proliferationsrate der Immunzellen aus der Milz und den MLK nicht. Die Fütterung von SYN führte jedoch zu einer signifikant geringeren Proliferationsrate der Immunzellen aus den PP, im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,01$ ) (**Abb. 4.21**).



**Abb. 4.21:** Proliferation der isolierten Immunzellen aus der Milz, den MLK und den PP. Die Zellen wurden 72 Stunden inkubiert. Stimulation der Zellen mit ConA ( $1 \mu\text{g/ml}$ ). Die Versuchstiere wurden mit AOM behandelt und 33 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. \*:  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.21.

### 4.2.6 Sekretion von Interleukin-10

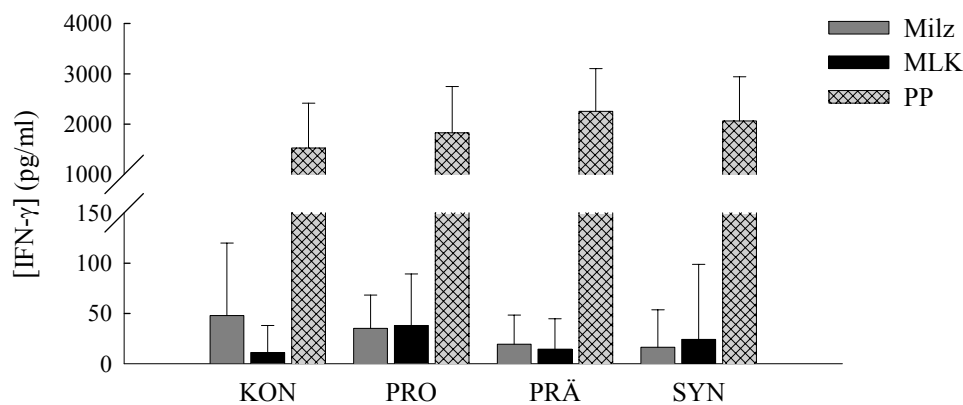
Die isolierten Immunzellen aus der Milz, den MLK und den PP wurden auf die Sekretion von IL-10 hin untersucht. Die IL-10-Sekretion der Immunzellen aus der Milz und den MLK wurde durch die unterschiedliche Fütterung der Versuchstiere nicht beeinflusst. Die Fütterung der Versuchstiere mit PRÄ oder SYN führte zu einer signifikant höheren IL-10-Sekretion der Immunzellen aus den PP ( $p < 0,01$ ) (**Abb. 4.22**).



**Abb. 4.22:** IL-10-Sekretion der isolierten Immunzellen aus der Milz, den MLK und den PP. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert. Stimulation der Zellen mit ConA (5  $\mu\text{g/ml}$ ). Die Versuchstiere wurden mit AOM behandelt und 33 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. \*:  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.22.

#### 4.2.7 Sekretion von Interferon- $\gamma$

Die isolierten Immunzellen aus der Milz, den MLK und den PP wurden auf die Sekretion von IFN- $\gamma$  hin untersucht. Die Fütterung der Versuchstiere mit PRO, PRÄ oder SYN beeinflusste die IFN- $\gamma$ -Sekretion der untersuchten Immunzellen nicht (**Abb. 4.23**).



**Abb. 4.23:** IFN- $\gamma$ -Sekretion der isolierten Immunzellen aus der Milz, den MLK und den PP. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert. Stimulation der Zellen mit ConA (5  $\mu\text{g/ml}$ ). Die Versuchstiere wurden mit AOM behandelt und 33 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.23.

## 4.3 Tierstudie 2 B

Diese Tierstudie wurde parallel und entsprechend der Tierstudie 2 A durchgeführt. Die Versuchstiere wurden ebenfalls 33 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. Diese Versuchstiere wurden jedoch nicht mit AOM behandelt. In der Kontrollgruppe und in der PRO-Gruppe befanden sich jeweils 4 Tiere. Die PRÄ- sowie die SYN-Gruppe umfasste jeweils 5 Tiere. Es war nicht immer möglich die verschiedenen Messungen für alle Versuchstiere bzw. alle Organe durchzuführen. Infolgedessen ist die Anzahl der Versuchstiere (n) pro Gruppe und gemessenem Parameter nicht immer gleich. Die Einzelwerte und n sind im Tabellenanhang angegeben. In den Diagrammen sind jeweils MW  $\pm$  SD dargestellt.

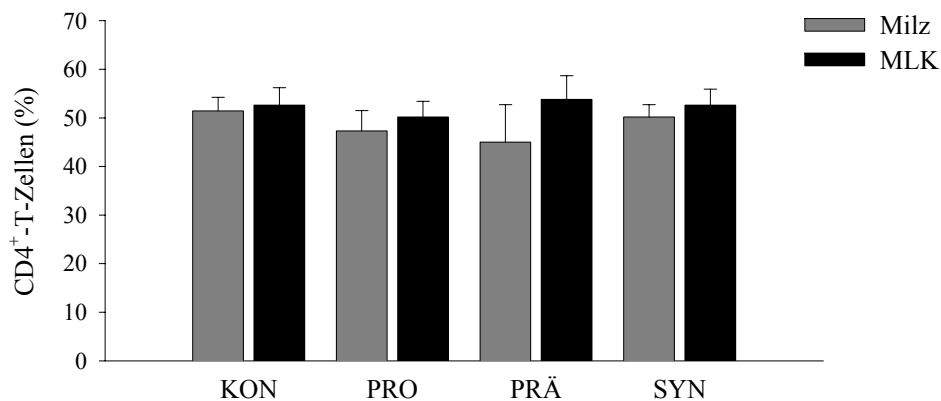
### 4.3.1 Körpergewicht

Das durchschnittliche Gewicht der Versuchstiere betrug zu Beginn des Versuches 107,0 g ( $\pm$  8,7 g) und am Ende des Versuches 500,9 g ( $\pm$  24,9 g). Das Gewicht der PRO-, PRÄ oder SYN-ernährten Versuchstiere unterschied sich weder zu Beginn noch am Ende des Versuches vom Gewicht der Kontrolltiere (Daten nicht gezeigt).

### 4.3.2 Lymphozytensubpopulationen

#### 4.3.2.1 CD4<sup>+</sup>-T-Zellen

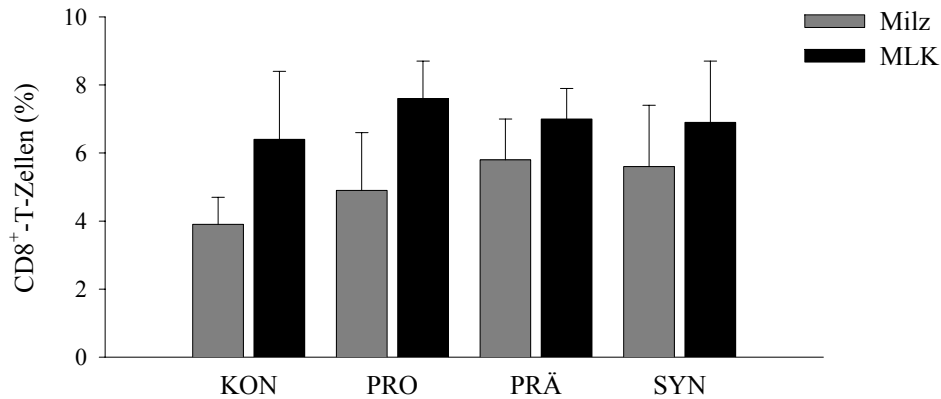
Die Fütterung der Tiere mit PRO, PRÄ oder SYN beeinflusste weder in der Milz noch in den MLK den Anteil der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (**Abb. 4.24**).



**Abb. 4.24:** Prozentualer Anteil der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen der Lymphozyten der Milz und der MLK. Die Versuchstiere wurden 33 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.24.

### 4.3.2.2 CD8<sup>+</sup>-T-Zellen

Die Fütterung der Tiere mit PRO, PRÄ oder SYN hatte keinen Einfluss auf den Anteil der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Milz oder den MLK (**Abb. 4.25**).



**Abb. 4.25:** Prozentualer Anteil der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen der Lymphozyten der Milz und der MLK. Die Versuchstiere wurden 33 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.25.

### 4.3.2.3 Verhältnis CD4<sup>+</sup>-T-Zellen/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen

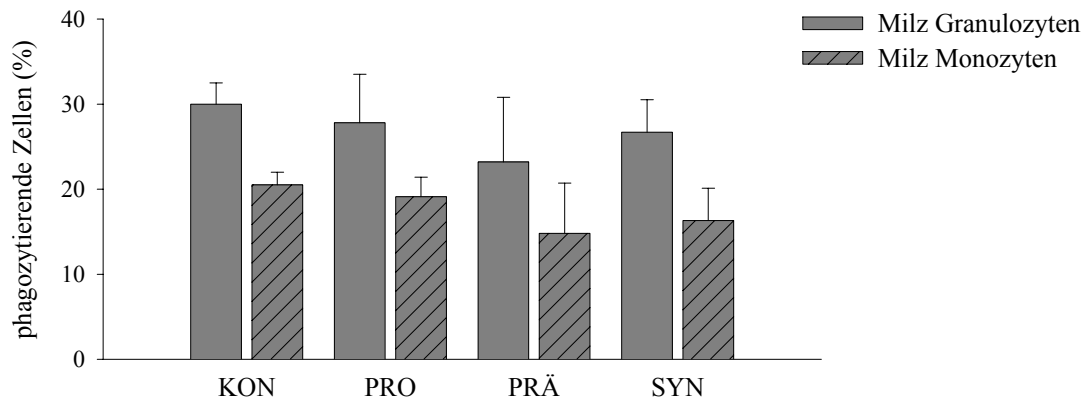
Versuchstiere, die mit PRÄ gefüttert wurden, hatten in der Milz tendenziell einen geringeren Anteil CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sowie einen höheren Anteil CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Beides zusammen resultierte in einem signifikant geringeren Verhältnis von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Milz ( $p < 0,05$ ). Hingegen wurde das Verhältnis von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in den MLK durch die unterschiedliche Fütterung der Versuchstiere nicht beeinflusst (**Tab. 4.3**).

**Tab. 4.3:** Verhältnis CD4<sup>+</sup>-T-Zellen/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen der Lymphozyten der Milz und der MLK. Die Versuchstiere wurden 33 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. \*:  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.26.

	KON	PRO	PRÄ	SYN
<b>Milz</b>	13,49 ± 2,38	10,39 ± 2,78	7,90 ± 1,79 *	9,75 ± 3,26
<b>MLK</b>	8,67 ± 2,08	6,71 ± 1,25	7,70 ± 0,47	7,98 ± 1,97

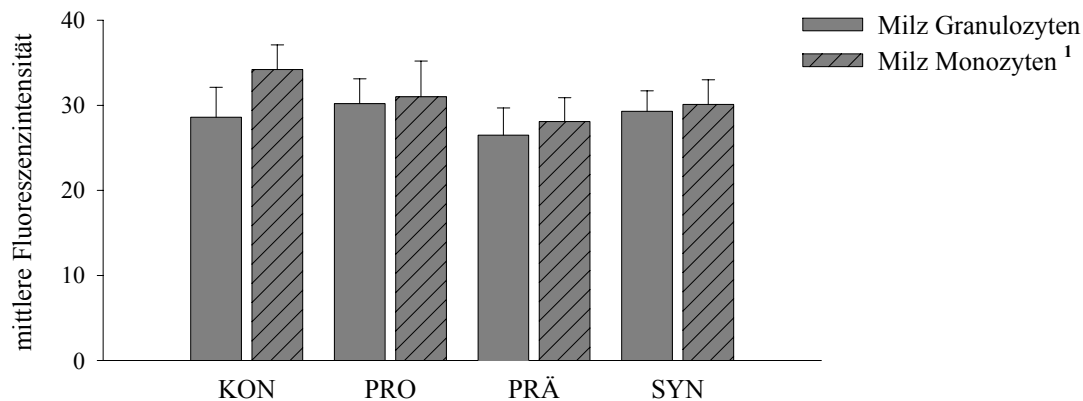
### 4.3.3 Phagozytoseaktivität

Die Fütterung der Versuchstiere mit PRO, PRÄ oder SYN beeinflusste weder die Phagozytoseaktivität der Granulozyten noch die der Monozyten (**Abb. 4.26**).



**Abb. 4.26:** Anteil phagozytierender Zellen der Granulozyten- bzw. Monozytenpopulation der Milz. Die Versuchstiere wurden 33 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.27.

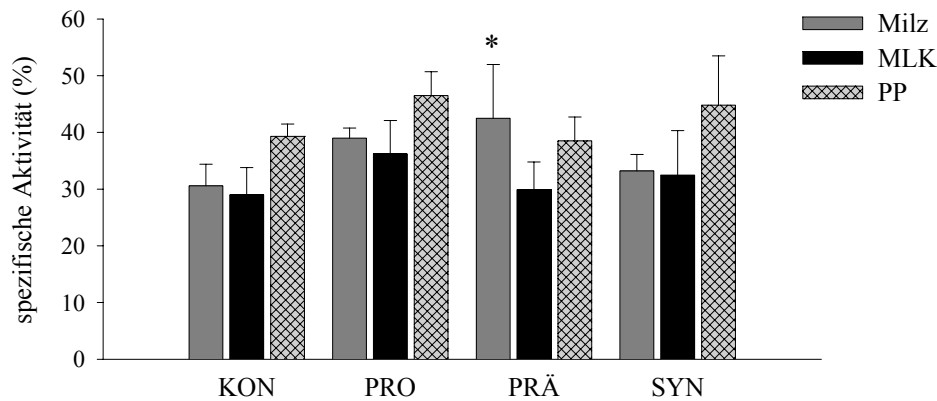
Die mittlere Fluoreszenzintensität der Granulozyten und der Monozyten wurde durch die unterschiedliche Fütterung der Tiere nicht signifikant beeinflusst. PRÄ-ernährte Tiere hatten jedoch tendenziell eine geringere mittlere Fluoreszenzintensität der aktiven Monozyten der Milz, im Vergleich zu den Tieren, die mit KON gefüttert wurden (Fütterungseffekt  $p = 0,088$ ) (**Abb. 4.27**).



**Abb. 4.27:** Mittlere Fluoreszenzintensität aktiver Granulozyten und aktiver Monozyten der Milz. Die Versuchstiere wurden 33 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. <sup>1</sup>: Fütterungseffekt  $p = 0,088$ . Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.27.

#### 4.3.4 Aktivität der natürlichen Killerzellen

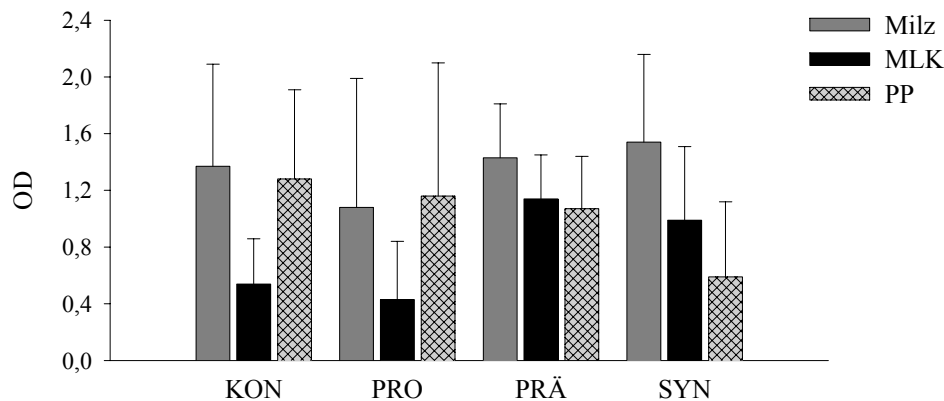
Versuchstiere, die mit PRÄ gefüttert wurden hatten, im Vergleich mit den Tieren der Kontrollgruppe, eine signifikant höhere NK-Aktivität der Immunzellen aus der Milz ( $p < 0,05$ ). Die NK-Aktivität der Immunzellen aus den MLK und den PP wurde jedoch durch die unterschiedliche Fütterung nicht beeinflusst (**Abb. 4.28**).



**Abb. 4.28:** NK-Aktivität der isolierten Immunzellen aus der Milz, den MLK und den PP. Die Immunzellen wurden mit den Zielzellen YAC-1 im Verhältnis 12,5:1 inkubiert. Die spezifische Aktivität entspricht dem Anteil toter Zielzellen innerhalb der Zielzellpopulation. Die Versuchstiere wurden 33 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. \*:  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.28.

#### 4.3.5 Proliferation

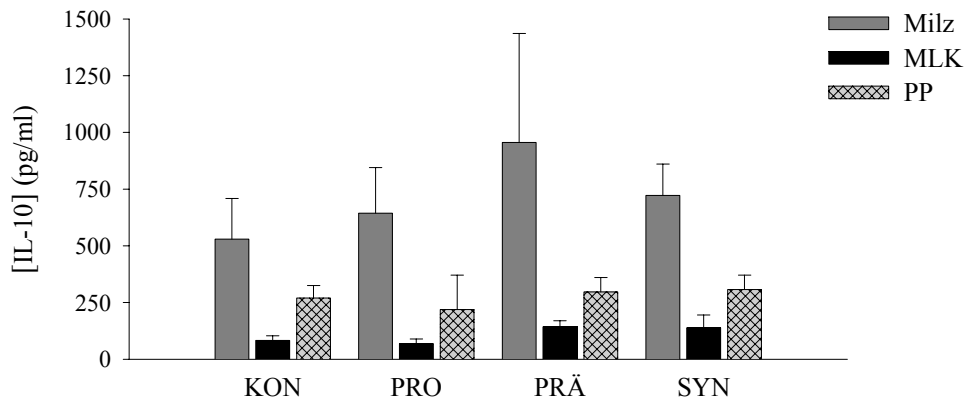
Die Proliferation der Immunzellen aus der Milz, den MLK und den PP wurde durch die unterschiedliche Fütterung der Tiere nicht beeinflusst (**Abb. 4.29**).



**Abb. 4.29:** Proliferation der isolierten Immunzellen aus der Milz, den MLK und den PP. Inkubation der Zellen für 72 Stunden. Stimulation der Zellen mit ConA (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Die Versuchstiere wurden 33 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.29.

#### 4.3.6 Sekretion von Interleukin-10

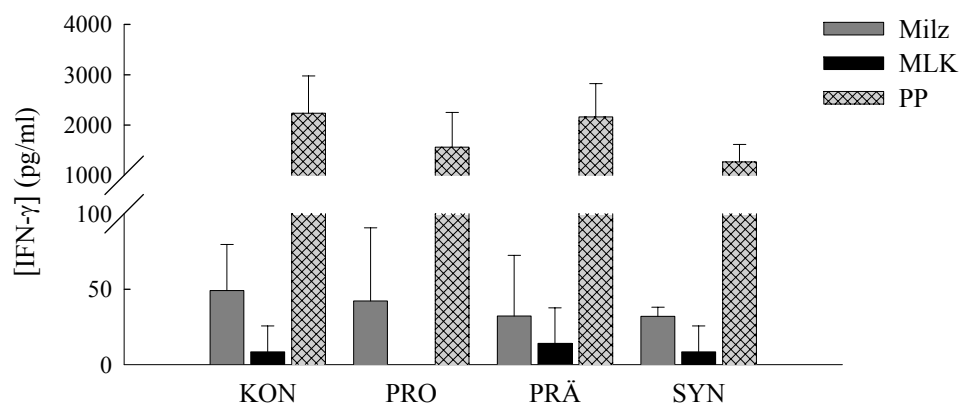
Die Fütterung der Versuchstiere mit PRÄ, PRO oder SYN hatte keinen Einfluss auf die IL-10-Sekretion der Immunzellen aus der Milz, den MLK und den PP (**Abb. 4.30**).



**Abb. 4.30:** IL-10-Sekretion der isolierten Immunzellen aus der Milz, den MLK und den PP. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert. Stimulation der Zellen mit ConA (5 µg/ml). Die Versuchstiere wurden 33 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.30.

### 4.3.7 Sekretion von Interferon-γ

Die IFN-γ-Sekretion der Immunzellen aus der Milz, den MLK und den PP wurde durch die unterschiedliche Fütterung der Versuchstiere nicht beeinflusst (**Abb. 4.31**).



**Abb. 4.31:** IFN-γ-Sekretion der isolierten Immunzellen aus der Milz, den MLK und den PP. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert. Stimulation der Zellen mit ConA (5 µg/ml). Die Versuchstiere wurden 33 Wochen lang mit KON, PRO, PRÄ oder SYN gefüttert. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.31.



## 4.4 Zusammenfassung beobachteter Effekte in den Tierstudien

### 4.4.1 Tierstudie 1

Tab. 4.4: Beobachtete Wirkungen der Versuchsdiäten in Studie 1

Versuchsdiät	Immunparameter	Organ	Wirkung	p-Wert
PRO / SYN	Verhältnis CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen/CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	Blut	↑	p = 0,085 (ANOVA)
SYN	Oxidativer Burst (MF Granulozyten)	Blut	↓	p = 0,027 (ANOVA)
SYN	NK-Aktivität	Blut	↑	p = 0,093 (ANOVA)
PRÄ	IL-10-Sekretion	PP	↑	p < 0,05 (Tukey-Kramer)
SYN	SIgA	Ileum	↑	p < 0,05 (Tukey-Kramer)
PRÄ	SIgA	Caecum	↑	p < 0,05 (Tukey-Kramer)

### 4.4.2 Tierstudie 2 A

Tab. 4.5: Beobachtete Wirkungen der Versuchsdiäten in Studie 2 A

Versuchsdiät	Immunparameter	Organ	Wirkung	p-Wert
SYN	Phagozytoseaktivität (Monozyten)	Milz	↓	p < 0,05 (Tukey-Kramer)
SYN	NK-Aktivität	PP	↑	p < 0,01 (Tukey-Kramer)
SYN	Proliferation	PP	↓	p < 0,01 (Tukey-Kramer)
PRÄ / SYN	IL-10-Sekretion	PP	↑	p < 0,01 (Tukey-Kramer)

### 4.4.3 Tierstudie 2 B

Tab. 4.6: Beobachtete Wirkungen der Versuchsdiäten in Studie 2 B

Versuchsdiät	Immunparameter	Organ	Wirkung	p-Wert
PRÄ	Verhältnis CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen/CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	Milz	↓	p < 0,05 (Tukey-Kramer)
PRÄ	Phagozytoseaktivität (MF Monozyten)	Milz	↓	p = 0,088 (ANOVA)
PRÄ	NK-Aktivität	Milz	↑	p < 0,05 (Tukey-Kramer)

## 4.5 Einfluss von Azoxymethan in den Tierstudien

Die Behandlung mit AOM beeinflusste das Immunsystem der Versuchstiere. Dies zeigt der Vergleich der Untersuchungsergebnisse der verschiedenen Immunparameter zwischen den Kontrolltieren der Studie 2 A (AOM-behandelt) und den Kontrolltieren der Studie 2 B (AOM-unbehandelt).

AOM-behandelte Tiere hatten einen höheren Anteil CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Milz und in den MLK. Daraus resultierte ein verringertes Verhältnis CD4<sup>+</sup>-T-Zellen/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Milz und den MLK dieser Tiere. Tendenziell hatten AOM-behandelte Tiere eine höhere mittlere Fluoreszenzaktivität der aktiven Granulozyten der Milz. Die NK-Aktivität der Immunzellen aus der Milz AOM-behandelter Tiere war tendenziell verringert. Die NK-Aktivität der Immunzellen aus den PP AOM-behandelter Tiere war verringert. Hingegen hatten die Immunzellen aus den MLK AOM-behandelter Tiere eine höhere IL-10-Sekretion.

**Tab. 4.7:** Immunparameter, die durch die Behandlung der Versuchstiere mit AOM beeinflusst wurden. Vergleich der Kontrolltiere der Studie 2 A mit den Kontrolltieren der Studie 2 B. Die Versuchstiere beider Studien wurden 33 Wochen lang mit KON gefüttert. <sup>1</sup>: p < 0,05; <sup>2</sup>: p < 0,1 (ungepaarter t-Test).

Immunparameter	Organ	KON Studie 2 A AOM-behandelt	KON Studie 2 B AOM-unbehandelt
CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen <sup>1</sup>	Milz	6,8 ± 1,7 %	3,9 ± 0,8 %
CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen <sup>1</sup>	MLK	10,4 ± 3,2 %	6,4 ± 2,0 %
Verhältnis CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen/CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen <sup>1</sup>	Milz	7,6 ± 2,8	13,5 ± 2,4
Verhältnis CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen/CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen <sup>1</sup>	MLK	5,1 ± 1,7	8,7 ± 2,1
Phagozytoseaktivität <sup>2</sup> (MF Granulozyten)	Milz	34,0 ± 5,8	28,6 ± 3,5
NK-Aktivität <sup>2</sup>	Milz	21,7 ± 8,3 %	30,6 ± 3,8 %
NK-Aktivität <sup>1</sup>	PP	31,9 ± 5,7 %	39,3 ± 2,2 %
Interleukin-10-Sekretion <sup>1</sup>	MLK	136 ± 40 pg/ml	83 ± 21 pg/ml

## 4.6 Humanstudie

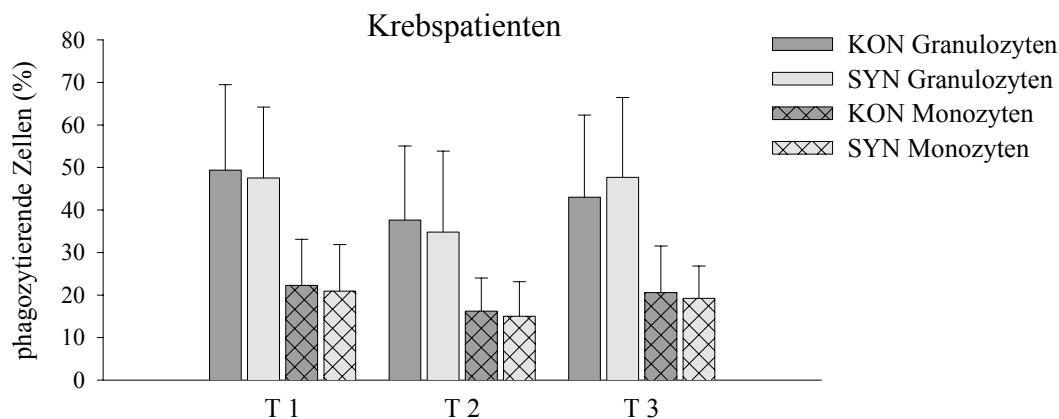
In dieser Studie erhielten die Patienten für insgesamt 12 Wochen entweder das Placebo (KON) oder das Synbiotikum (SYN). Am 1. Tag der Intervention (T 1), nach 6 Wochen (T 2) und nach 12 Wochen (T 3) gaben die Patienten eine Blut- und eine Stuhlprobe. Die Kontrollgruppe der Krebspatienten bestand aus 15 Patienten, die SYN-Gruppe umfasste 19 Patienten. Die Kontrollgruppe der Patienten mit Polypen enthielt 21 Patienten und die SYN-Gruppe umfasste 19 Patienten. Aus technischen Gründen war es nicht immer möglich die verschiedenen Messungen für alle Patienten durchzuführen. Infolgedessen ist die Anzahl der Patienten (n) pro Gruppe und gemessenem Parameter nicht immer gleich. Die Einzelwerte und n sind im Tabellenanhang angegeben. In den Diagrammen sind jeweils die MW ± SD dargestellt.

## 4.6.1 Phagozytoseaktivität

Die Phagozytoseaktivität der Immunzellen des Blutes wurde gemessen. Dabei wurden neutrophile Granulozyten und Monozyten getrennt untersucht.

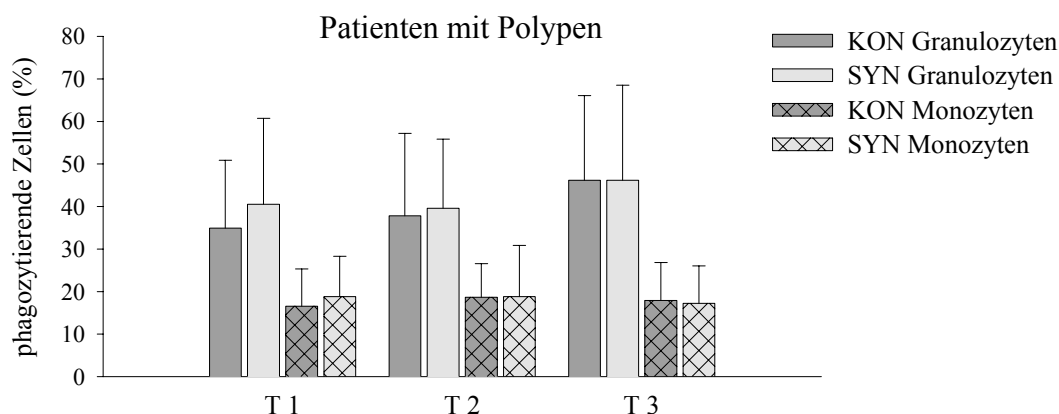
### 4.6.1.1 Phagozytoseaktivität der Granulozyten und der Monozyten

Die Aufnahme von SYN beeinflusste in der Gruppe der Krebspatienten weder die Phagozytoseaktivität der Granulozyten noch die der Monozyten (**Abb. 4.32**).



**Abb. 4.32:** Anteil phagozytischer Zellen der Granulozyten- bzw. Monozytenpopulation des Blutes. Die Patienten erhielten für insgesamt 12 Wochen KON oder SYN. T 1: Beginn der Intervention; T 2: nach 6 Wochen Intervention; T 3: nach 12 Wochen Intervention. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.32.

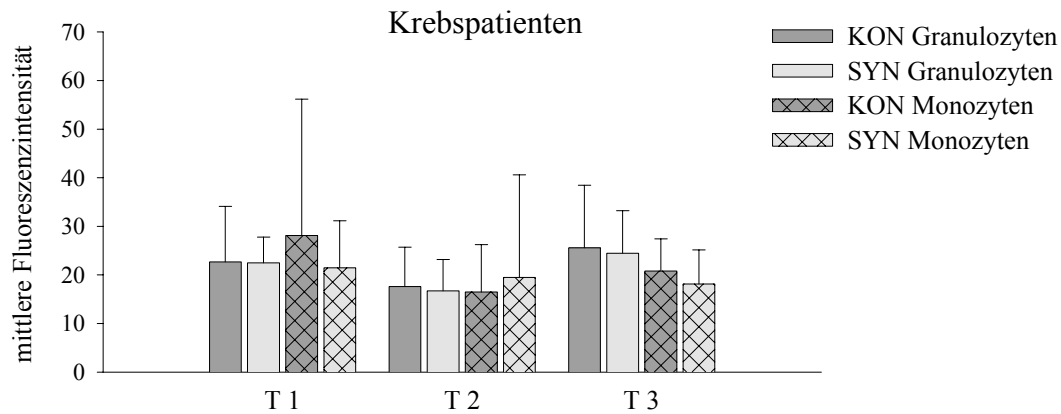
In der Gruppe der Patienten mit Polypen wurde die Phagozytoseaktivität der Granulozyten und der Monozyten durch den Verzehr von SYN nicht beeinflusst (**Abb. 4.33**).



**Abb. 4.33:** Anteil phagozytischer Zellen der Granulozyten- bzw. Monozytenpopulation des Blutes. Die Patienten erhielten für insgesamt 12 Wochen KON oder SYN. T 1: Beginn der Intervention; T 2: nach 6 Wochen Intervention; T 3: nach 12 Wochen Intervention. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.33.

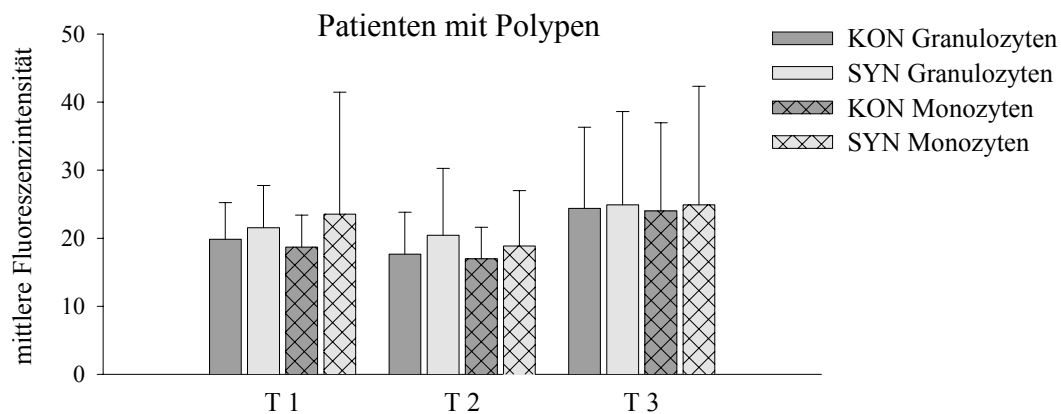
#### 4.6.1.2 Mittlere Fluoreszenzintensität aktiver Granulozyten und aktiver Monozyten

Der Verzehr von SYN beeinflusste bei den Krebspatienten die mittlere Fluoreszenzintensität der aktiven Granulozyten und der aktiven Monozyten nicht (**Abb. 4.34**).



**Abb. 4.34:** Mittlere Fluoreszenzintensität der aktiven Granulozyten und der aktiven Monozyten des Blutes. Die Patienten erhielten für insgesamt 12 Wochen KON oder SYN. T 1: Beginn der Intervention; T 2: nach 6 Wochen Intervention; T 3: nach 12 Wochen Intervention. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.34.

Die mittlere Fluoreszenzintensität der aktiven Granulozyten und der aktiven Monozyten, aus dem Blut der Patienten mit Polypen, wurde durch die Aufnahme von SYN nicht beeinflusst (**Abb. 4.35**).

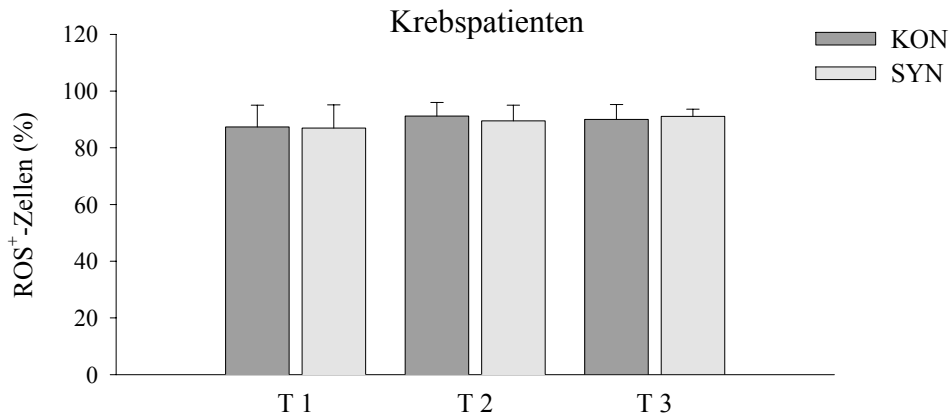


**Abb. 4.35:** Mittlere Fluoreszenzintensität der aktiven Granulozyten und der aktiven Monozyten des Blutes. Die Patienten erhielten für insgesamt 12 Wochen KON oder SYN. T 1: Beginn der Intervention; T 2: nach 6 Wochen Intervention; T 3: nach 12 Wochen Intervention. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.35.

## 4.6.2 Oxidativer Burst

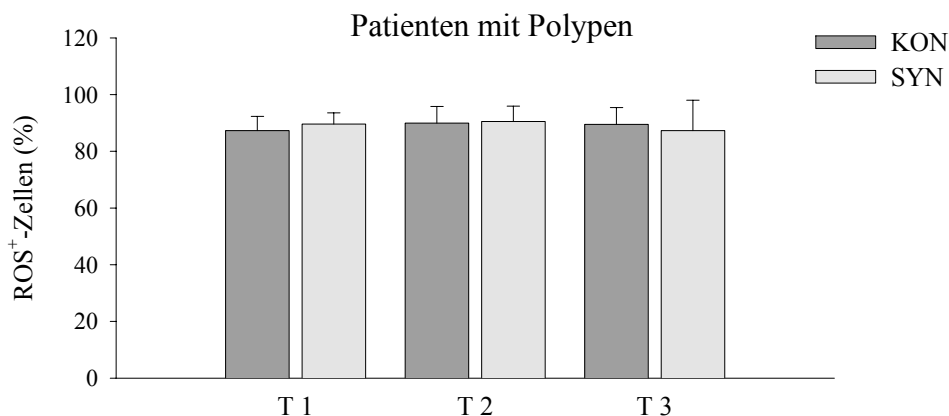
### 4.6.2.1 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Die neutrophilen Granulozyten des Blutes wurden durch PMA zum oxidativen Burst angeregt. Die Bildung von ROS durch die Granulozyten aus dem Blut der Krebspatienten wurde durch die Aufnahme von SYN nicht beeinflusst (**Abb. 4.36**).



**Abb. 4.36:** Anteil aktiver Zellen der Granulozytenpopulation des Blutes. Die Zellen wurden durch Stimulation mit PMA zur Bildung von ROS angeregt. Die Patienten erhielten für insgesamt 12 Wochen KON oder SYN. T 1: Beginn der Intervention; T 2: nach 6 Wochen Intervention; T 3: nach 12 Wochen Intervention. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.36.

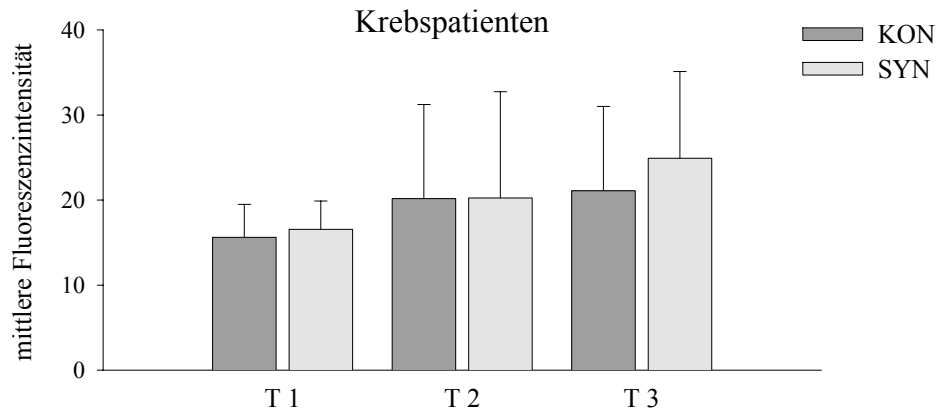
Der Verzehr von SYN hatte keinen Einfluss auf die Bildung von ROS durch die Granulozyten aus dem Blut der Patienten mit Polypen (**Abb. 4.37**).



**Abb. 4.37:** Anteil aktiver Zellen der Granulozytenpopulation des Blutes. Die Zellen wurden durch Stimulation mit PMA zur Bildung von ROS angeregt. Die Patienten erhielten für insgesamt 12 Wochen KON oder SYN. T 1: Beginn der Intervention; T 2: nach 6 Wochen Intervention; T 3: nach 12 Wochen Intervention. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.37.

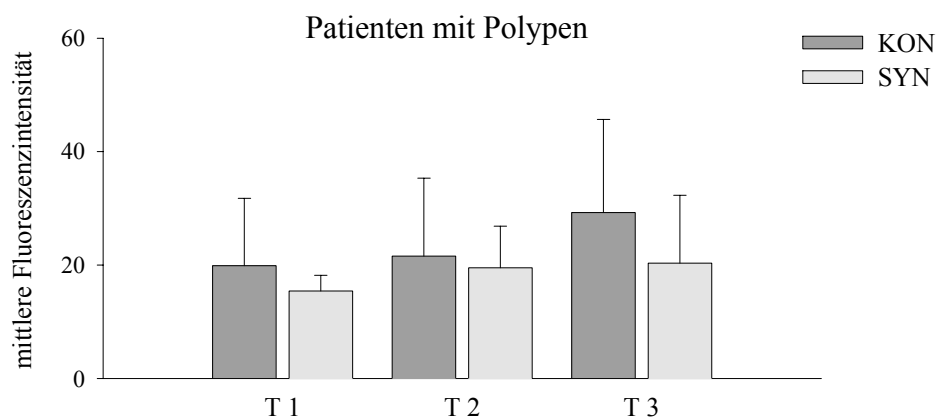
#### 4.6.2.2 Mittlere Fluoreszenzintensität

Der Verzehr von SYN hatte keinen Einfluss auf die mittlere Fluoreszenzintensität der aktiven Granulozyten aus dem Blut der Krebspatienten (**Abb. 4.38**).



**Abb. 4.38:** Mittlere Fluoreszenzintensität der aktiven Granulozyten des Blutes. Die Granulozyten wurden mit PMA stimuliert. Die Patienten erhielten für insgesamt 12 Wochen KON oder SYN. T 1: Beginn der Intervention; T 2: nach 6 Wochen Intervention; T 3: nach 12 Wochen Intervention. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.36.

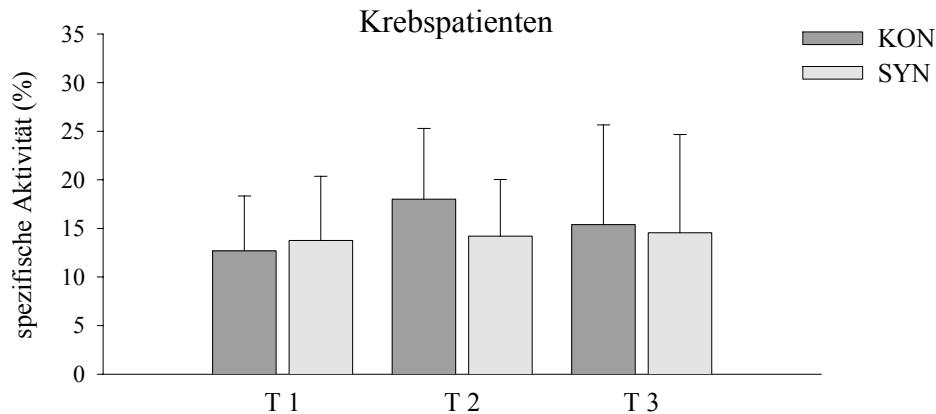
Die mittlere Fluoreszenzintensität der aktiven Granulozyten aus dem Blut der Patienten mit Polypen wurde durch die Aufnahme von SYN nicht beeinflusst (**Abb. 4.39**).



**Abb. 4.39:** Mittlere Fluoreszenzintensität der aktiven Granulozyten des Blutes. Die Granulozyten wurden mit PMA stimuliert. Die Patienten erhielten für insgesamt 12 Wochen KON oder SYN. T 1: Beginn der Intervention; T 2: nach 6 Wochen Intervention; T 3: nach 12 Wochen Intervention. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.37.

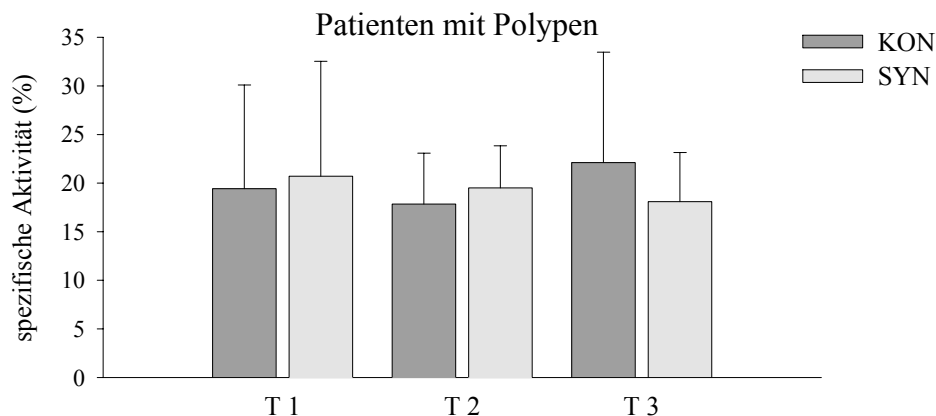
### 4.6.3 Aktivität der natürlichen Killerzellen

Die NK-Aktivität der peripheren mononukleären Blutzellen (PMBZ) der Krebspatienten wurde durch die Aufnahme von SYN nicht beeinflusst (**Abb. 4.40**).



**Abb. 4.40:** NK-Aktivität kryokonservierter PMBZ. Die Immunzellen wurden mit den Zielzellen K-562 im Verhältnis 12,5:1 inkubiert. Die spezifische Aktivität entspricht dem Anteil toter Zielzellen innerhalb der Zielzellpopulation. Die Patienten erhielten für insgesamt 12 Wochen KON oder SYN. T 1: Beginn der Intervention; T 2: nach 6 Wochen Intervention; T 3: nach 12 Wochen Intervention. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.38.

Der Verzehr von SYN hatte keinen Einfluss auf die NK-Aktivität der PBMZ aus dem Blut der Patienten mit Polypen (**Abb. 4.41**).

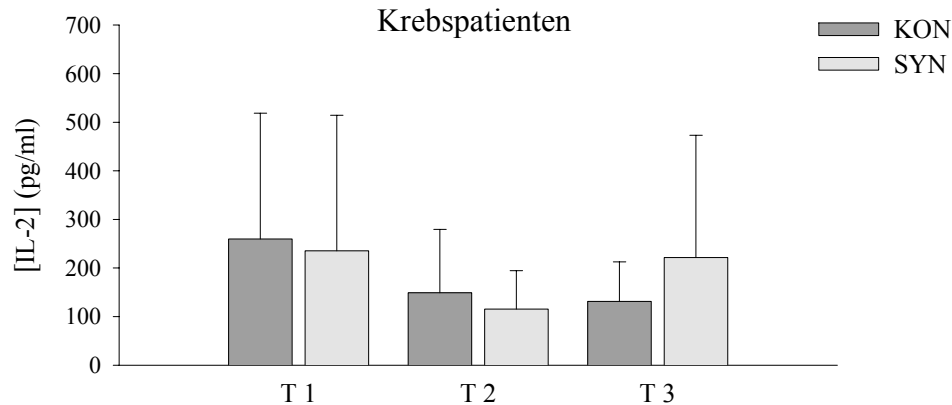


**Abb. 4.41:** NK-Aktivität kryokonservierter PMBZ. Die Immunzellen wurden mit den Zielzellen K-562 im Verhältnis 12,5:1 inkubiert. Die spezifische Aktivität entspricht dem Anteil toter Zielzellen innerhalb der Zielzellpopulation. Die Patienten erhielten für insgesamt 12 Wochen KON oder SYN. T 1: Beginn der Intervention; T 2: nach 6 Wochen Intervention; T 3: nach 12 Wochen Intervention. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.38.



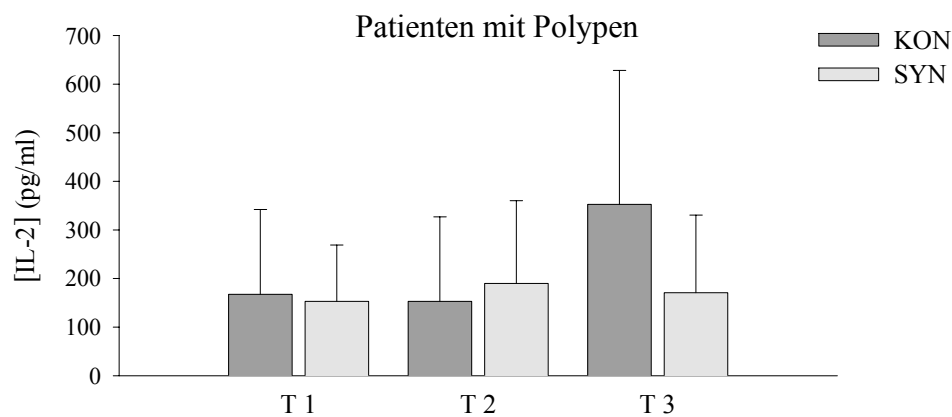
#### 4.6.4 Sekretion von Interleukin-2

Die IL-2-Sekretion der PMBZ der Krebspatienten wurde durch die Aufnahme von SYN nicht beeinflusst (**Abb. 4.42**).



**Abb. 4.42:** IL-2-Sekretion der PMBZ. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert. Stimulation der Zellen mit ConA (5 µg/ml). Die Patienten erhielten für insgesamt 12 Wochen KON oder SYN. T 1: Beginn der Intervention; T 2: nach 6 Wochen Intervention; T 3: nach 12 Wochen Intervention. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.39.

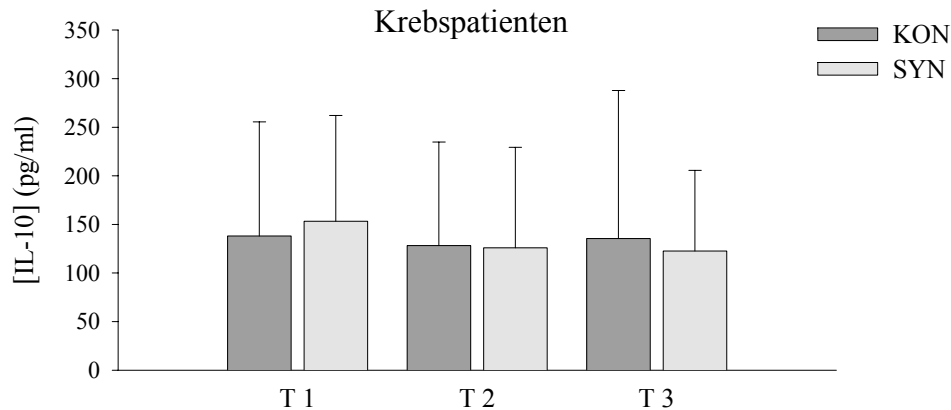
Die Aufnahme von SYN hatte keinen Einfluss auf die IL-2-Sekretion der PMBZ der Patienten mit Polypen (**Abb. 4.43**).



**Abb. 4.43:** IL-2-Sekretion der PMBZ. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert. Stimulation der Zellen mit ConA (5 µg/ml). Die Patienten erhielten für insgesamt 12 Wochen KON oder SYN. T 1: Beginn der Intervention; T 2: nach 6 Wochen Intervention; T 3: nach 12 Wochen Intervention. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.39.

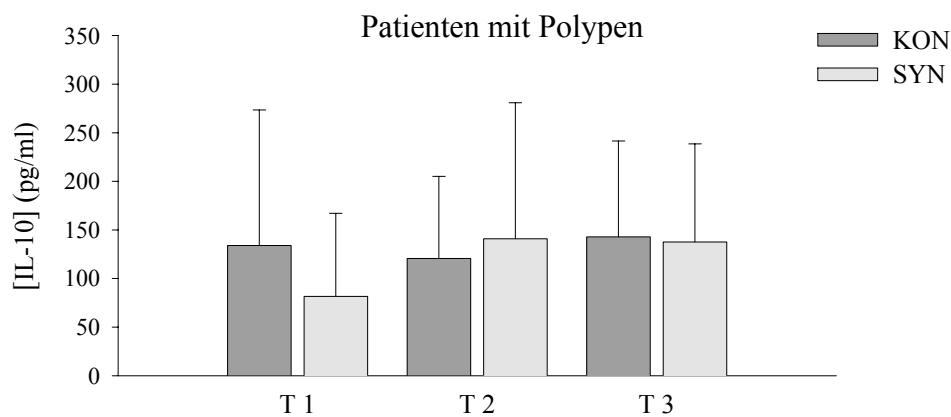
### 4.6.5 Sekretion von Interleukin-10

In der Gruppe der Krebspatienten wurde die IL-10-Sekretion der PMBZ durch die Aufnahme von SYN nicht beeinflusst (**Abb. 4.44**).



**Abb. 4.44:** IL-10-Sekretion der PMBZ. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert. Stimulation der Zellen mit PHA (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Die Patienten erhielten für insgesamt 12 Wochen KON oder SYN. T 1: Beginn der Intervention; T 2: nach 6 Wochen Intervention; T 3: nach 12 Wochen Intervention. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.40.

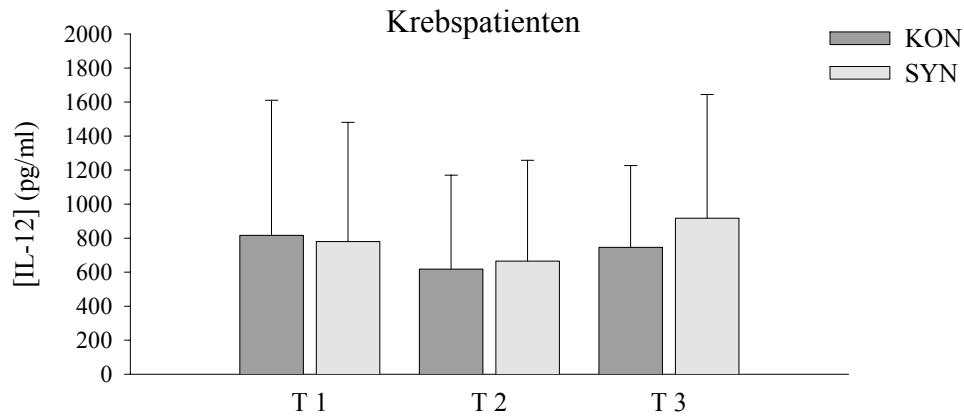
Der Verzehr von SYN hatte keinen Einfluss auf die IL-10-Sekretion der PMBZ der Patienten mit Polypen (**Abb. 4.45**).



**Abb. 4.45:** IL-10-Sekretion der PMBZ. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert. Stimulation der Zellen mit PHA (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Die Patienten erhielten für insgesamt 12 Wochen KON oder SYN. T 1: Beginn der Intervention; T 2: nach 6 Wochen Intervention; T 3: nach 12 Wochen Intervention. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.40.

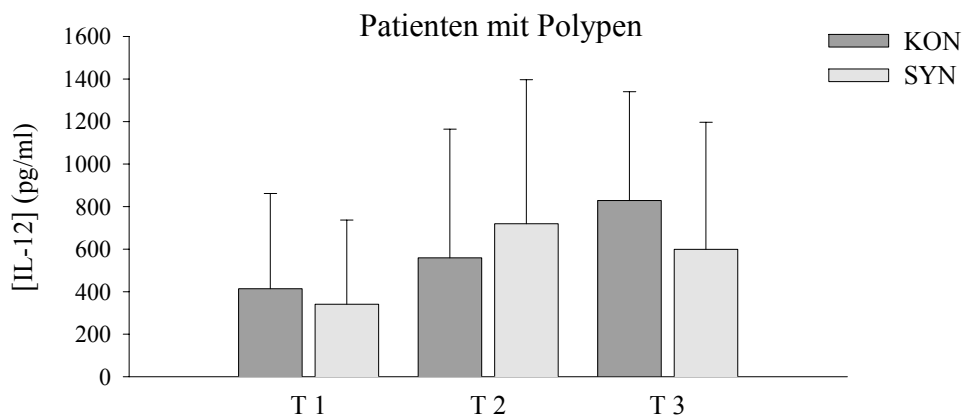
#### 4.6.6 Sekretion von Interleukin-12

Die Aufnahme von SYN hatte keinen Einfluss auf die IL-12-Sekretion der PMBZ der Krebspatienten (**Abb. 4.46**).



**Abb. 4.46:** IL-12-Sekretion der PMBZ. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert. Stimulation der Zellen mit LPS (1 ng/ml). Die Patienten erhielten für insgesamt 12 Wochen KON oder SYN. T 1: Beginn der Intervention; T 2: nach 6 Wochen Intervention; T 3: nach 12 Wochen Intervention. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.41.

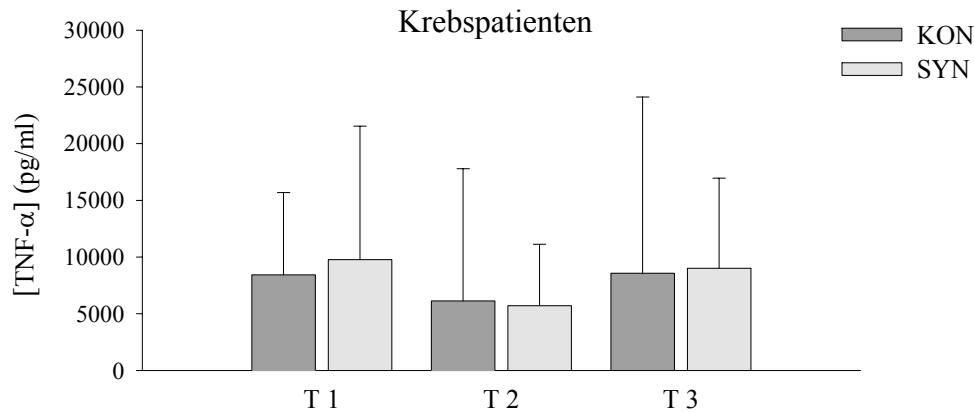
In der Gruppe der Patienten mit Polypen hatte der Verzehr von SYN keinen Einfluss auf die IL-12-Sekretion der PMBZ (**Abb. 4.47**).



**Abb. 4.47:** IL-12-Sekretion der PMBZ. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert. Stimulation der Zellen mit LPS (1 ng/ml). Die Patienten erhielten für insgesamt 12 Wochen KON oder SYN. T 1: Beginn der Intervention; T 2: nach 6 Wochen Intervention; T 3: nach 12 Wochen Intervention. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.41.

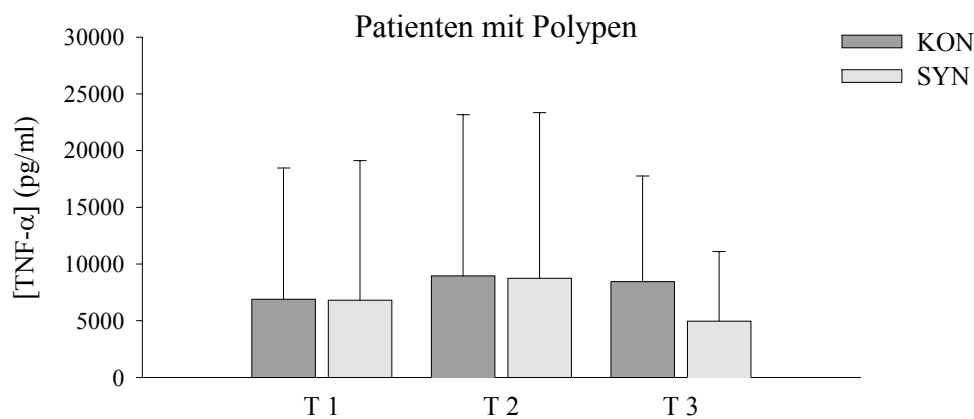
#### 4.6.7 Sekretion von Tumornekrosefaktor- $\alpha$

Die TNF- $\alpha$ -Sekretion der PMBZ wurde in der Gruppe der Krebspatienten durch den Verzehr von SYN nicht beeinflusst (**Abb. 4.48**).



**Abb. 4.48:** TNF- $\alpha$ -Sekretion der PMBZ. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert. Stimulation der Zellen mit LPS (1 ng/ml). Die Patienten erhielten für insgesamt 12 Wochen KON oder SYN. T 1: Beginn der Intervention; T 2: nach 6 Wochen Intervention; T 3: nach 12 Wochen Intervention. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.42.

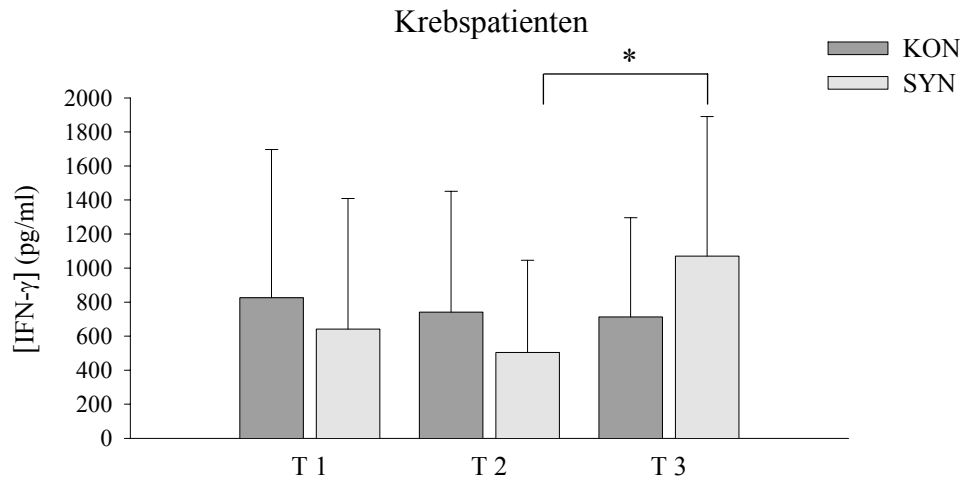
Die Aufnahme von SYN hatte keinen Einfluss auf die TNF- $\alpha$ -Sekretion der PMBZ der Patienten mit Polypen (**Abb. 4.49**).



**Abb. 4.49:** TNF- $\alpha$ -Sekretion der PMBZ. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert. Stimulation der Zellen mit LPS (1 ng/ml). Die Patienten erhielten für insgesamt 12 Wochen KON oder SYN. T 1: Beginn der Intervention; T 2: nach 6 Wochen Intervention; T 3: nach 12 Wochen Intervention. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.42.

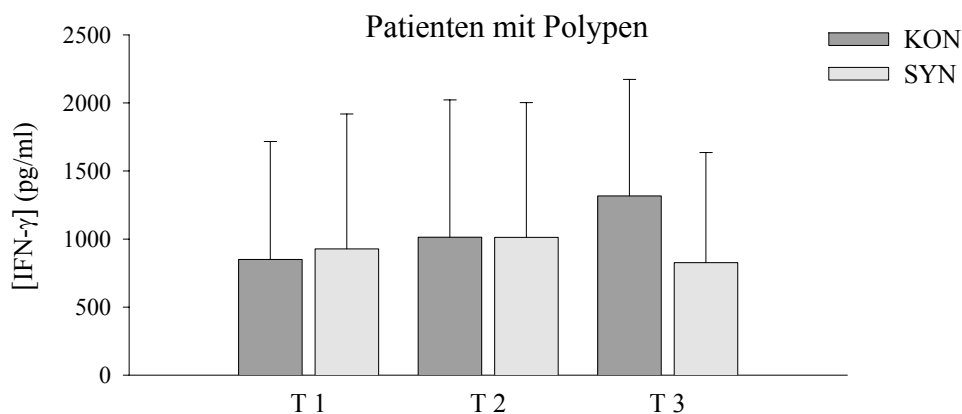
#### 4.6.8 Sekretion von Interferon- $\gamma$

In der Gruppe der Krebspatienten führte der Verzehr von SYN zu einer signifikant höheren IFN- $\gamma$ -Sekretion der PMBZ zum Zeitpunkt T 3 (**Abb. 4.50**).



**Abb. 4.50:** IFN- $\gamma$ -Sekretion der PMBZ. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert. Stimulation der Zellen mit ConA (5  $\mu$ g/ml). Die Patienten erhielten für insgesamt 12 Wochen KON oder SYN. T 1: Beginn der Intervention; T 2: nach 6 Wochen Intervention; T 3: nach 12 Wochen Intervention. \*:  $p < 0,05$  T 2 im Vergleich zu T 3. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.43.

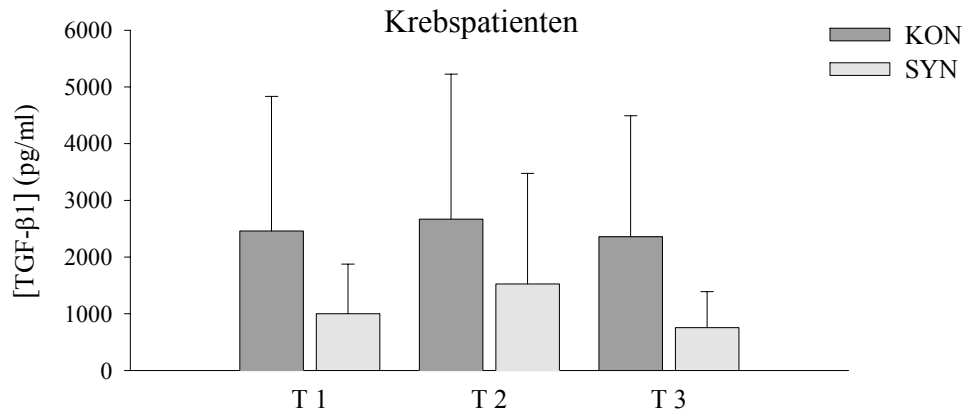
Die Aufnahme von SYN beeinflusste die IFN- $\gamma$ -Sekretion der PMBZ der Patienten mit Polypen nicht (**Abb. 4.51**).



**Abb. 4.51:** IFN- $\gamma$ -Sekretion der PMBZ. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert. Stimulation der Zellen mit ConA (5  $\mu$ g/ml). Die Patienten erhielten für insgesamt 12 Wochen KON oder SYN. T 1: Beginn der Intervention; T 2: nach 6 Wochen Intervention; T 3: nach 12 Wochen Intervention. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.43.

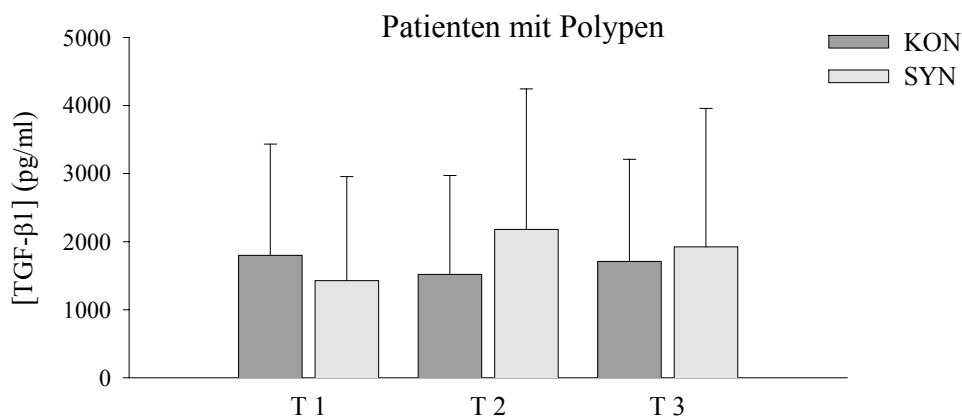
## 4.6.9 Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 im Fäzeswasser

Die Aufnahme von SYN hatte keinen Einfluss auf die TGF- $\beta$ 1-Konzentration im Fäzeswasser der Krebspatienten (**Abb. 4.52**).



**Abb. 4.52:** TGF- $\beta$ 1-Konzentration im Fäzeswasser. Die Patienten erhielten für insgesamt 12 Wochen KON oder SYN. T 1: Beginn der Intervention; T 2: nach 6 Wochen Intervention; T 3: nach 12 Wochen Intervention. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.44.

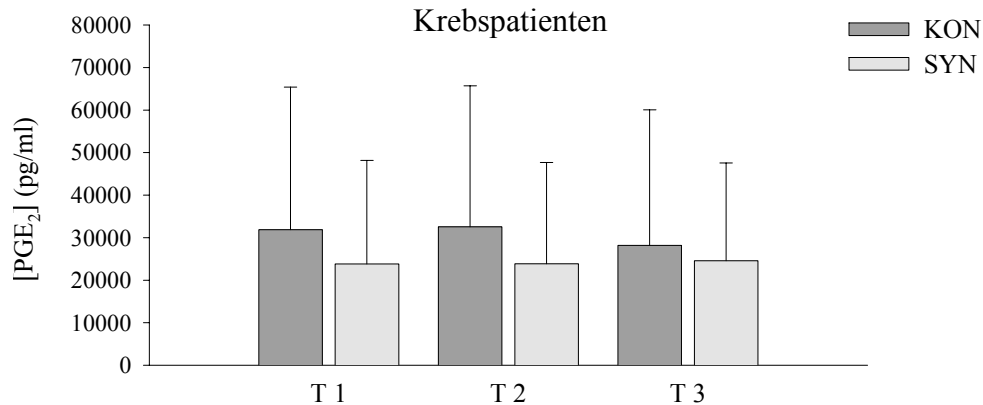
Die TGF- $\beta$ 1-Konzentration im Fäzeswasser der Patienten mit Polypen wurde durch den Verzehr von SYN nicht beeinflusst (**Abb. 4.53**).



**Abb. 4.53:** TGF- $\beta$ 1-Konzentration im Fäzeswasser. Die Patienten erhielten für insgesamt 12 Wochen KON oder SYN. T 1: Beginn der Intervention; T 2: nach 6 Wochen Intervention; T 3: nach 12 Wochen Intervention. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.44.

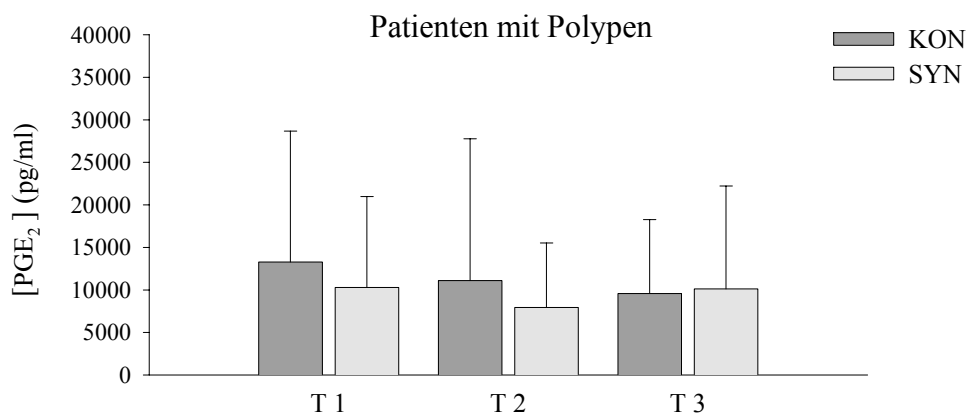
#### 4.6.10 Prostaglandin E<sub>2</sub> im Fäzeswasser

Der Verzehr von SYN hatte keinen Einfluss auf die PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Fäzeswasser der Krebspatienten (**Abb. 4.54**).



**Abb. 4.54:** PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Fäzeswasser. Die Patienten erhielten für insgesamt 12 Wochen KON oder SYN. T 1: Beginn der Intervention; T 2: nach 6 Wochen Intervention; T 3: nach 12 Wochen Intervention. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.45.

Die PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Fäzeswasser der Patienten mit Polypen wurde durch die Aufnahme von SYN nicht beeinflusst (**Abb. 4.55**).



**Abb. 4.55:** PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Fäzeswasser. Die Patienten erhielten für insgesamt 12 Wochen KON oder SYN. T 1: Beginn der Intervention; T 2: nach 6 Wochen Intervention; T 3: nach 12 Wochen Intervention. Die Einzelwerte finden sich im Tabellenanhang in Tab. 8.45.

#### 4.6.11 Einfluss von Geschlecht, BMI und Dukes-Klassifikation

Die Unterteilung der SYN-Gruppe und der Kontrollgruppe nach Geschlecht, BMI und Dukes-Klassifikation (Krebspatienten) ergab bei der weiteren statistischen Auswertung weder für die Krebspatienten noch für die Patienten mit Polypen signifikante Effekte durch die Aufnahme von SYN.

## 5 Diskussion

### 5.1 Tierstudien

#### 5.1.1 Lymphozytensubpopulationen

Nach der Selektion im Thymus verlassen die reifen, naiven T-Zellen den Thymus und gelangen über den Blutstrom zu den peripheren lymphatischen Geweben. Reife, naive T-Zellen exprimieren entweder den Korezeptor CD4 oder CD8. Bei einer Immunantwort differenzieren CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu Helfer-T-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen. Normalerweise bleibt das Verhältnis von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut und in den lymphatischen Geweben durch das Absterben reifer T-Zellen und das Heranreifen neuer T-Zellen konstant. Erst bei einer adaptiven Immunantwort, wenn eine klonale Expansion spezifischer T-Zellen stattfindet, kommt es zu einem Abweichen von dieser Homöostase (Janeway, 2001). Beim Menschen wurden Referenzbereiche für die absoluten Zellzahlen und die prozentualen Anteile der verschiedenen Immunzellsubpopulationen bestimmt. Abweichungen von diesen Referenzbereichen werden im klinischen Bereich als Hinweis für mögliche Immunerkrankungen gewertet. Beispielsweise korreliert die Zahl der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit dem Infektionsstatus von HIV-Erkrankten (HIV: human immunodeficiency virus), da insbesondere CD4<sup>+</sup>-T-Zellen von diesem Virus attackiert werden (Stein *et al.*, 1992).

##### 5.1.1.1 Einfluss von PRO auf die Lymphozytensubpopulationen

In den Tierstudien der vorliegenden Arbeit hatte die Fütterung der Versuchstiere mit PRO keinen signifikanten Einfluss auf die Lymphozytensubpopulationen des Blutes bzw. der untersuchten Organe. Tiere, die 4 Wochen lang mit PRO oder SYN gefüttert wurden (Studie 1), hatten jedoch einen (nicht signifikant) höheren Anteil CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut und dies führte zu einem tendenziell höheren Verhältnis CD4<sup>+</sup>-T-Zellen/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut. Dieses Ergebnis zeigt, dass die untersuchten Milchsäurebakterien möglicherweise die Zusammensetzung der Lymphozytenpopulation im Blut modulieren. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen belegen, dass Milchsäurebakterien einen Einfluss auf die Lymphozytenpopulation des Blutes und des darmassoziierten Immunsystems haben können. Herich *et al.* (2002) zeigten, dass entwöhnte Ferkel nach einer Aufnahme von *L. paracasei* (2 x 10<sup>9</sup> cfu/Tag) einen geringeren Anteil CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut hatten als die Ferkel der Kontrollgruppe. Diese Wirkung wurde nach einer Aufnahme von 10 Tagen beobachtet. In einer Studie von Perdigon *et al.* (1999) erhöhte die Verabreichung von *L. casei* CRL 431 und *L. plantarum* CRL 924 (jeweils 1 x 10<sup>9</sup> Zellen/Tag) bereits nach zwei Tagen die Zahl der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in der Lamina propria des Dünndarms von Mäusen. Dieser Effekt konnte jedoch nach einer Fütterungszeit von 7 Tagen nicht mehr beobachtet werden. Hingegen führte die Aufnahme von *L. rhamnosus* CRL 74 nach 2, 5 oder 7 Tagen zu einer Verringerung der Anzahl der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in der Lamina propria. *Lc. lactis* CRL 526, *L. acidophilus* CRL 924, *L. bulgaricus* CRL 423 und *S. thermophilus* CRL 412 hatten wiederum keinen Einfluss auf die Zahl der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in der Lamina propria. Diese Studie zeigte, dass nicht alle Bakterienarten zu einer Modulation der Lymphozytenpopulation in der Lamina propria führen. In Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen wurden die Lymphozytensubpopulationen durch die verwendeten Milchsäurebakterien ebenfalls nicht beeinflusst. In einer Studie von Gill *et al.* (2000) wurden Mäuse mit *L. rhamnosus* HN001, *L. acidophilus* HN017 oder *B. lactis* HN019 (jeweils 1 x 10<sup>9</sup> cfu/Tag in Magermilch, 10 oder 28 Tage lang) gefüttert. Die Kontrolltiere erhielten Magermilch ohne Zusatz. Es wurde keine Änderung des Anteils der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen oder



CD8<sup>+</sup>-T-Zellen des Blutes durch die aufgenommenen Milchsäurebakterien festgestellt. Die Fütterung von Ratten mit Joghurt (350 g/kg Futter, 4 Wochen lang), der *L. bulgaricus* 100158 und *S. thermophilus* 001158 (insgesamt  $2 \times 10^7$  Bakterien/ml Joghurt) enthielt, hatte keinen Einfluss auf den Anteil der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut, in der Milz und den PP. Die Kontrolltiere erhielten unfermentierte Milch. Allerdings nahm der Anteil der B-Zellen in den PP zu (Aattouri *et al.*, 2002).

Auch die Untersuchungen beim Menschen führten zu keinem einheitlichen Ergebnis. In einer Humanstudie von Gill *et al.* (2001c) führte die Aufnahme von *B. lactis* HN019 ( $5 \times 10^{10}$  Bakterien/Tag, 3 Wochen lang) zu einem höheren Anteil CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut älterer Probanden (Median: 69 Jahre). Diese Studie umfasste jedoch keine Kontrollgruppe. Hingegen beeinflusste die Aufnahme von *L. casei* Shirota ( $3 \times 10^{12}$  cfu/Tag, 4 Wochen lang), in einer placebokontrollierten Humanstudie von Spanhaak *et al.* (1998), den Anteil der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bzw. der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut nicht. Eine weitere Humanstudie, ohne Kontrollgruppe, führte zu einem ähnlichen Ergebnis: Der Verzehr von BB 12 ( $1 \times 10^{10}$  cfu/Tag) oder *L. acidophilus* LA1 ( $7 \times 10^{10}$  cfu/Tag), jeweils 3 Wochen lang, führte ebenfalls zu keinen Änderungen der Lymphozytensubpopulationen (CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen) (Schiffrin *et al.*, 1995).

Insgesamt machen diese Untersuchungen deutlich, dass unterschiedliche Arten von Milchsäurebakterien die Lymphozytenpopulation in unterschiedlicher Weise beeinflussen können. Es wurde sowohl eine Zunahme als auch eine Abnahme der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen beobachtet. Durch die Tierstudien der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von PRO zu keiner statistisch signifikanten Beeinflussung der Lymphozytenpopulation führt, obwohl ein tendenziell höheres Verhältnis CD4<sup>+</sup>-T-Zellen/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut festgestellt wurde. Diese Wirkung wurde nach einer Fütterungszeit von 4 Wochen beobachtet. Da in den Langzeitstudien 2 A und 2 B das Blut der Versuchstiere nicht zur Verfügung stand, konnten die Lymphozytensubpopulationen des Blutes nicht untersucht werden. Deshalb war es nicht möglich zu klären, ob dieser Effekt auch nach einer langfristigen Fütterung zu beobachten ist.

### 5.1.1.2 Einfluss von PRÄ auf die Lymphozytensubpopulationen

Die langfristige Fütterung mit PRÄ führte bei AOM-unbehandelten Tieren (Studie 2 B) zu einem verringerten Verhältnis CD4<sup>+</sup>-T-Zellen/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Milz. Das geringere Verhältnis beruhte auf einem (nicht signifikant) geringeren Anteil CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und einem (nicht signifikant) höheren Anteil CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Dagegen hatte die langfristige Fütterung mit PRÄ bei AOM-behandelten Tieren (Studie 2 A) keinen Einfluss auf die Lymphozytenpopulation. Auch die kurzzeitige Fütterung mit PRÄ (Studie 1) führte zu keiner Modulation der Lymphozytenpopulation der Versuchstiere.

Bislang haben nur sehr wenige Studien den Einfluss von Präbiotika auf die Lymphozytenpopulation untersucht. Zu den wenigen Untersuchungen, die bislang die Aufnahme von Fructooligosacchariden (FOS) untersucht haben, gehört eine Tierstudie von Swanson *et al.* (2002). Diese Arbeitsgruppe untersuchte bei Hunden den Einfluss von Mannanligosacchariden, FOS (jeweils 2 g/Tag, 14 Tage lang) bzw. einer Kombination beider Saccharide (insgesamt 4 g/Tag) auf die Anzahl der Leukozyten, der neutrophilen Granulozyten und der Lymphozyten im Blut. Lediglich die Verabreichung von Mannanligosacchariden erhöhte den prozentualen Anteil der Lymphozyten innerhalb der Leukozytenpopulation, nicht jedoch die Fütterung mit FOS. Manhard *et al.* (2003) fütterten Mäuse mit FOS (10 % (w/w) Futter, 16 Tage lang) und verabreichten einer Gruppe zusätzlich LPS, um eine Endotoxämie auszulösen. Wie frühere Untersuchungen gezeigt hatten, führt eine Endotoxämie zu einer Abnahme der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in den PP. Bei gesunden Tieren hatte die Verabreichung von FOS keinen Einfluss auf die Zahl der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in den PP. Nur bei

Tieren mit einer Endotoxämie wurde durch die Fütterung mit FOS eine Zunahme dieser beiden Lymphozytensubpopulationen beobachtet. Tierstudien, die gezeigt haben, dass eine Aufnahme von Ballaststoffen die Zusammensetzung der Lymphozytenpopulation modulieren kann, geben einen weiteren Hinweis auf mögliche Wirkungen von Präbiotika. Bei Ratten führte die Aufnahme von Konjak-Mannan oder Chitosan (5 g/100 g Futter, 2 Wochen lang) zu einem geringeren Anteil CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in den MLK, verglichen mit den Kontrolltieren, die Cellulose erhielten. Pektin (5 g/100 g Futter, 2 Wochen lang) hingegen erhöhte den Anteil der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in den MLK (Lim *et al.*, 1997).

Die Ergebnisse von Swanson *et al.* (2002) und Manhard *et al.* (2003) stehen im Einklang mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit. Das untersuchte Präbiotikum Raftilose<sup>®</sup> Synergy1, das ebenfalls zur Gruppe der FOS gehört, hatte nach einer kürzeren Fütterungsperiode bei gesunden Tieren ebenfalls keine Auswirkungen auf die Lymphozytensubpopulationen. Erst die langfristige Fütterung, die von anderen Arbeitsgruppen jedoch nicht untersucht wurde, führte in der vorliegenden Arbeit zu einer Modulation.

In einer Humanstudie, ohne Kontrollgruppe, von Guigoz *et al.* (2002) wurde bereits nach 3 Wochen ein Einfluss von FOS auf die Lymphozytensubpopulationen festgestellt. In dieser Untersuchung verzehrten ältere Probanden (85 Jahre  $\pm$  6 Jahre) kurzkettige FOS (8 g/Tag). Die Aufnahme von FOS führte zu einem höheren Anteil CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut. Im Unterschied zu der Studie von Guigoz *et al.* (2002) wurde in den vorliegenden Tierstudien erst durch die langfristige Fütterung mit PRÄ ein geringerer Anteil CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und ein höherer Anteil CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Milz beobachtet. Die unterschiedlichen Ergebnisse beruhen möglicherweise darauf, dass die Aufnahme von FOS bei Ratten eine andere Wirkung hat als beim Menschen. Es ist auch denkbar, dass die Lymphozytensubpopulationen des Blutes und der Milz unterschiedlich auf die Aufnahme von FOS reagieren.

Die langfristige Aufnahme von PRÄ beeinflusste nur die Lymphozytensubpopulationen gesunder Tiere, nicht jene AOM-behandelter Tiere. Ein Vergleich der beiden entsprechenden Kontrollgruppen zeigt, dass die Behandlung mit AOM bereits zu einer signifikanten Zunahme der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Milz führte. Es ist zu vermuten, dass der Einfluss von PRÄ auf die Lymphozytensubpopulation zu gering war, um zu einer darüber hinausgehenden Zunahme der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu führen.

### 5.1.1.3 Einfluss von SYN auf die Lymphozytensubpopulationen

Die Fütterung mit SYN hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Lymphozytensubpopulationen. Die kurzzeitige Aufnahme (Studie 1) von SYN führte jedoch zu einem (nicht signifikant) höheren Anteil der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut und damit zu einem tendenziell höheren Verhältnis CD4<sup>+</sup>-T-Zellen/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut. Sowohl die Fütterung mit SYN als auch mit PRO hatte einen höheren Anteil der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut zur Folge. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurden in der Studie von Herich *et al.* (2002) gegensätzliche Wirkungen von Pro- und Synbiotikum festgestellt. Die Fütterung von *L. paracasei* alleine führte zu einer Verringerung des Anteils der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut der Ferkel. Hingegen bewirkte die kombinierte Fütterung von *L. paracasei* und Oligofruktose eine Erhöhung des Anteils der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut.

Aus technischen Gründen konnte bei den Langzeitstudien 2 A und 2 B das Blut nicht untersucht werden. Deshalb ist nicht geklärt, ob hier die Verabreichung von SYN ebenfalls zu einer Modulation der Lymphozytensubpopulation des Blutes führt.

Das Verhältnis CD4<sup>+</sup>-T-Zellen/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bleibt im Körper generell konstant, solange keine adaptive Immunantwort stattfindet. Bislang ist nicht geklärt, welche Bedeutung beim gesunden Menschen eine Modulation der Lymphozytensubpopulationen hat. Aus diesem Grund lässt sich nicht beurteilen, ob die Beeinflussung der Lymphozytensubpopulationen durch Pro-, Prä oder Synbiotika eine positive Wirkung auf die Gesundheit hat. Eine Modifikation der Lymphozytensubpopulationen bedeutet jedoch, dass entweder die Proliferation oder die Apoptoserate einer bzw. mehrerer Subpopulationen beeinflusst wird, oder aber die Verteilung der Subpopulationen in den Organen und/oder im Blut verändert wird.

## 5.1.2 Phagozytoseaktivität

Phagozyten sind ein Teil der unspezifischen Immunreaktion. Sie sind an der angeborenen Abwehrreaktion gegen Pathogene im Körper beteiligt, bevor es zu einer antigen-spezifischen Immunantwort kommt. Bei einer Aktivierung sezernieren Phagozyten unter anderem Zytokine und beeinflussen hierdurch die folgende antigen-spezifische Immunreaktion. Die Phagozytoseaktivität *ex vivo* ist ein Maß für die Funktionsfähigkeit der Phagozyten. Die Aktivität gibt Auskunft über den Anteil der Zellen, die Bakterien aufgenommen haben. Die mittlere Fluoreszenzintensität ist hierbei ein Maß für die Zahl aufgenommener Bakterien pro aktivem Phagozyt.

### 5.1.2.1 Einfluss von PRO auf die Phagozytoseaktivität

In keiner Tierstudie der vorliegenden Arbeit beeinflusste die Fütterung mit PRO die Aktivität der Phagozyten des Blutes (Studie 1) bzw. der Milz (Studien 1 und 2). Im Gegensatz zu diesem Ergebnis hatten einige Tier- und Humanstudien anderer Arbeitsgruppen gezeigt, dass die Aufnahme von Milchsäurebakterien zu einer Stimulation der Phagozytoseaktivität führen kann. In der Studie von Gill *et al.* (2000) an Mäusen verstärkte die Fütterung mit *L. rhamnosus* HN001, *L. acidophilus* HN017 oder *B. lactis* HN019 die Aktivität der Phagozyten des Blutes. In einer zweiten Studie, ebenfalls an Mäusen, zeigte diese Arbeitsgruppe, dass die Verabreichung von *L. rhamnosus* HN001 in einer Dosis von  $1 \times 10^{11}$  cfu/Tag zu einer stärkeren Stimulation der Phagozytoseaktivität führt als in einer Dosis von  $1 \times 10^7$  cfu/Tag (Gill & Rutherford, 2001b). Einige Unterschiede zwischen den zitierten Studien und den Tierstudien der vorliegenden Arbeit können zur Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse beitragen: Die Tiere der ersten Tierstudie von Gill *et al.* (2000) wurden mit Cholera-toxin oder Tetanusvakzine behandelt. Dies führt an sich zu einer Stimulation des Immunsystems und kann dazu führen, dass die Immunzellen dieser Tiere auf eine zusätzliche Stimulation durch Milchsäurebakterien in stärkerer Weise reagieren als Immunzellen un behandelter Tiere. Die Tiere der vorliegenden Arbeit erhielten eine fettreiche Diät (231 g Maisöl/kg Futter) mit einem geringen Celluloseanteil (20 g Cellulose/kg Futter). Diese Diät wurde verwendet um die westliche Ernährungsweise, die mit einem hohen Risiko für eine Darmkrebserkrankung einhergeht, nachzuahmen. Außerdem sollten mögliche protektive Effekte, durch einen hohen Ballaststoffanteil, ausgeschlossen werden. Hingegen wurde in den Tierstudien von Gill *et al.* eine fettarme Diät (80 g Maisöl/kg Futter) verabreicht. Der Fettgehalt des Futters und die verabreichte Fettart haben generell einen Einfluss auf das Immunsystem (De Pablo & De Cienfuegos, 2000). In einer Studie von Wallace *et al.* (2000) wurde ein deutlicher Einfluss einer fettreichen Diät (21 % w/w) auf die Funktionen peritonealer Makrophagen nachgewiesen. Die fettreiche Diät verminderte die LPS-vermittelte Zytotoxizität, die Bildung von Stickstoffoxid sowie die Bildung von TNF- $\alpha$ . Da die Aufnahme von Milchsäurebakterien in Verbindung mit einer fettreichen Diät zu keiner Stimulation der Phagozytoseaktivität führte,

liegt die Vermutung nahe, dass die fettreiche Diät eine Stimulation der Phagozyten durch die verabreichten Milchsäurebakterien verhinderte.

In mehreren Humanstudien von Gill *et al.*, allerdings jeweils ohne Kontrollgruppe, führte die Aufnahme von Milchsäurebakterien zu einer Stimulation der Phagozytoseaktivität. Ältere Probanden nahmen 3 Wochen lang *L. rhamnosus* HN001 oder *B. lactis* HN019 (jeweils  $5 \times 10^9$  cfu/Tag oder  $5 \times 10^{10}$  cfu/Tag) auf. Die Aufnahme dieser Milchsäurebakterien führte zu einer höheren Phagozytoseaktivität der Granulozyten und Monozyten des Blutes, im Vergleich zur Phagozytoseaktivität vor der Intervention (Gill & Rutherford, 2001a; Gill *et al.*, 2001a; Gill *et al.*, 2001c). In einer placebokontrollierten Humanstudie mit älteren Probanden (Median 69 Jahre) führte der Verzehr von *B. lactis* HN019 ( $3 \times 10^{11}$  cfu/Tag, 6 Wochen lang) ebenfalls zu einer erhöhten Phagozytoseaktivität der Granulozyten des Blutes (Arunachalam *et al.*, 2000).

Sowohl in den Studien von Gill *et al.* als auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Verabreichung von *L. rhamnosus* untersucht. Da es sich jedoch um verschiedene Bakterienstämme handelte, kann die Aufnahme dieser Stämme auch zu unterschiedlichen Modulationen der Phagozytoseaktivität führen. Obwohl in einer Humanstudie von Schiffrin *et al.* (1995) gezeigt wurde, dass BB12 die Phagozytoseaktivität stimulieren kann, ist zu bedenken, dass in der vorliegenden Arbeit BB12 in Kombination mit LGG verabreicht wurde. Möglicherweise führt die Aufnahme zweier Milchsäurebakterienstämme zu anderen Reaktionen des Immunsystems als die separate Aufnahme.

Die vorliegenden Ergebnisse stehen jedoch im Einklang mit der bereits erwähnten placebokontrollierten Humanstudie von Spanhaak *et al.* (1998). In dieser Studie nahmen die Probanden *L. casei* Shirota ( $3 \times 10^{12}$  cfu/Tag, 4 Wochen lang) auf. Die Phagozytoseaktivität der Granulozyten des Blutes wurde hierdurch ebenfalls nicht beeinflusst.

#### **5.1.2.2 Einfluss von PRÄ auf die Phagozytoseaktivität**

Die Fütterung mit PRÄ beeinflusste die Aktivität der Phagozyten in keiner der vorliegenden Tierstudien signifikant. Bei langfristiger Gabe an AOM-unbehandelte Tiere (Studie 2 B) führte PRÄ jedoch zu einer tendenziell verminderten mittleren Fluoreszenzaktivität der aktiven Monozyten.

Bislang gab es nur eine Studie, die in vergleichbarer Weise untersucht hat, ob die Aufnahme von Präbiotika zu einer Beeinflussung der Phagozytoseaktivität führt. Die bereits erwähnte Humanstudie von Guigoz *et al.* (2002), ohne Kontrollgruppe, führte zu einem ähnlichen Ergebnis wie die vorliegenden Studien. In dieser Untersuchung nahmen ältere Probanden ( $85 \pm 6$  Jahre) täglich 8 g kurzkettige FOS (3 Wochen lang) zu sich. Nach der Intervention zeigten die Granulozyten und Monozyten des Blutes eine verminderte Phagozytoseaktivität.

#### **5.1.2.3 Einfluss von SYN auf die Phagozytoseaktivität**

Durch die langfristige Fütterung AOM-behandelter Tiere (Studie 2 A) mit SYN wurde die Phagozytoseaktivität der Monozyten aus der Milz vermindert. Sowohl die kurzzeitige als auch die langfristige Fütterung mit SYN hatte bei gesunden Tieren keinen Einfluss auf die Phagozytoseaktivität.

Diese Untersuchungen gehören zu den wenigen Studien, die den möglichen Einfluss einer Aufnahme von Synbiotika auf die Aktivität der Phagozyten hin untersucht haben. Die Tierstudie von Herich *et al.* (2002) führte zu einem ähnlichen Ergebnis wie die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit. In dieser Studie wurden neugeborene Ferkel, 10 Tage lang, mit *L. paracasei* ( $2 \times 10^9$  cfu/Tag) in Kombination mit Oligofruktose (3 g/Tag) gefüttert. Die

Kontrolltiere erhielten Milchpulver. Die Fütterung der Ferkel mit dem Synbiotikum führte zu einer geringeren Phagozytoseaktivität der Granulozyten. Allerdings hatte die Verfütterung des Synbiotikums bei älteren Ferkeln (36 Tage alt) keinen Einfluss auf die Aktivität der Phagozyten.

Nach Lehmann *et al.* (2000) führt beim Menschen die Beeinträchtigung der Phagozytoseaktivität zu einer erhöhten Infektanfälligkeit. Dies führt zu der Vermutung, dass eine Stimulation der Phagozytoseaktivität zu einer geringeren Infektanfälligkeit beiträgt. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen hatten gezeigt, dass die Aufnahme von Milchsäurebakterien zu einer Stimulation der Aktivität von Phagozyten führen kann. Im Gegensatz hierzu hatte die Fütterung von PRO in den Tierstudien der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf die Aktivität der Phagozyten. Darüber hinaus führte die Fütterung mit PRÄ in Studie 2 B zu einer tendenziell geringeren mittleren Fluoreszenzintensität der aktiven Monozyten. Die Aufnahme von SYN in Studie 2 A resultierte in einer geringeren Aktivität der Monozyten. Da diese Verringerungen jedoch nicht so bedeutend waren, muss nicht davon ausgegangen werden, dass diese Tiere dadurch eine höhere Anfälligkeit für Infektionen hatten. PRÄ oder SYN beeinflussten die Aktivität der Monozyten, nicht aber die Aktivität der Granulozyten. Die Aktivität von Monozyten/Makrophagen und neutrophilen Granulozyten wird durch Zytokine teilweise unterschiedlich reguliert, so dass eine Beeinflussung der Monozyten/Makrophagen nicht unbedingt gleichzeitig mit einer Beeinflussung der Granulozyten einhergehen muss.

### 5.1.3 Oxidativer Burst

Während einer Abwehrreaktion dient der oxidative Burst dazu, aufgenommene Mikroorganismen im Phagolysosom abzutöten. Durch die Bestimmung des oxidativen Burst *ex vivo* kann ebenfalls die Funktionsfähigkeit der Phagozyten untersucht werden. Bei dieser Bestimmung werden die Phagozyten durch Stimulation mit PMA zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) angeregt. Danach wird der Anteil der Phagozyten gemessen, die ROS gebildet haben. Die mittlere Fluoreszenzintensität ist hier das Maß für die Enzymaktivität der aktiven Phagozyten. Der oxidative Burst wurde aus technischen Gründen ausschließlich in der Tierstudie 1 und nur für die Granulozyten des Blutes gemessen.

#### 5.1.3.1 Einfluss von PRO auf den oxidativen Burst

Bei Fütterung der Versuchstiere mit PRO wurde keine Beeinflussung des oxidativen Burst festgestellt. Bislang wurde eine mögliche Beeinflussung des oxidativen Burst durch Aufnahme von Milchsäurebakterien nur in einigen wenigen Humanstudien untersucht. In der Studie von Donnet-Hughes *et al.* (1999) verzehrten die Probanden 3 Wochen lang fermentierte Milch oder fermentierte Milch mit *L. johnsonii* La1 ( $1,5 \times 10^9$  cfu/Tag oder  $1,5 \times 10^8$  cfu/Tag). Der oxidative Burst der Phagozyten des Blutes wurde gemessen. In der Gruppe, die *L. johnsonii* La 1 in einer Dosis von  $1,5 \times 10^9$  cfu/Tag erhielt, war die mittlere Fluoreszenzintensität der aktiven Phagozyten signifikant höher als vor der Intervention. Allerdings war ein ähnlicher, jedoch nicht signifikanter, Anstieg ebenfalls in den beiden anderen Gruppen zu beobachten. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde in drei weiteren Humanstudien keine Beeinflussung des oxidativen Burst durch den Verzehr von Milchsäurebakterien festgestellt. In der placebokontrollierten Studie von Spanhaak *et al.* (1998) beeinflusste der Verzehr von *L. casei* Shirota den oxidativen Burst der Granulozyten des Blutes nicht. Der Verzehr von *L. paracasei* LTH 2579 ( $5 \times 10^9$  cfu/Tag in Wurst,

4 Wochen lang) hatte keinen Einfluss auf den oxidativen Burst der Leukozyten des Blutes (Jahreis *et al.*, 2002). In einer Crossover-Studie verzehrten Atopie-Patienten täglich 498 g Joghurt, der *L. bulgaricus* ( $2,5 - 3 \times 10^8$  cfu/g) und *S. thermophilus* ( $3,5 - 4,1 \times 10^8$  cfu/g) enthielt. Die 4-wöchige Aufnahme des Joghurts hatte keinen Einfluss auf den oxidativen Burst der Phagozyten des Blutes (Wheeler *et al.*, 1997).

### **5.1.3.2 Einfluss von PRÄ auf den oxidativen Burst**

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal der Zusammenhang zwischen der Aufnahme von FOS und oxidativem Burst untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die kurzfristige Fütterung mit PRÄ keinen Einfluss auf den oxidativen Burst der Granulozyten des Blutes hat.

### **5.1.3.3 Einfluss von SYN auf den oxidativen Burst**

Die kurzzeitige Fütterung mit SYN hatte keinen Einfluss auf den Anteil der Granulozyten, die reaktive Sauerstoffspezies gebildet hatten. Jedoch führte die Aufnahme von SYN zu einer tendenziell geringeren mittleren Fluoreszenzintensität der aktiven Granulozyten. Die langfristige Aufnahme von SYN führte auch zu einer verminderten Phagozytoseaktivität der Monozyten (siehe 5.1.2.3). Insgesamt zeigt dies, dass die Fütterung mit SYN zu einer geringeren Aktivität der Phagozyten beiträgt. Es liegen keine weiteren Studien anderer Arbeitsgruppen vor, die den Einfluss von Synbiotika auf den oxidativen Burst der Phagozyten untersucht haben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Fütterung mit PRO und PRÄ keinen Einfluss auf den oxidativen Burst der Granulozyten hatte. Hingegen hatte die Aufnahme von SYN eine tendenziell verminderte Enzymaktivität der aktiven Granulozyten zur Folge.

## **5.1.4 Aktivität der natürlichen Killerzellen**

NK-Zellen haben eine wichtige Funktion in der frühen Phase der Immunabwehr, da sie ohne vorherige Aktivierung virusinfizierte Zellen und Tumorzellen abtöten. Durch die Abgabe von Zytokinen und Chemokinen haben sie außerdem regulatorischen Einfluss auf die nichtadaptive sowie die adaptive Immunantwort. Eine niedrige NK-Aktivität *ex vivo* der Immunzellen des Blutes korreliert mit einem erhöhten Risiko für Krebserkrankungen (Imai *et al.*, 2000).

### **5.1.4.1 Einfluss von PRO auf die Aktivität der natürlichen Killerzellen**

Die Fütterung mit PRO beeinflusste in keiner Tierstudie der vorliegenden Arbeit die NK-Aktivität der Immunzellen des Blutes (Studie 1) bzw. der untersuchten Organe (Studien 1 und 2). Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen hatten gezeigt, dass die Aufnahme von Milchsäurebakterien zu einer Zunahme der Aktivität der NK-Zellen führen kann. Im Tierversuch wiesen Mäuse, die mit *L. casei* Shirota (hitzeabgetötet, 0,05 % w/w, 2 Monate) gefüttert wurden, eine höhere NK-Aktivität der Immunzellen des Blutes und der Milz auf (Hori *et al.*, 2003). Auch bei Mäusen, die mit 3-Methylcholanthren (kanzerogen) behandelt worden waren, führte die Fütterung von *L. casei* Shirota (0,05 % w/w, 5 Wochen) zu einer höheren NK-

Aktivität der Immunzellen aus der Milz (Takagi *et al.*, 2001). In der Tierstudie von Gill *et al.* (2000), ebenfalls an Mäusen, führte die Fütterung mit *L. rhamnosus* HN001 (jeweils  $1 \times 10^9$  cfu/Tag, 28 Tage lang) zu einer höheren NK-Aktivität der Immunzellen der Milz. Die Aufnahme von *L. acidophilus* HN017 oder *B. lactis* HN019 beeinflusste die NK-Aktivität jedoch nicht. Hingegen beeinflusste in einer Humanstudie derselben Arbeitsgruppe sowohl die Aufnahme von *L. rhamnosus* HN001 ( $5 \times 10^{10}$  cfu/Tag) als auch *B. lactis* HN019 ( $5 \times 10^9$  cfu/Tag) die NK-Aktivität. Ältere Probanden (Median 70 Jahre) nahmen 3 Wochen lang *L. rhamnosus* oder *B. lactis* zu sich. Der Aufnahme beider Bakterienstämme resultierte in einer höheren NK-Aktivität der Immunzellen des Blutes (Gill *et al.*, 2001b). Allerdings beinhaltete diese Studie keine Kontrollgruppe und die Probanden wiesen vor der Intervention eine sehr geringe NK-Aktivität auf.

Die gegensätzlichen Ergebnisse der vorliegenden Tierstudien und der zitierten Untersuchungen können durch wichtige Unterschiede im Studiendesign erklärt werden. In den Studien von Gill *et al.* und in der vorliegenden Arbeit wurden jeweils *L. rhamnosus* und *B. lactis* untersucht. Es handelte sich jedoch um verschiedene Bakterienstämme, die folglich unterschiedlichen Einfluss auf das Immunsystem haben können. In der Tierstudie von Gill *et al.* (2000) wurden die Mäuse zudem mit einem Tetanusvakzine behandelt. Dies alleine führt bereits zu einer Stimulation des Immunsystems und möglicherweise dazu, dass die zusätzliche Aufnahme von Milchsäurebakterien die NK-Aktivität stärker beeinflusst als dies bei unbehandelten Tieren der Fall wäre. Die fettreiche Diät, die in den vorliegenden Tierstudien verwendet wurde, hatte möglicherweise einen Einfluss auf die NK-Aktivität der Immunzellen. In Tierstudien wurde gezeigt, dass eine fettreiche Diät (20 % w/w (Yaqoob *et al.*, 1994) oder 17,8 % w/w (Jeffery *et al.*, 1997)) die NK-Aktivität der Immunzellen der Milz deutlich verringert. Die Reduktion des Fettanteils in der Nahrung führte bei Männern ( $31 \pm 5,5$  Jahre) nach 3 Monaten zu einer erhöhten NK-Aktivität der Immunzellen des Blutes (Barone *et al.*, 1989). Möglicherweise wurden stimulierende Effekte von PRO auf die NK-Aktivität durch die verabreichte fettreiche Basisdiät, und ihren hemmenden Einfluss auf die NK-Aktivität, überlagert.

In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen sind jedoch die Resultate der Humanstudie von Spanhaak *et al.* (1998). Hier hatte der Verzehr von *L. casei* Shirota ebenfalls keinen Einfluss auf die NK-Aktivität der Immunzellen des Blutes.

#### **5.1.4.2 Einfluss von PRÄ auf die Aktivität der natürlichen Killerzellen**

Die langfristige Fütterung AOM-unbehandelter Tiere (Studie 2 B) mit PRÄ führte zu einer höheren NK-Aktivität der Immunzellen der Milz. Hingegen hatte die kurzzeitige Aufnahme von PRÄ (Studie 1) keinen Einfluss auf die NK-Aktivität. Die langfristige Verabreichung von PRÄ an AOM-behandelte Tiere (Studie 2 A) beeinflusste die NK-Aktivität ebenfalls nicht. Bislang gab es keine Studien zu möglichen Wirkungen von FOS auf die NK-Aktivität. In der vorliegenden Arbeit wurde dies erstmals untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die kurzzeitige Aufnahme von PRÄ keinen Einfluss auf die NK-Aktivität hatte. Erst eine langfristige Verabreichung von PRÄ führte bei gesunden Tieren zu einer Stimulation der NK-Aktivität.

#### **5.1.4.3 Einfluss von SYN auf die Aktivität der natürlichen Killerzellen**

Die kurzzeitige Fütterung mit SYN (Studie 1) führte zu einer tendenziell höheren Aktivität der Immunzellen des Blutes. Die langfristige Aufnahme von SYN hatte hingegen keinen Einfluss auf die NK-Aktivität bei gesunden Tieren. Durch die langfristige Fütterung AOM-behandelter Tiere (Studie 2 A) mit SYN wurde die NK-Aktivität der Immunzellen der PP

stimuliert. In einer Humanstudie von Chiang *et al.* (2000) wurden ähnliche Wirkungen beobachtet. Die Probanden verzehrten, 3 Wochen lang, entweder *B. lactis* HN019 ( $2,5 \times 10^{10}$  cfu/Tag) in Milch oder *B. lactis* HN019 in, mit Oligosacchariden angereicherter, Milch. Die Aufnahme von *B. lactis* mit Oligosacchariden führte nach der Intervention zu einer stärkeren Stimulation der NK-Aktivität der Immunzellen des Blutes als die Aufnahme von *B. lactis* alleine. Diese Studie beinhaltete jedoch keine Kontrollgruppe.

Die Behandlung mit AOM selbst hatte einen Einfluss auf die NK-Aktivität wie der Vergleich der beiden Kontrollgruppen der Studie 2 A und 2 B zeigt. Die Behandlung mit AOM führte zu einer tendenziell geringeren NK-Aktivität der Immunzellen aus der Milz und zu einer signifikanten Verringerung der NK-Aktivität der Immunzellen aus den PP. Die Aufnahme von SYN stimulierte bei AOM-behandelten Tieren die NK-Aktivität der Immunzellen der Milz und der PP in solch einem Maß, dass sie annähernd so hoch war wie die der unbehandelten Kontrollgruppe.

Die Studien anderer Arbeitsgruppen hatten gezeigt, dass Milchsäurebakterien eine Stimulation der NK-Aktivität der Immunzellen bewirken können. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Milchsäurebakterien führten bei alleiniger Verabreichung jedoch nicht zu einer Stimulation der NK-Aktivität. Hingegen bewirkte die alleinige Aufnahme von PRÄ eine Stimulation der NK-Aktivität. Insgesamt scheint jedoch die kombinierte Verabreichung von PRO und PRÄ die Aktivität der NK-Zellen stärker zu beeinflussen. Ob die höhere NK-Aktivität auf einer Zunahme der NK-Zellen innerhalb der untersuchten Zellpopulation beruht oder ob die einzelnen NK-Zellen eine stärkere Tötungsaktivität besitzen, muss durch weitere Studien geklärt werden.

## **5.1.5 Proliferation**

Bei der Bestimmung der Proliferation *ex vivo* werden die Lymphozyten mit Hilfe eines polyklonal stimulierenden Mitogens unspezifisch stimuliert und zur Proliferation angeregt. Das Mitogen veranlasst die normalerweise ruhenden Lymphozyten zum Eintritt in den Zellzyklus. Diese Bestimmung dient als Indikator für die generelle Bereitschaft der Lymphozyten auf ein Aktivierungssignal zu antworten. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Mitogen Concanavalin A stimuliert spezifisch T-Zellen zur Proliferation.

### **5.1.5.1 Einfluss von PRO auf die Proliferation**

In keiner Tierstudie der vorliegenden Arbeit hatte die Fütterung mit PRO einen Einfluss auf die Proliferation der Immunzellen aus den untersuchten Organen. Im Gegensatz hierzu zeigten Tierstudien anderer Arbeitsgruppen, dass die Aufnahme von Milchsäurebakterien die Proliferation der Immunzellen anregt. In der Studie von Aattouri *et al.* (2002) wurden Ratten, 4 Wochen lang, mit 350 g Joghurt gefüttert, der *L. bulgaricus* 100158 und *S. thermophilus* 001158 ( $2 \times 10^7$  Bakterien/ml Joghurt) enthielt. Die Kontrollgruppe erhielt unfermentierte Milch ohne Bakterien. Die Fütterung mit Joghurt führte zu einer vermehrten Proliferation der T-Zellen des Blutes, der Milz und der PP. Die Fütterung von Mäusen mit *L. rhamnosus* HN001, *L. acidophilus* HN017 oder *B. lactis* HN019 (jeweils  $1 \times 10^9$  cfu/Tag) führte nach 28 Tagen zu einer stärkeren Proliferation der T-Zellen der Milz (Gill *et al.*, 2000).

Wie bereits erwähnt, beeinflusst eine fettreiche Diät grundsätzlich das Immunsystem. Ein Einfluss auf die Proliferation *ex vivo* wurde ebenfalls festgestellt. Eine fettreiche Diät führt zu



einer geringeren Zellproliferation verglichen mit einer fettarmen Diät. Diese Wirkung wird jedoch nur beobachtet, wenn beim Proliferationstest die Immunzellen in autogenem Serum kultiviert werden und nicht in fötalem Kälberserum (Calder, 1998). Da in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit mit fötalem Kälberserum gearbeitet wurde, kann in diesem Fall der Einfluss der fettreichen Diät auf die Zellproliferation ausgeschlossen werden.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde in einer Humanstudie von Campbell *et al.* (2000) ebenfalls kein Einfluss von Milchsäurebakterien auf die Proliferation festgestellt. In dieser Studie verzehrten Frauen 3 Monate lang Joghurt (454 g/Tag mit *L. bulgaricus* und *S. thermophilus* > 1 x 10<sup>7</sup> cfu/g Joghurt). Die Kontrollgruppe verzehrte in dieser Zeit keinen Joghurt. Die Proliferation der T-Zellen war weder nach 4 noch nach 12 Wochen durch den Verzehr von Joghurt beeinflusst.

#### **5.1.5.2 Einfluss von PRÄ auf die Proliferation**

Die Fütterung mit PRÄ führte ebenfalls zu keiner Modulation der Proliferation der T-Zellen aus den untersuchten Organen. Dieses Untersuchungsergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen einer placebokontrollierten Humanstudie von Bunout *et al.* (2002). Ältere Probanden (≥ 70 Jahre) verzehrten pro Tag 6 g einer Mischung aus 70 % Oligofruktose (Raftilose) und 30 % Inulin (Raftiline). Alle Probanden erhielten zusätzlich ein Nahrungsergänzungsmittel, das 50 % des täglichen Vitaminbedarfs deckte. Nach 8 Wochen konnte kein Einfluss auf die Proliferation der T-Zellen des Blutes festgestellt werden.

#### **5.1.5.3 Einfluss von SYN auf die Proliferation**

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss von Synbiotika auf die Proliferation untersucht. Die kurzzeitige Aufnahme von SYN hatte keinen Einfluss auf die Proliferationsrate der Immunzellen. Hingegen führte die langfristige Fütterung mit SYN sowohl bei AOM-behandelten als auch bei gesunden Tieren zu einer geringeren Proliferation der T-Zellen aus den PP. Statistisch signifikant war dieser Einfluss jedoch nur bei AOM-behandelten Tieren (Studie 2 A). Der Vergleich der beiden entsprechenden Kontrollgruppen zeigt, dass die Behandlung mit AOM zu einer (nicht signifikant) höheren Proliferationsrate aller untersuchten Immunzellen führte. Die Aufnahme von SYN führte bei AOM-behandelten Tieren zu einer stark verminderten Proliferationsrate der Immunzellen der PP, so dass dieser Effekt wieder aufgehoben wurde und die Proliferationsrate für AOM-behandelte und AOM-unbehandelte Tiere der SYN-Gruppe gleich war.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Fütterung mit PRO oder PRÄ die Proliferation der Immunzellen nicht beeinflusste. Hingegen führte die Aufnahme von SYN zu einer geringeren Proliferationsrate der T-Zellen aus den PP. Dies bedeutet, dass diese T-Zellen *ex vivo* eine geringere Bereitschaft zeigten auf ein Aktivierungssignal zu antworten. Möglicherweise hat SYN dadurch eine anti-inflammatorische Wirkung im darmassoziierten Immunsystem.

### **5.1.6 Zytokine**

IL-10 wird von T-Zellen (insbesondere T<sub>H</sub>2-Zellen), B-Zellen und Makrophagen sezerniert (Moore *et al.*, 2001). Ferner sezernieren dendritische Zellen der Peyerschen Plaques ebenfalls

IL-10 (Iwasaki & Kelsall, 1999). IL-10 hat überwiegend immunsuppressive Eigenschaften und begrenzt Entzündungsreaktionen. IL-10 reguliert das Wachstum und/oder die Differenzierung vieler Immunzellen wie beispielsweise B-Zellen, NK-Zellen, T<sub>H</sub>-Zellen und Granulozyten. Auf CD8<sup>+</sup>-T-Zellen hat IL-10 einen stimulierenden Einfluss (Moore *et al.*, 2001).

IFN- $\gamma$  wird von T-Zellen (insbesondere T<sub>H</sub>1-Zellen), NK-Zellen und Makrophagen gebildet (Le Page *et al.*, 2000). Bei der nichtadaptiven Immunantwort wird IFN- $\gamma$  von NK-Zellen sezerniert. Es beeinflusst die Adhäsionseigenschaften von Endothelzellen und regt Phagozyten zur Bildung bakterizider Moleküle an. Während der adaptiven Immunantwort beeinflusst IFN- $\gamma$  die Antigenpräsentation, Proliferation und Differenzierung der Lymphozyten. IFN- $\gamma$  lenkt die Immunreaktion in Richtung einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort (Billiau *et al.*, 1998).

Da Zytokine in sehr geringen Konzentrationen (im Bereich von ng/l) wirksam sind, können sie unter physiologischen Bedingungen *in vivo* zumeist nicht detektiert werden. Die Inkubation isolierter Immunzellen mit einem Mitogen und die Bestimmung der sezernierten Zytokinmenge im Zellkulturüberstand gibt Auskunft über die Bereitschaft dieser Immunzellen zur Zytokinsekretion *ex vivo*. In der vorliegenden Arbeit wurden spezifisch T-Zellen durch das Mitogen Concanavalin A zur Zytokinsekretion angeregt.

#### 5.1.6.1 Einfluss von PRO auf die Zytokinsekretion

Die Fütterung mit PRO beeinflusste in keiner Tierstudie der vorliegenden Arbeit die Sekretion von IFN- $\gamma$  oder IL-10 durch die Immunzellen der untersuchten Organe. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen. In der Tierstudie von Aattouri *et al.* (2002) führte die Aufnahme von 350 g Joghurt (mit *L. bulgaricus* 100158 und *S. thermophilus* 001158,  $2 \times 10^7$  Bakterien/ml Joghurt, 4 Wochen lang) bei Ratten zu einer verstärkten IFN- $\gamma$ -Sekretion der Immunzellen aus der Milz und den PP. In der Humanstudie von Arunachalam *et al.* (2000) nahmen ältere Probanden (Median 69 Jahre) Milch mit *B. lactis* HN019 ( $3 \times 10^{11}$  cfu/Tag, 6 Wochen lang) zu sich. Die Kontrollgruppe erhielt Milch ohne Milchsäurebakterien. Die Aufnahme von *B. lactis* HN019 führte zu einer höheren IFN- $\alpha$ -Sekretion der Immunzellen des Blutes.

In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen haben jedoch weitere Arbeitsgruppen keinen Einfluss von Milchsäurebakterien auf die Zytokinsekretion bzw. auf die relative Transkriptmenge an Zytokin-messenger-RNA festgestellt. Tejada-Simon *et al.* (1999b) verabreichten Mäusen *L. bulgaricus* 1489, *S. thermophilus* St-133, *L. casei* ATCC 39539 oder *L. acidophilus* La-2 (jeweils  $1 \times 10^9$  cfu/Tag, 14 Tage lang) in fettarmer Milch. Die Kontrolltiere erhielten fettarme Milch ohne Milchsäurebakterien. Die relative Transkriptmenge der IL-6-, TFN- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ -messenger-RNA in der Milz und den PP wurde durch die Aufnahme der unterschiedlichen Milchsäurebakterien nicht beeinflusst. In der Humanstudie von Wheeler *et al.* (1997) verzehrten Atopie-Patienten 4 Wochen lang täglich 498 g Joghurt (mit *L. bulgaricus* und *S. thermophilus*). Der Verzehr des Joghurts beeinflusste die Sekretion von IFN- $\gamma$ , IL-2 und IL-4 der Immunzellen des Blutes nicht. In der Humanstudie von Spanhaak *et al.* (1998) wurde die Sekretion von IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  und IL-2 der Immunzellen des Blutes untersucht. Die 4-wöchige Aufnahme von *L. casei* Shirota beeinflusste die Zytokinsekretion nicht.

Die Ergebnisse der unterschiedlichen Arbeitsgruppen zeigen, dass nur ein Teil der untersuchten Milchsäurebakterien die Zytokinsekretion *ex vivo* bzw. die Transkription von Zytokin-genen beeinflussten. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Milchsäurebakterien hatten keine Auswirkungen auf die Sekretion der untersuchten Zytokine.

### 5.1.6.2 Einfluss von PRÄ auf die Zytokinsekretion

Die kurzzeitige Verabreichung von PRÄ (Studie 1) führte zu einer vermehrten IL-10-Sekretion der Immunzellen aus den PP. Die langfristige Fütterung mit PRÄ führte bei AOM-behandelten Tieren (Studie 2 A) ebenfalls zu einer höheren IL-10-Sekretion der Immunzellen aus den PP. Die Fütterung mit PRÄ beeinflusste in keiner Tierstudie die IFN- $\gamma$ -Sekretion der Immunzellen. Bislang hatten nur wenige Studien den Einfluss von Präbiotika auf die Zytokinsekretion untersucht. Hierbei wurde die Sekretion bzw. Expression unterschiedlicher Zytokine untersucht. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen wurde eine Stimulation der Zytokinsekretion bzw. eine vermehrte Transkription bestimmter Zytokingene festgestellt. In der Tierstudie von Bassonga *et al.* (2001) wurden *Min* Mäuse mit 5,8 % (w/w) Oligofruktose (42 Tage lang) gefüttert. Die Kontrolltiere erhielten 2 % (w/w) Cellulose. Die Aufnahme von Oligofruktose erhöhte die Transkriptmenge der IL-15-messenger-RNA im Darmgewebe. Die Menge der messenger-RNA anderer Zytokine (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 und IFN- $\gamma$ ) wurde durch Oligofruktose nicht beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit führte die Aufnahme von PRÄ zu einer höheren IL-10-Sekretion, im scheinbaren Widerspruch hierzu wurde in der Studie von Bassonga *et al.* die Menge der IL-10-messenger-RNA durch die Aufnahme von Oligofruktose nicht beeinflusst. Es ist jedoch zu bedenken, dass ein direkter Vergleich dieser Ergebnisse nicht möglich ist. Die Bestimmung der Menge der messenger-RNA erfolgte ohne vorherige Stimulation der Zellen, hingegen wurden die Immunzellen zur Bestimmung der Zytokinsekretion durch das Mitogen ConA stimuliert.

Die Fütterung von Mäusen mit FOS (2,5 % oder 7,5 % (w/w), 6 Wochen lang) beeinflusste die Zytokinsekretion der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus den PP (Hosono *et al.*, 2003). Die Kontrolltiere wurden mit einer entsprechenden Menge Saccharose gefüttert. Die Aufnahme von FOS führte zu einer höheren Sekretion von IL-10 und im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit auch zu einer höheren IFN- $\gamma$ -Sekretion durch CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus den PP. Allerdings wurden die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen der Studie von Hosono *et al.* mit Zellwandkomponenten grampositiver Bakterien stimuliert, da die Zellen durch LPS oder ConA nicht zur Zytokinsekretion angeregt werden konnten. In der Humanstudie von Bunout *et al.* (2002) verzehrten die Probanden 8 Wochen lang eine Mischung von Oligofruktose und Inulin (6 g/Tag). In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen wurde ebenfalls keine Beeinflussung der IFN- $\gamma$ -Sekretion festgestellt. Die IL-4-Sekretion wurde überdies nicht verändert.

Die vorgestellten Ergebnisse und die Tierstudien anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass eine Aufnahme von Präbiotika die Zytokinsekretion beeinflussen kann. Aufgrund der begrenzten Zahl vorliegender Studien und der Vielzahl der Zytokine ist allerdings keine allgemeingültige Aussage darüber möglich, in welche Richtung eine Immunantwort beeinflusst wird. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten daraufhin, dass die Aufnahme von PRÄ die Immunreaktion in Richtung einer T<sub>H</sub>2-Immunantwort lenkt.

### 5.1.6.3 Einfluss von SYN auf die Zytokinsekretion

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals untersucht, ob die Aufnahme eines Synbiotikums die Zytokinsekretion der Immunzellen beeinflusst. Durch die langfristige Fütterung mit SYN sezernierten die Immunzellen aus den PP AOM-behandelter Tiere (Studie 2 A) vermehrt IL-10. Sowohl die kurzzeitige als auch die langfristige Aufnahme von SYN beeinflusste die IL-10-Sekretion der Immunzellen gesunder Tiere nicht. Die IFN- $\gamma$ -Sekretion wurde in keiner Studie durch SYN beeinflusst.

Beim Vergleich der beiden Kontrollgruppen von Studie 2 A und Studie 2 B wird deutlich, dass die Behandlung mit AOM einen Einfluss auf die Zytokinsekretion hatte. Die Immunzellen aus den MLK AOM-behandelter Tiere sezernierten vermehrt IL-10. Indessen wiesen die Immunzellen aus den PP dieser Tiere eine (nicht signifikant) geringere IL-10-Sekretion auf. Im Gegensatz dazu führte sowohl die Aufnahme von SYN als auch die Aufnahme von PRÄ zu einer deutlich vermehrten IL-10-Sekretion der Immunzellen aus den PP.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Fütterung mit PRO keinen Einfluss auf die Sekretion der untersuchten Zytokine hatte. Die Aufnahme von PRÄ oder SYN führte zu einer vermehrten IL-10-Sekretion der Immunzellen aus den PP. Die IFN- $\gamma$ -Sekretion wurde durch PRÄ oder SYN hingegen nicht beeinflusst. Dies deutet daraufhin, dass PRÄ und SYN eine Immunreaktion in Richtung einer T<sub>H</sub>2-Immunantwort lenken und eine anti-inflammatorische Wirkung im darmassoziierten Immunsystem haben.

## 5.1.7 Sekretorisches Immunglobulin A

SIgA ist das wichtigste Immunglobulin im Darm. Es wird von Plasmazellen in der Lamina propria sezerniert. SIgA verhindert, zusammen mit anderen Faktoren der nichtadaptiven Immunität, das Anhaften und Eindringen von Bakterien, Viren oder Toxinen in die Darmwand. Bereits in die Epithelzelle eingedrungene Viren können noch in der Epithelzelle von SIgA neutralisiert werden. Außerdem kann SIgA Antigene in der Lamina propria binden und über die Epithelzellen in das Darmlumen ausschleusen (Corthesy & Spertini, 1999). Die relative Menge an SIgA im Ileum- und Caecum-Inhalt wurde aus technischen Gründen ausschließlich in Tierstudie 1 gemessen.

### 5.1.7.1 Einfluss von PRO auf die Sekretion von SIgA

Die Fütterung der Tiere mit PRO beeinflusste die SIgA-Konzentration in keinem der untersuchten Darmabschnitte. Eine Tierstudie von Perdigon *et al.* (1999) zeigte, dass die kurzzeitige Gabe von Milchsäurebakterien die IgA-Bildung beeinflussen kann. In dieser Studie wurden Mäuse mit unterschiedlichen Milchsäurebakterien (jeweils  $1 \times 10^9$  cfu/Tag) gefüttert. Die Fütterung mit *L. acidophilus* CRL 924, *L. casei* CRL 431, *L. bulgaricus* CRL 423 oder *L. plantarum* CRL 936 führte bereits nach 2 Tagen zu einer größeren Anzahl der IgA<sup>+</sup>-Plasmazellen in der Lamina propria. Nach einer Fütterungszeit von 7 Tagen wurde diese Wirkung jedoch nur noch bei Verabreichung von *L. bulgaricus* CRL 423 beobachtet. Im Gegensatz hierzu wurde bei einer längerfristigen Fütterung von Milchsäurebakterien, wie auch in der vorliegenden Studie, keine Stimulation der IgA-Sekretion festgestellt. In einer Tierstudie von Pestka *et al.* (2001) wurden Mäuse 2 Wochen lang mit verschiedenen Joghurten gefüttert. Die Joghurte waren mit unterschiedlichen Starterkulturen hergestellt. Die Kontrolltiere erhielten fettarme Milch. Der Anteil der SIgA<sup>+</sup>- und SIgM<sup>+</sup>-Plasmazellen in den PP und der Milz wurde durch die Aufnahme der Joghurte nicht beeinflusst. In der Humanstudie von Wheeler *et al.* (1997) hatte die 4-wöchige Aufnahme von Joghurt keinen Einfluss auf die Konzentration von SIgA im Speichel. Auch die Konzentration von IgG, IgM, IgA und IgE im Blut wurde nicht beeinflusst.

Möglicherweise führt eine kurzzeitige Aufnahme (wenige Tage lang) von Milchsäurebakterien zu einer Stimulation der SIgA-Bildung im Darm. Die vorliegenden Ergebnisse und die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass nach einer mehrwöchigen Aufnahme der

Milchsäurebakterien die SIgA-Bildung im Darm nicht mehr angeregt wird. Dies deutet auf einen Adaptationsprozess hin.

### **5.1.7.2 Einfluss von PRÄ auf die Sekretion von SIgA**

Die Fütterung mit PRÄ führte zu einer höheren SIgA-Konzentration im Caecum. Zu den wenigen Untersuchungen, die den Einfluss der Aufnahme von FOS auf die Konzentration von IgA untersucht haben, gehört die bereits erwähnte Studie von Swanson *et al.* (2002), die mit Hunden durchgeführt wurde. Die Tiere erhielten 14 Tage lang Mannanligosaccharide, FOS (jeweils 2 g/Tag) oder eine Kombination beider Saccharide (insgesamt 4 g/Tag). Die kombinierte Verabreichung von Mannanligosacchariden und FOS führte zu einer höheren IgA-Konzentration im Ileum. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit beeinflusste die alleinige Aufnahme von FOS (oder Mannanligosacchariden) die Konzentration von IgA im Ileum und in den Fäzes nicht. Es ist jedoch zu bedenken, dass bei einer kombinierten Gabe die Tiere die doppelte Menge (4 g/Tag) Saccharide aufnahmen. Möglicherweise ist eine Aufnahme von 2 g/Tag generell nicht ausreichend, um die IgA-Sekretion zu beeinflussen.

Die Arbeitsgruppe von Hosono stellte, in Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen, einen Einfluss von FOS auf die IgA-Konzentration in den Fäzes fest (Hosono *et al.*, 2003). In dieser Studie wurden Mäuse mit FOS (2,5 % oder 7,5 % (w/w), 4 Wochen lang) gefüttert. Die Kontrolltiere erhielten eine entsprechende Menge Saccharose. Die Aufnahme von 2,5 % FOS führte nach zwei Wochen zu einer höheren IgA-Konzentration in den Fäzes. Allerdings wurde dieser Effekt nach einer Fütterungszeit von 3 und 4 Wochen nicht mehr beobachtet. Die Fütterung mit FOS (2,5 % und 7,5 %) führte in dieser Studie außerdem zu einer stärkeren *in vitro* IgA-Sekretion der Immunzellen aus den PP.

### **5.1.7.3 Einfluss von SYN auf die Sekretion von SIgA**

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss eines Synbiotikums auf die SIgA-Konzentration im Darm untersucht. Versuchstiere, die mit SYN gefüttert worden waren, hatten eine höhere SIgA-Konzentration im Ileum. Dieses Ergebnis führt zu der Vermutung, dass bei einer kombinierten Aufnahme von PRO und PRÄ möglicherweise PRÄ als Substrat für die gleichzeitig aufgenommenen Milchsäurebakterien dient und somit deren Wachstum im Ileum begünstigt. Die vermehrten Milchsäurebakterien führen im Ileum zu einer Stimulation der SIgA-Sekretion durch die Plasmazellen der Lamina propria. Im Caecum ist PRÄ bereits abgebaut, so dass hier das Wachstum der Milchsäurebakterien nicht weiter begünstigt wird und demzufolge keine Stimulation der SIgA-Sekretion erfolgt. Bei der alleinigen Aufnahme von PRÄ findet im Ileum, aufgrund der dort geringeren Bakterienmasse, vermutlich kein bzw. nur ein unvollständiger Abbau von PRÄ statt. Erst im Caecum wird PRÄ von den dort reichlich vorhandenen Bakterien als Substrat benutzt und fördert spezifisch das Wachstum der dort vorhandenen Milchsäurebakterien. Die Zunahme der Milchsäurebakterien trägt wiederum zu einer Stimulation der SIgA-Sekretion im Caecum bei.

Sezerniertes SIgA bildet im Darm eine wichtige Immunbarriere. Die Aufnahme von SYN bzw. PRÄ führte zu einer höheren SIgA-Konzentration im Ileum bzw. im Caecum. Die vermehrte SIgA-Menge könnte zu einer besseren Abwehr pathogener Bakterien oder Viren im Darm beitragen.

## 5.1.8 Wirkungen der Probiotika

Verschiedene Mechanismen sind vorstellbar wie oral aufgenommene Probiotika das Immunsystem beeinflussen können. Aufgenommene Probiotika können sich im Darm ansiedeln und dadurch zu einer teilweisen Verdrängung autochtoner Bakterienstämme führen. Da zwischen Darmflora und darmassoziiertem Immunsystem eine permanente Interaktion besteht und das darmassoziierte Immunsystem eng mit dem systemischen Immunsystem verknüpft ist, könnte dies zu Modulationen sowohl des darmassoziierten als auch des systemischen Immunsystems führen. Für LGG konnte gezeigt werden, dass sich dieser Bakterienstamm vorübergehend im Darmtrakt ansiedelt (Saxelin, 1997). Eine dauerhafte Ansiedelung erfolgt jedoch nicht.

Es gibt mehrere unterschiedliche Wege wie im Darm Antigene aufgenommen werden. Oral zugeführte, intakte Milchsäurebakterien können vermutlich über einen oder mehrere dieser Wege mit dem darmassoziierten und systemischen Immunsystem in Kontakt treten. Antigene werden einerseits über die M-Zellen des Darmareals in die PP transportiert. Innerhalb der PP können diese Antigene über dendritische Zellen aufgenommen und den dort vorhandenen T- und B-Zellen präsentiert werden. Die antigenbeladenen dendritischen Zellen können aber auch aus den PP über afferente Lymphgefäße zu den MLK gelangen und erst dort ihre Antigene präsentieren. Andererseits können Antigene direkt über das Epithel, das die Lamina propria bedeckt, eindringen. In der Lamina propria werden sie wiederum von dendritischen Zellen aufgenommen und über die Lymphgefäße zu den MLK transportiert und dort den T- und B-Zellen präsentiert (Mowat, 2003). Dendritische Zellen können überdies mit ihren Dendriten durch das Epithel hindurch in das Lumen ragen und von dort direkt Antigene aufnehmen (Uhlir & Powrie, 2003). Die in den MLK aktivierten T- und B-Zellen verlassen über efferente Lymphgefäße die MLK, gelangen über den Ductus thoracicus in den Blutstrom und erreichen so das systemische Immunsystem (Mowat, 2003). Nicht nur intakte Milchsäurebakterien sondern auch deren Zellwandbestandteile können über diese Wege mit dem Immunsystem interagieren.

*In vitro* Versuche haben gezeigt, dass Zellwandbestandteile von Milchsäurebakterien zudem direkt zu einer Aktivierung von Immunzellen wie Lymphozyten und Makrophagen führen können (Meydani & Ha, 2000). Die Aktivierung erfolgt vermutlich über Toll-ähnliche Rezeptoren. Bislang sind 10 unterschiedliche Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR1-10) bekannt. Diese Rezeptoren können durch Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien aktiviert werden, aber auch durch die Zellwandbestandteile grampositiven Bakterien (wie Peptidoglykan, Polysaccharid und Teichonsäure) sowie durch bakterielle DNA. Toll-ähnliche Rezeptoren werden von vielen Zellen exprimiert, vor allem von dendritischen Zellen und Monozyten/Makrophagen (Hershberg, 2002), so dass über diese Rezeptoren eine direkte Aktivierung der Immunzellen durch bakterielle Zellwandbestandteile stattfinden kann. Takahashi *et al.* (1993) zeigten bei Mäusen, dass sowohl die alleinige Fütterung der Zellwandbestandteile von *L. acidophilus* als auch die alleinige Gabe des Zytoplasmas *ex vivo* zu einer stärkeren Proliferation der Immunzellen aus den PP führte. Die Immunstimulation durch das bakterielle Zytoplasma beruht möglicherweise auf der darin enthaltenen bakteriellen DNA.

Auch Darmepithelzellen exprimieren Toll-ähnliche Rezeptoren (Hershberg, 2002). Darmepithelzellen sind überdies in der Lage direkt Zytokine und Chemokine zu sezernieren (Nagler-Anderson, 2001). Dies führt zu der Vermutung, dass Milchsäurebakterien bzw. deren Zellwandbestandteile bereits durch den direkten Kontakt mit den Epithelzellen zu einer Modulation des Immunsystems führen.

In den vorliegenden Studien hatte die Fütterung mit PRO, im Gegensatz zu den zahlreichen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, nahezu keinen Einfluss auf das Immunsystem. Die kurzzeitige Verabreichung hatte eine geringfügige Wirkung auf das Verhältnis von CD4<sup>+</sup>-T-

Zellen zu CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im systemischen Immunsystem. Eine Beeinflussung des darmassoziierten Immunsystems konnte in keiner Weise festgestellt werden.

Die verabreichte Dosis der Milchsäurebakterien von insgesamt  $\sim 1,47 \times 10^{10}$  cfu/Tag ist vergleichbar mit den verwendeten Mengen bei Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen. Die Dauer der Verabreichung kann ebenfalls nicht zur Erklärung der unterschiedlichen Resultate herangezogen werden. Die langfristige Verabreichung, wie in Studie 2, wurde zwar von anderen Arbeitsgruppen in der Regel nicht untersucht. Eine Fütterungsdauer von 4 Wochen, wie in Studie 1, ist jedoch durchaus vergleichbar mit dem Studiendesign anderer Arbeitsgruppen.

Ein grundsätzlicher Unterschied zu vielen Studien anderer Arbeitsgruppen ist jedoch die gleichzeitige Verabreichung zweier Milchsäurebakterienstämme (LGG und BB12) in der vorliegenden Arbeit. Bei den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen wurde zumeist nur ein Bakterienstamm verabreicht. Speziell die kombinierte Gabe von LGG und BB12 wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals untersucht. Die kombinierte Gabe zweier Bakterienstämme wurde gewählt, da mehrere Untersuchungen Hinweise darauf geben, dass die Kombination unterschiedlicher Milchsäurebakterien zu synergistischen Effekten führen kann (Campieri & Gionchetti, 1999; Ouwehand *et al.*, 2000; Juntunen *et al.*, 2001). Möglicherweise haben die verwendeten Bakterienstämme jedoch unterschiedliche oder sogar gegensätzliche Wirkungen auf das Immunsystem, so dass bei einer kombinierten Gabe keine Effekte zu beobachten sind. Es wäre auch denkbar, dass beide Stämme bei der Besiedelung des Darmes konkurrieren und deshalb keiner der beiden Stämme sich in ausreichendem Maße im Darm ansiedeln kann und somit auch nicht die Möglichkeit hat das Immunsystem zu beeinflussen.

Ein weiterer wichtiger Unterschied zu Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen ist die fettreiche, ballaststoffarme Basisdiät, die in den vorliegenden Studien verwendet wurde. Generell hat der Fettgehalt des Futters und die verabreichte Fettart einen Einfluss auf das Immunsystem (De Pablo & De Cienfuegos, 2000). Es ist nicht auszuschließen, dass aufgrund des fettreichen Futters eine Stimulation des Immunsystems durch PRO überlagert wurde. Doch sind diese Ergebnisse gerade aufgrund der fettreichen Basisdiät, wie sie bei Menschen mit westlicher Ernährungsweise vorliegt, eher auf die Situation des Menschen übertragbar.

Die AOM-behandelten Tiere (Studie 2 A) wurden von der kooperierenden Arbeitsgruppe an der Universität Florenz auf Darmtumoren (Adenome und Karzinome) untersucht. Die Fütterung mit PRO führte zu einem geringeren Anteil von Karzinomen an der Tumorgesamtzahl, die Zahl der Tumoren insgesamt wurde allerdings nicht verringert (Femia *et al.*, 2002). Dies zeigt, dass die Aufnahme von PRO das Immunsystem der Versuchstiere nicht beeinflusste und nur bedingt eine krebspräventive Wirkung hatte.

### 5.1.9 Wirkungen der Präbiotika

Zwei unterschiedliche Wirkungsweisen sind vorstellbar wie oral aufgenommene Präbiotika einen Einfluss auf das Immunsystem ausüben können. Erstens können Präbiotika zu einer Veränderung der Darmflora führen und dies kann zu einer Modulation des Immunsystems beitragen. Präbiotika sind definiert als unverdauliche Nahrungsbestandteile, die im Dünndarm weder hydrolysiert noch absorbiert werden, ihr Abbau findet erst im Dickdarm statt. Präbiotika werden im Dünndarm aufgrund der dort geringen Konzentration von Darmbakterien nicht abgebaut. Im Jejunum und Ileum des menschlichen Darmes findet man Darmbakterien nur in Konzentrationen von  $1 \times 10^4 - 1 \times 10^8$  cfu/ml Darminhalt. Hingegen ist der Dickdarm mit Bakterien in Konzentrationen von  $1 \times 10^{10} - 1 \times 10^{12}$  cfu/g Darminhalt besiedelt (Holzapfel *et al.*, 1998). Im Dickdarm werden Präbiotika durch die dort zahlreich vorhanden Darmbakterien abgebaut. *In vitro* Versuche sowie Humanstudien haben gezeigt, dass die Aufnahme von Präbiotika zur selektiven Stimulation der im Darm vorhandenen Bifidobakterien führt

(Roberfroid & Delzenne, 1998), siehe auch Kap. 2.4.1.1. Diese Bifidobakterien konkurrieren verstärkt mit anderen Bakterienspezies um Anheftungsstellen an der Mucosa. Darüber hinaus produzieren sie Acetat und Lactat, so dass es zu einer Absenkung des pH-Wertes kommt und ein Milieu entsteht, das von anderen Bakterien weniger toleriert wird. Außerdem sind Bifidobakterien in der Lage Bakteriozine zu produzieren, die ebenfalls das Wachstum anderer Bakterienspezies hemmen (Boeckner *et al.*, 2001). Aufgrund der permanenten Interaktion von Darmflora, darmassoziiertem Immunsystem und dem damit verbundenen systemischen Immunsystem, ist durch eine veränderte Darmflora eine Modulation des gesamten Immunsystems denkbar wie bereits im vorangegangenen Kapitel erläutert.

Zweitens entstehen durch die Fermentation der Präbiotika im Dickdarm vermehrt kurzkettige Fettsäuren (SCFA), die möglicherweise das darmassoziierte Immunsystem beeinflussen. Präbiotika erhöhen generell die Konzentration von Lactat und Acetat im Darminhalt. Dies deutet auf einen Abbau durch Bifidobakterien und Milchsäurebakterien hin. Allerdings wurde auch eine Zunahme von Propionat und Butyrat festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass andere Bakterienspezies der Darmflora Präbiotika ebenfalls als Substrat nutzen (Crittenden, 1999). *In vitro* Versuche haben gezeigt, dass insbesondere Butyrat immunmodulatorische Wirkungen hat. Die Inkubation mit Butyrat stimulierte bei den Darmepithelzellen Caco-2 die IL-8-Sekretion (Fusunyan *et al.*, 1998). In den beiden menschlichen Darmkrebs-Zelllinien LS174T und HT-29 erhöhte Butyrat die PGE<sub>2</sub>-Sekretion (Awad *et al.*, 1995). Es konnte ebenfalls ein Einfluss von Butyrat auf humane Monozyten des Blutes festgestellt werden. *In vitro* hemmte Butyrat die IL-12-Bildung humaner Monozyten, stimulierte jedoch die IL-10-Sekretion (Säemann *et al.*, 2001). Millard *et al.* (2002) zeigten, dass Butyrat *in vitro* die Differenzierung und die Phagozytoseaktivität menschlicher Makrophagen und dendritischer Zellen beeinflusst. Die Proliferation menschlicher peripherer Blutlymphozyten wurde durch Butyrat gehemmt (Chapman, 2001). Es ist also durchaus möglich, dass Butyrat direkt zu einer Beeinflussung des darmassoziierten Immunsystems beiträgt. Eine höhere Konzentration von Butyrat könnte aber auch über eine indirekte Wirkung zur Beeinflussung der Funktion von Immunzellen beitragen. Epithelzellen könnten vorhandenes Butyrat anstelle von Glutamat als Substrat nutzen. Dadurch würde vermehrt Glutamat für Immunzellen zur Verfügung stehen. Da Glutamat eine essentielle Energiequelle für Immunzellen ist, könnte dies zu einer Förderung der Immunzellfunktion beitragen (Jenkins *et al.*, 1999).

Die kooperierende Arbeitsgruppe untersuchte bei AOM-behandelten Tieren (Studie 2 A) den Caecum-Inhalt auf die Konzentration von SCFA. Die Fütterung der Tiere mit PRÄ führte insgesamt zu einer Zunahme der SCFA im Caecum. Der relative Anteil von Acetat, Propionat und Valeriat war geringer, hingegen war der relative Anteil von Butyrat höher (Femia *et al.*, 2002). Es ist also denkbar, dass die erhöhte Konzentration von Butyrat in den vorliegenden Tierstudien zu der Beeinflussung des darmassoziierten Immunsystems beigetragen hat.

Die kurzzeitige Aufnahme von PRÄ führte zu einer höheren Sekretion von IL-10 durch die Immunzellen aus den PP. Im Caecum-Inhalt wurde eine höhere SIgA-Konzentration festgestellt. Diese Resultate führen zu der Annahme, dass im Ileum bereits ein geringer Abbau von PRÄ stattfindet. Diese These wird durch zwei Beobachtungen gestützt: Einerseits wurden Immunzellen aus den PP beeinflusst (PP sind im Dünndarm lokalisiert). Andererseits wurde auch im Ileum eine (nicht signifikant) höhere SIgA-Konzentration festgestellt. Der im Dünndarm beginnende Abbau von PRÄ hatte vermutlich eine Veränderung der dortigen Darmflora zur Folge. Es ist denkbar, dass die Differenzierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>) angeregt wurde. Diese Zellen sind für die Ausbildung der oralen Toleranz von Bedeutung und sezernieren vor allem IL-10 und IFN- $\gamma$  (Mowat, 2003). Für die Differenzierung von T<sub>reg</sub> spricht, neben der höheren IL-10-Sekretion, die (nicht signifikant) höhere IFN- $\gamma$ -Sekretion der Immunzellen aus den PP. IL-10 ist für die Sezernierung von SIgA von Bedeutung. Dimeres IgA wird von Plasmazellen in der Lamina propria sezerniert und



über die Epithelzellen als sekretorisches IgA in das Lumen ausgeschleust. IL-10 ist ein Zytokin, das den Isotypwechsel von IgM<sup>+</sup>-B-Zellen zu IgA<sup>+</sup>-B-Zellen veranlassen kann (Corthesy & Spertini, 1999) und trägt somit zu einer vermehrten Sekretion von SIgA im Ileum bei.

Dennoch ist zu bedenken, dass der Abbau von PRÄ vorwiegend im Caecum stattfindet. Vermutlich kommt es dadurch zu einer starken Beeinflussung der Darmflora im Caecum und in Folge zu einer deutlich höheren SIgA-Konzentration in diesem Darmabschnitt. Im Caecum sind keine PP lokalisiert. Es gibt indes, wie im gesamten Darmbereich, einzelne lymphatische Follikel (ILF), die eine ähnliche Struktur und auch eine ähnliche Funktion wie die PP besitzen (Fagarasan & Honjo, 2003). Es ist zu vermuten, dass die Immunzellen der ILF durch die veränderte Darmflora im Caecum in vergleichbarer Weise wie die Immunzellen der PP beeinflusst wurden. Möglicherweise wurden die Immunzellen der ILF ebenfalls zu einer vermehrten IL-10-Sekretion angeregt. Die daraus resultierende Aktivierung der B-Zellen in der Lamina propria des Caecums könnte für das zusätzlich sezernierte SIgA verantwortlich sein. Überdies ist zu vermuten, dass die vermehrte Entstehung von Butyrat im Caecum ebenso von Bedeutung ist. Butyrat stimuliert bei Epithelzellen die Expression des Poly-Ig-Rezeptors und fördert dadurch den Transport von SIgA in das Lumen (Kvale & Brandtzaeg, 1995). Butyrat kann durch diese Wirkung ebenfalls zu einer höheren Konzentration von SIgA im Caecum beitragen.

Auch die langfristige Fütterung von PRÄ erhöhte bei AOM-behandelten Tieren die IL-10-Sekretion der Immunzellen aus den PP. Aus technischen Gründen konnte bei diesen Tieren die SIgA-Konzentration im Darminhalt nicht gemessen werden. Die erhöhte IL-10-Sekretion lässt jedoch vermuten, dass diese Tiere ebenfalls eine höhere SIgA-Konzentration im Caecum aufwiesen und dass das darmassoziierte Immunsystem ähnlich wie in Studie 1 beeinflusst wurde.

Die langfristige Fütterung mit PRÄ bei AOM-unbehandelten Tieren hatte andere Auswirkungen. Es wurde keine Beeinflussung des darmassoziierten Immunsystems festgestellt, vielmehr wurde das systemische Immunsystem moduliert. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus Studie 1 könnte diese Beobachtung folgendermaßen erklärt werden: Die Verabreichung von PRÄ hat zu einer Zunahme von Bifidobakterien und einer gleichzeitigen Abnahme anderer Bakterienspezies im Darm geführt. Aufgrund der permanenten Verfügbarkeit von PRÄ, insgesamt 33 Wochen lang, konnte sich in der Darmflora ein höherer Anteil Bifidobakterien dauerhaft etablieren. Nach dieser langen Fütterungszeit konnten keine Auswirkungen auf das darmassoziierte Immunsystem festgestellt werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass in den ersten Wochen der Verabreichung von PRÄ das darmassoziierte Immunsystem, wie Studie 1 gezeigt hat, beeinflusst wurde. Die langfristige Aufnahme von PRÄ hat möglicherweise zu einer Zunahme der Suppressorzellen im systemischen Immunsystem geführt. Suppressorzellen sind CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die unter anderem an den Mechanismen beteiligt sind, die zur oralen Toleranz führen. Suppressor-T-Zellen können die Proliferation von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen hemmen (Vukmanovic-Stejic *et al.*, 2001). Tatsächlich wurde eine Zunahme von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und eine gleichzeitige Abnahme von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in der Milz beobachtet. Suppressor-T-Zellen sezernieren hauptsächlich immunregulatorische Zytokine, wie IL-4, IL-10 und TGF-β (Vukmanovic-Stejic *et al.*, 2001). Die Immunzellen der Milz sezernierten tatsächlich vermehrt IL-10, allerdings nicht in signifikantem Ausmaß. IL-10 ist ein Zytokin, welches die Aktivität von NK-Zellen erhöhen kann (De Waal Malefyt & Moore, 1998). Die Immunzellen aus der Milz PRÄ-gefütterter Tiere hatten eine höhere NK-Aktivität. IL-10 kann die Phagozytoseaktivität von Granulozyten und Monozyten vermindern (Buchwald *et al.*, 1999). Die Fütterung mit PRÄ führte tatsächlich zu einer tendenziell geringeren mittleren Fluoreszenzaktivität der aktiven Monozyten.

Die unterschiedlichen Auswirkungen einer langfristigen Fütterung mit PRÄ auf das Immunsystem gesunder und AOM-behandelter Tiere sind vermutlich teilweise auf den direkten Einfluss von AOM auf das Immunsystem zurückzuführen. Die Behandlung mit AOM hatte sowohl einen Einfluss auf das systemische als auch auf das darmassoziierte Immunsystem. AOM-behandelte Tiere hatten einen höheren Anteil CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Milz und in den MLK. Die mittlere Fluoreszenzaktivität der Granulozyten aus der Milz war bei diesen Tieren höher. Die NK-Aktivität der Immunzellen aus Milz und PP war verringert, hingegen sezernierten die Immunzellen aus den MLK vermehrt IL-10. Dies zeigt insgesamt, dass AOM deutliche Wirkungen auf das Immunsystem hat und es ist davon auszugehen, dass AOM-behandelte Tiere auf eine Stimulation durch die Aufnahme von PRÄ in anderer Weise reagieren als gesunde Tiere.

Zu Beginn der AOM-induzierten Tumorenstehung sind inflammatorische Prozesse im Darm zu beobachten (Weisburger, 1971). Es ist vorstellbar, dass diese anfänglichen inflammatorischen Prozesse sowie weitere, im Laufe der Tumorentwicklung stattfindenden Vorgänge im Darm, ebenfalls einen Einfluss auf die Darmflora haben. Möglicherweise wurde dadurch die dauerhafte Besiedelung des Darmes mit einer höheren Anzahl Bifidobakterien verhindert.

Die kooperierende Arbeitsgruppe stellte fest, dass die Fütterung mit PRÄ zu einer geringeren Anzahl von Tumoren (Adenome und Karzinome) in Dickdarm und Rektum bei AOM-behandelten Tieren führte. Die Zahl der Tumoren im Dünndarm wurde nicht beeinflusst (Femia *et al.*, 2002). Es lässt sich nicht sicher beurteilen, inwieweit eine Beeinflussung des Immunsystems durch die Aufnahme von PRÄ zu einer krebsspräventiven Wirkung beigetragen hat. Die IL-10-Sekretion der Immunzellen aus den PP war bei diesen Tieren höher. IL-10 ist ein Zytokin, das sowohl immunsuppressive Eigenschaften als auch immunstimulierende Wirkungen entfalten kann. Es kann nicht nur die Aktivität und Zytokinsekretion von NK-Zellen hemmen sondern auch stimulieren. Die jeweilige Wirkung ist sehr stark abhängig von anderen gleichzeitig vorhandenen Zytokinen und der Aktivität anderer Immunzellen (De Waal Malefyt & Moore, 1998). Tatsächlich wurde eine (nicht signifikant) höhere NK-Aktivität der Immunzellen aus den PP beobachtet. IL-10 kann zudem die zytotoxische Aktivität, die Rekrutierung und die Proliferation von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen stimulieren (Moore *et al.*, 2001). Es ist durchaus vorstellbar, dass die Aufnahme von PRÄ, durch Stimulation der IL-10-Sekretion, zu einer verstärkten Bekämpfung von Tumorzellen und damit zu einer verminderten Zahl von Darmtumoren beigetragen hat. Andererseits ist nicht auszuschließen, dass die höhere IL-10-Sekretion der Immunzellen aus den PP auf die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen zurückzuführen ist. Regulatorische T-Zellen sind an der Entstehung einer oralen Toleranz beteiligt, nicht jedoch an der Tumorbekämpfung.

Möglicherweise sind an der krebsspräventiven Wirkung von PRÄ andere Mechanismen beteiligt. Es werden vor allem folgende Wirkungen diskutiert: Bifidobakterien haben im Vergleich zu anderen Darmbakterien eine geringere Aktivität von Enzymen wie  $\beta$ -Glucuronidase,  $\beta$ -Glucosidase, Azoreduktase und Nitroreduktase, die zur Bildung mutagener und kanzerogener Substanzen beitragen. Die Aufnahme von Präbiotika führt zu einer vermehrten Ansiedlung von Bifidobakterien im Darm und dadurch wird möglicherweise die Bildung kanzerogener Substanzen vermindert (Pool-Zobel *et al.*, 2002). Möglicherweise erhöht die Aufnahme von Präbiotika die Apoptoserate von Darmzellen und vermindert so die Zahl geschädigter Zellen (Pool-Zobel *et al.*, 2002). Die Entstehung von SCFA, insbesondere von Butyrat, kann ebenfalls eine krebsspräventive Wirkung haben. Butyrat hemmt die Proliferation von Darmzellen und induziert ihre Differenzierung. Zudem kann Butyrat die Sekretion von Muzinen erhöhen und damit zur Deaktivierung von Karzinogenen beitragen (Pool-Zobel *et al.*, 2002).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die kurzzeitige Fütterung mit PRÄ bei gesunden Tieren und die langfristige Fütterung mit PRÄ bei AOM-behandelten Tieren zu einer Beeinflussung des darmassoziierten Immunsystems, nicht jedoch des systemischen Immunsystems führte. Bei Tieren, die mit AOM behandelt worden waren, konnte überdies eine krebspräventive Wirkung durch die Aufnahme von PRÄ festgestellt werden. Bei einer langfristigen Fütterung mit PRÄ wurde bei gesunden Tieren eine Beeinflussung des systemischen Immunsystems festgestellt.

### 5.1.10 Wirkungen der Synbiotika

Bei oraler Aufnahme von Synbiotika könnte das Immunsystem über die Wirkungsweise der Probiotika und/oder über die Wirkungsmechanismen der Präbiotika beeinflusst werden. Überdies ist vorstellbar, dass bei Gabe von Synbiotika additive oder sogar synergistische Effekte auftreten, deren Auswirkungen die Wirkungen von Pro- oder Präbiotika alleine übersteigen. Probiotika und Präbiotika könnten bei gleichzeitiger Verabreichung jedoch auch antagonistische Wirkungen zeigen.

Bei einer kurzzeitigen Fütterung mit SYN wurde eine höhere SIgA-Konzentration im Ileum, nicht jedoch im Caecum, festgestellt. Dies führt zu der Vermutung, dass Präbiotika bei gleichzeitiger Gabe von Probiotika zum überwiegenden Teil bereits im Ileum abgebaut werden. Der Abbau von PRÄ findet vermutlich durch die gleichzeitig verabreichten Milchsäurebakterienstämme LGG und BB12 statt. Dies könnte dazu führen, dass sich einer dieser beiden Stämme, oder auch beide, im Ileum ansiedeln und dadurch zur Verdrängung anderer Bakterienspezies beitragen.

Die kooperierende Arbeitsgruppe stellte bei SYN-gefütterten Tieren, wie auch bei PRÄ-gefütterten Tieren, eine höhere Konzentration von SCFA im Caecum fest. Der relative Anteil von Acetat, Propionat und Valerat im Caecum war geringer, hingegen war der relative Anteil von Butyrat höher. Verglichen mit PRÄ-gefütterten Tieren hatten SYN-gefütterte Tiere einen geringeren Anteil an Butyrat im Caecum (Femia *et al.*, 2002). Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass die Fermentation von PRÄ, bei gleichzeitiger Gabe von PRO, bereits im Ileum stattfindet. Bei der Fermentation von Präbiotika entstehen vermehrt SCFA, darunter auch Butyrat. Findet der Abbau von PRÄ bereits im Ileum statt, wird das entstandene Butyrat teilweise von den Darmepithelzellen dort absorbiert und gelangt nicht weiter in das Caecum. Möglicherweise regte die veränderte Darmflora im Ileum die Differenzierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu T<sub>reg</sub> an, vergleichbar zu den Vorgängen bei einer kurzzeitigen Aufnahme von PRÄ alleine. T<sub>reg</sub> sezernieren vor allem IL-10 und IFN- $\gamma$  (Mowat, 2003). Tatsächlich sezernierten die Immunzellen aus den PP (nicht signifikant) vermehrt IL-10 und geringfügig mehr IFN- $\gamma$ . IL-10 könnte die Plasmazellen in der Lamina propria zur verstärkten SIgA-Sekretion stimuliert haben. Vermehrt entstandenes Butyrat hat möglicherweise zu einer Stimulation des Transportes von SIgA in das Lumen beigetragen. Bei den Tieren wurde ein tendenziell höherer Anteil CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut festgestellt. Möglicherweise ist dies auf einen höheren Anteil von T<sub>reg</sub> zurückzuführen. Nach der Differenzierung dieser Zellen im darmassoziierten Immunsystem und anschließender Passage über den Ductus thoracicus könnte so der Anteil von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut erhöht worden sein. IL-10, das von T<sub>reg</sub> sezerniert wird, könnte zu der tendenziell höheren Aktivität der NK-Zellen des Blutes beigetragen haben. IL-10 kann überdies die Bildung von Superoxidanion in Granulozyten vermindern, so dass deren Fähigkeit zur Abtötung aufgenommener Organismen reduziert wird (De Waal Malefyt & Moore, 1998). Tatsächlich führte die Fütterung mit SYN dazu, dass die aktiven Granulozyten beim oxidativen Burst eine tendenziell geringere Enzymaktivität aufwiesen.

Die langfristige Fütterung mit SYN führte bei AOM-behandelten Tieren zu einer höheren Sekretion von IL-10 und zu einer (nicht signifikant) höheren IFN- $\gamma$ -Sekretion der Immunzellen aus den PP. In dieser Studie konnte, aus technischen Gründen, die Konzentration von SIgA im Darminhalt nicht gemessen werden. Es ist jedoch zu vermuten, dass SIgA ebenfalls in höherem Maße sezerniert wurde. Möglicherweise wurde im darmassoziierten Immunsystem dieser Tiere ebenso die Differenzierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu T<sub>reg</sub> angeregt. Das von T<sub>reg</sub> sezernierte IL-10 könnte zur höheren Aktivität der NK-Zellen aus den PP beigetragen haben. IL-10 hemmt einerseits die Proliferation von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und stimuliert andererseits die Proliferation von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Moore *et al.*, 2001). Die Fütterung mit SYN führte zu einer geringeren Proliferation der Immunzellen aus den PP. Diese Beobachtung könnte ebenfalls durch einen höheren Anteil von CD4<sup>+</sup>-T<sub>reg</sub> in den PP erklärt werden. Bei Stimulation sezernieren T<sub>reg</sub> verstärkt IL-10, welches inhibierend auf die Proliferation dieser Zellen wirkt. Im systemischen Immunsystem wurde jedoch keine Änderung des Verhältnisses von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu CD8<sup>+</sup>-T-Zellen festgestellt. Aus technischen Gründen wurden in Studie 2 A die Immunzellen des Blutes nicht untersucht. Es ist nicht auszuschließen, dass hier eine Änderung, wie in Studie 1, zu beobachten gewesen wäre. Auch hier ist zu berücksichtigen, dass die Behandlung mit AOM selbst einen Einfluss auf das Verhältnis von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu CD8<sup>+</sup>-T-Zellen hatte. Der Anteil der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in Milz und MLK war durch die Behandlung mit AOM erhöht. Möglicherweise haben sich die Wirkungen von SYN und AOM in diesem Fall gegenseitig aufgehoben.

Die Fütterung mit SYN führte zu einer geringeren Phagozytoseaktivität der Monozyten aus der Milz. Dies könnte ebenfalls auf einem höheren Anteil von T<sub>reg</sub>, und den von diesen Zellen sezernierten Zytokinen, beruhen.

Die langfristige Fütterung mit SYN beeinflusste das Immunsystem AOM-unbehandelter Tiere nicht. Bei kurzzeitiger Verabreichung von SYN an AOM-unbehandelte Tiere wurde jedoch eine Beeinflussung der Immunzellen des Blutes und eine erhöhte SIgA-Konzentration festgestellt. Aus technischen Gründen wurden diese Parameter bei der langfristigen Verabreichung nicht untersucht, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch eine Beeinflussung dieser Parameter stattgefunden hatte.

Die langfristige Fütterung mit SYN hatte, wie auch die Verabreichung von PRÄ, unterschiedliche Auswirkungen auf das Immunsystem gesunder und AOM-behandelter Tiere. Dies lässt sich vermutlich ebenfalls auf direkte Auswirkungen von AOM auf das Immunsystem zurückführen. Möglicherweise sind auch inflammatorische Prozesse im Darm sowie weitere Vorgänge der AOM-induzierten Tumorentwicklung im Darm und die daraus entstehenden Wechselwirkungen mit der Darmflora von Bedeutung.

Die Fütterung mit SYN verringerte bei AOM-behandelten Tieren die Zahl der Tumoren (Adenome und Karzinome) im Dickdarm und im Rektum. Die Zahl der Tumoren im Dünndarm wurde nicht beeinflusst (Femia *et al.*, 2002). Es konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die Beeinflussung des Immunsystems durch die Aufnahme von SYN zur Krebsprävention beigetragen hat. Die Fütterung mit SYN führte, wie auch die Verabreichung von PRÄ, zu einer höheren IL-10-Sekretion der Immunzellen der PP. Bei SYN-gefütterten Tieren wurde zudem eine höhere Aktivität der NK-Zellen aus den PP festgestellt. Möglicherweise hat IL-10 außerdem zu einer höheren zytotoxischen Aktivität von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im darmassoziierten Immunsystem geführt. Diese Wirkung und die höhere Aktivität der NK-Zellen könnten zu einer verstärkten Bekämpfung von Tumorzellen beigetragen haben.

Es ist jedoch zu bedenken, dass die Beeinflussung des Immunsystems nur für die Immunzellen des Dünndarmes untersucht wurde. Die Zahl der Tumoren im Dünndarm wurde durch die Aufnahme von SYN jedoch nicht beeinflusst. Allerdings findet nach AOM-Behandlung die

Tumorentstehung überwiegend im Dickdarm und im Rektum und nicht im Dünndarm statt. Überdies ist vorstellbar, dass die Immunzellen des Dickdarmes in ähnlicher Weise beeinflusst wurden, wie die des Dünndarmes. Es ist dennoch nicht auszuschließen, dass an der krebspräventiven Wirkung von SYN auch andere Mechanismen beteiligt sind wie sie bereits für die Wirkung von PRÄ diskutiert wurden.

Es war nicht eindeutig zu klären, ob die Kombination von Pro- und Präbiotika zu additiven oder synergistischen Wirkungen führt. Die alleinige Verabreichung von PRO hatte, bis auf einen tendenziellen Effekt auf das Verhältnis von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut, keine Auswirkungen auf das Immunsystem. Bei einer kurzzeitigen Verabreichung an gesunde Tiere und bei langfristiger Gabe an AOM-behandelte Tiere beeinflussten PRÄ oder SYN das Immunsystem in ähnlicher Weise. Allerdings beeinflusste die Verabreichung von SYN mehr Immunparameter, so dass insgesamt gesehen SYN stärkere Auswirkungen auf das Immunsystem hatte als PRÄ. Bei einer langfristigen Verabreichung von PRÄ und SYN an gesunde Tiere sind deutliche Unterschiede festzustellen. Die Fütterung mit PRÄ führte zu einer Beeinflussung des systemischen Immunsystems. Die Gabe von SYN hatte hingegen keine messbaren Auswirkungen auf das Immunsystem.

Es ist zu vermuten, dass der Abbau von PRÄ, bei alleiniger Verabreichung, zu einem geringen Teil im Ileum stattfindet, die überwiegende Fermentierung jedoch im Caecum erfolgt. Durch die Verfügbarkeit von PRÄ wird die Vermehrung bereits vorhandener Milchsäurebakterien, im Ileum und vor allem im Caecum, angeregt. Die kombinierte Verabreichung von PRO und PRÄ führt möglicherweise bereits im Ileum zu einem fast vollständigen Abbau von PRÄ und zu einer Ansiedelung der gleichzeitig verabreichten Probiotika LGG und BB12 in diesem Darmabschnitt. Die vermutlich unterschiedlichen Wirkungsweisen von PRO, PRÄ und SYN geben keinen Hinweis auf das Vorliegen von additiven oder synergistischen Effekten.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die kurzzeitige Verabreichung von SYN bei gesunden Tieren das darmassoziierte und das systemische Immunsystem beeinflusste. Die langfristige Gabe von SYN hatte keine messbaren Auswirkungen auf das Immunsystem gesunder Tiere. Dagegen wurde durch die langfristige Verabreichung von SYN bei AOM-behandelten Tieren vor allem das darmassoziierte Immunsystem beeinflusst und die Verabreichung von SYN hatte hierbei eine krebspräventive Wirkung.

## **5.2 Humanstudie**

Die vorangegangenen Tierstudien haben gezeigt, dass die Aufnahme von SYN sowohl das Immunsystem der Tiere beeinflussen kann als auch eine krebspräventive Wirkung hat. Die nachfolgende Humanstudie sollte klären, ob bei Krebspatienten oder Personen mit einem hohen Risiko für eine Darmkrebserkrankung (Patienten mit Polypen) ebenfalls entsprechende immunologische Wirkungen durch die Aufnahme von SYN beobachtet werden können.

### **5.2.1 Bedeutung der gemessenen Immunparameter**

In der vorliegenden Humanstudie wurden Parameter gemessen, die über den Status der unspezifischen Immunabwehr eines Menschen Auskunft geben können. Hierzu zählen die Messung der Phagozytoseaktivität und des oxidativen Burst. Insbesondere wurden jedoch Immunparameter gemessen, die bei der Abwehr von Tumorzellen von Bedeutung sind. Die Aktivität der NK-Zellen ist hier von besonderer Wichtigkeit, da diese Zellen in der Lage sind,

ohne vorherige Aktivierung, Tumorzellen abzutöten. Ferner wurde die Kapazität der peripheren mononukleären Blutzellen zur Sekretion bestimmter Zytokine (IL-2, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ ) untersucht. IL-2 ist im Zusammenhang mit der Bekämpfung von Tumorzellen von Bedeutung, da es die Proliferation, die IFN- $\gamma$ -Sekretion und das zytotoxische Potenzial von NK-Zellen erhöht. Außerdem kann IL-2 die Bildung von Lymphokin-aktivierten Killerzellen induzieren, die ebenfalls eine hohe zytotoxische Aktivität gegen Tumorzellen besitzen (Brittenden *et al.*, 1996).

IL-10 hat sehr vielfältige Funktionen, ist jedoch überwiegend als immunsuppressiv anzusehen. IL-10 kann allerdings auch die zytotoxische Aktivität und die Proliferation von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die ebenfalls zur Abwehr von Tumorzellen befähigt sind, erhöhen (Moore *et al.*, 2001). Die Wirkung von IL-10 auf NK-Zellen kann sowohl stimulierend als auch hemmend sein. Dies ist abhängig von der IL-10-Konzentration, der NK-Subpopulation sowie der vorherigen Stimulation der NK-Zellen durch andere Zytokine (De Waal Malefyt & Moore, 1998).

IL-12 erhöht die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen. Es veranlasst NK- und T-Zellen zur Bildung von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und anderen Zytokinen, die zytotoxisch oder zytostatisch auf Tumorzellen wirken (Colombo & Trinchieri, 2002).

TNF- $\alpha$  ist ein Zytokin, das teilweise gegensätzliche Einflüsse auf die Tumorentstehung hat. Einerseits hat TNF- $\alpha$  zytotoxische oder zytostatische Wirkung auf Tumorzellen. Andererseits kann das von Tumorzellen gebildete TNF- $\alpha$  zum Tumorwachstum und zur Tumorverbreitung beitragen, indem es die Gefäß- und Stromabildung fördert (Wilson & Balkwill, 2002). TNF- $\alpha$  aktiviert CTL, verstärkt die Funktion von NK-Zellen und vermittelt die IL-2-induzierte Tumortoxizität (Zhang & Tracey, 1998).

IFN- $\gamma$  kann die Expression antigenpräsentierender Komponenten in Tumorzellen erhöhen und damit deren Erkennung durch CTL fördern. Überdies induziert IFN- $\gamma$  die Bildung von Chemokinen, die zur Hemmung der Tumorangiogenese beitragen. IFN- $\gamma$  ist vermutlich an der Rekrutierung von T-Zellen in Tumorgewebe beteiligt und hemmt die Bildung immunsuppressiver Faktoren wie beispielsweise TGF- $\beta$  und PGE<sub>2</sub>. Ohne die Fähigkeit auf IFN- $\gamma$  zu reagieren entwickeln Tiere, die mit einem Karzinogen behandelt wurden, deutlich mehr Tumoren als IFN- $\gamma$ -sensible Tiere (Beatty & Paterson, 2001).

Da beim Menschen die Zellen des darmassoziierten Immunsystems nicht problemlos direkt untersucht werden können, wurden in der vorliegenden Humanstudie die Konzentration zweier Zytokine (TGF- $\beta$ 1, PGE<sub>2</sub>) im Fäzeswasser untersucht. TGF- $\beta$  wird im Darm vor allem von ausdifferenzierten Epithelzellen der Darmzotten synthetisiert (Markowitz & Roberts, 1996). Die Wirkung von TGF- $\beta$  ist in der Regel immunsuppressiv. Die Bildung von CTL, NK-Zellen und Lymphokin-aktivierten Killerzellen wird durch TGF- $\beta$  gehemmt (Derynck & Choy, 1998). TGF- $\beta$  kann sowohl mitogene als auch antiproliferative Wirkungen ausüben, dies ist vom beeinflussten Zelltyp abhängig. Tumorzellen, insbesondere Darmtumorzellen, zeigen häufig eine erhöhte Expression von TGF- $\beta$ . Auf unveränderte Epithelzellen hat TGF- $\beta$  antiproliferative Wirkung, hingegen wird die Proliferation der meisten Darmtumorzellen durch TGF- $\beta$  stimuliert (Gold, 1999).

PGE<sub>2</sub> wird im Darm vermutlich überwiegend von T-Zellen der Lamina propria gebildet, aber auch Darmepithelzellen synthetisieren PGE<sub>2</sub> (McCarn *et al.*, 2003). PGE<sub>2</sub> hat zahlreiche immunmodulatorische Wirkungen und beeinflusst vermutlich das Wachstum von Darmtumoren und anderen Krebsarten. In humanem Darmtumorgewebe wurden erhöhte PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen (Bennett & Tacca, 1975; Narisawa *et al.*, 1990; Rigas *et al.*, 1993) sowie eine erhöhte Expression von COX-2 (Sano *et al.*, 1995; Eberhart *et al.*, 1994) festgestellt.

## 5.2.2 Vergleichbarkeit mit Humanstudien anderer Arbeitsgruppen

Die Ergebnisse der vorliegenden Humanstudie zeigen, dass eine Aufnahme von SYN (12 Wochen lang) bei Krebspatienten einen sehr geringen Einfluss auf das Immunsystem hatte. Das Immunsystem der Patienten mit Polypen wurde in keiner Weise durch den Verzehr von SYN beeinflusst. Zahlreiche Tierstudien hatten bisher gezeigt, dass die Fütterung mit Probiotika alleine zu einer Modulation des Immunsystems führen kann. Es gibt jedoch nur sehr wenige placebokontrollierte Humanstudien, die mögliche Auswirkungen von Probiotika auf das Immunsystem untersucht haben. In der placebokontrollierten Studie von Arunachalam *et al.* (2000) führte die Aufnahme von *B. lactis* HN019 ( $3 \times 10^{11}$  cfu/Tag, 6 Wochen lang) zu einer höheren Phagozytoseaktivität der Granulozyten des Blutes und zu einer höheren IFN- $\alpha$ -Sekretion der PMBZ. Im Gegensatz hierzu hatte der Verzehr von *L. casei* Shirota ( $3 \times 10^{12}$  cfu/Tag, 4 Wochen lang) keinen Einfluss auf die untersuchten Immunparameter (Aktivität der NK-Zellen, Phagozytoseaktivität, Lymphozytensubpopulationen, Sekretion von IL-1 $\beta$ , IL-2 und IFN- $\gamma$  der PMBZ) (Spanhaak *et al.*, 1998).

Die Fütterung mit Präbiotika alleine beeinflusste in Tierstudien das Immunsystem. In einer placebokontrollierten Humanstudie konnte diese Wirkung nicht bestätigt werden. Ältere Probanden ( $\geq 70$  Jahre) verzehrten 6 g pro Tag einer Mischung aus 70 % Oligofruktose (Raftilose) und 30 % Inulin (Raftiline). Zusätzlich erhielten alle Probanden ein Nahrungsergänzungsmittel, das 50 % des täglichen Vitaminbedarfs deckte. Nach 8 Wochen wurde kein Einfluss des Präbiotikums auf die Konzentration von IgA, IgG und IgM im Blut sowie SIgA im Speichel festgestellt. Die Proliferation der Lymphozyten und die Zytokinsekretion der Monozyten des Blutes blieb ebenfalls unbeeinflusst (Bunout *et al.*, 2002).

Bislang gab es keine Untersuchung darüber, ob durch die Aufnahme eines Synbiotikums das Immunsystem des Menschen beeinflusst werden kann. Die Tierstudien der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass die kombinierte Aufnahme von Pro- und Präbiotika zu anderen Wirkungen führt als die alleinige Verabreichung der Probiotika oder des Präbiotikums. Dies macht deutlich, dass kein direkter Vergleich der vorliegenden Humanstudie mit den Humanstudien anderer Arbeitsgruppen möglich ist, da diese die alleinige Aufnahme von Pro- oder Präbiotika untersucht haben. Darüber hinaus enthielt das Synbiotikum der vorliegenden Humanstudie eine Kombination zweier Milchsäurebakterienstämme, dies stellt einen weiteren grundsätzlichen Unterschied zu den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen dar.

## 5.2.3 Einfluss von SYN auf das Immunsystem

In der vorliegenden Arbeit führte die Aufnahme von SYN bei Krebspatienten nach 6 Wochen (T 2) zu einer geringeren IFN- $\gamma$ -Sekretion der PMBZ und nach 12 Wochen (T 3) zu einer höheren IFN- $\gamma$ -Sekretion, im Vergleich zu Interventionsbeginn (T 1) bzw. zu T 2. Lediglich von T 2 nach T 3 ergab sich ein statistisch signifikanter Anstieg der IFN- $\gamma$ -Sekretion. In der entsprechenden Kontrollgruppe wurde keine Änderung der IFN- $\gamma$ -Sekretion beobachtet.

IFN- $\gamma$  wird hauptsächlich von T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen gebildet (Le Page *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden die PMBZ mit dem Mitogen ConA zur IFN- $\gamma$ -Sekretion angeregt. Da ConA spezifisch T-Zellen stimuliert, basiert die veränderte IFN- $\gamma$ -Sekretion möglicherweise auf der Differenzierung einer bestimmten T-Zell-Subpopulation. Innerhalb der Lymphozytenpopulation der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sind T<sub>H</sub>1-Zellen durch IFN- $\gamma$ -Sekretion charakterisiert. Verschiedene, an der Antigenerkennung beteiligte Faktoren fördern entweder die Entstehung von T<sub>H</sub>1- oder von T<sub>H</sub>2-Zellen. Insbesondere IL-12 stimuliert die Entstehung von T<sub>H</sub>1-Zellen (Romagnani, 1999). Bei Nagetieren ist die T-Zell-Antwort auf Futter-Antigene oder auf die normale Darmflora von T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>3-Zellen sowie von T<sub>reg</sub>

geprägt. Allerdings wurden auch  $T_H1$ -polarisierte Immunantworten auf orale Antigene beobachtet. Im Unterschied zu Nagetieren scheint beim Menschen jedoch eine von  $T_H1$ -Zellen geprägte Immunantwort auf orale Antigene sehr viel häufiger zu sein (MacDonald & Monteleone, 2001). Dies führt zu der Vermutung, dass der Verzehr von SYN möglicherweise zu einer Veränderung der Darmflora geführt hat und hierdurch im darmassoziierten Immunsystem die Differenzierung von  $CD4^+$ -T-Zellen zu  $T_H1$ -Zellen angeregt wurde. Die differenzierten Zellen könnten über den Ductus thoracicus in den Blutstrom gelangt sein und so zu der höheren  $IFN-\gamma$ -Sekretion geführt haben.  $T_H1$ -Zellen sezernieren außer  $IFN-\gamma$  auch IL-2 und TNF- $\beta$ . Tatsächlich sezernierten die PMBZ der Krebspatienten zum Zeitpunkt T 3 ebenfalls eine (nicht signifikant) höhere Menge IL-2.

$IFN-\gamma$  ist jedoch auch ein Zytokin, das von CTL sezerniert wird (Delves & Roitt, 2000). Die Differenzierung von  $CD8^+$ -T-Zellen zu CTL wird durch antigenpräsentierende Zellen, die virale Proteine, Proteine intrazellulärer Bakterien und Tumorantigene tragen, angeregt (McMichael, 1992). Es ist nicht auszuschließen, dass die möglicherweise veränderte Darmflora zur Differenzierung von CTL geführt hat und eine Zunahme dieser Zellpopulation für die höhere  $IFN-\gamma$ -Sekretion verantwortlich war.

Um zu klären, ob tatsächlich die Zunahme einer bestimmten Zellpopulation zu der höheren  $IFN-\gamma$ -Sekretion geführt hat, müssten in weiteren Untersuchungen die Anteile der  $CD4^+$ -T-Zellen und  $CD8^+$ -T-Zellen bzw. durch weitere Oberflächenmarker entsprechende Subpopulationen innerhalb der Lymphozytenpopulation bestimmt werden.

Es ist jedoch auch vorstellbar, dass Vorgänge außerhalb des darmassoziierten Immunsystems und unabhängig von der SYN-Aufnahme zu der vermehrten  $IFN-\gamma$ -Sekretion geführt haben. Möglicherweise wurde durch Viren oder durch andere Bakterien als LGG und BB12 die Differenzierung von  $CD8^+$ -T-Zellen zu CTL angeregt.

Insgesamt betrachtet ist die beobachtete Wirkung von SYN als geringfügig einzuordnen. Zumal die höhere  $IFN-\gamma$ -Sekretion zum Zeitpunkt T 3 nur im Vergleich mit T 2, nicht jedoch im Vergleich mit T 1, signifikant war. Weitere Studien müssten klären, ob die beobachtete Wirkung bei Krebspatienten tatsächlich auf dem Verzehr von SYN beruht. Bei Patienten mit Polypen wurde überdies kein Einfluss von SYN auf das Immunsystem festgestellt. Es ist jedoch auch wichtig anzumerken, dass in der vorliegenden Humanstudie keine negativen Wirkungen durch die Aufnahme von SYN auf das Immunsystem der untersuchten Patienten beobachtet wurden.

#### 5.2.4 Dosis und Aufnahmedauer von SYN

Im Gegensatz zu mehreren Humanstudien, die bei alleiniger Aufnahme von Probiotika einen Einfluss auf das Immunsystem festgestellt haben, hatte die Aufnahme von SYN in der vorliegenden Humanstudie nahezu keinen Einfluss auf das Immunsystem. Die verzehrte Dosis von LGG und BB12 betrug jeweils  $1 \times 10^{10}$  cfu/Tag und ist damit vergleichbar zu den verwendeten Mengen anderer Arbeitsgruppen. Die Aufnahme des Präbiotikums in der vorliegenden Humanstudie betrug 10 g pro Tag. Roberfroid *et al.* (1998) stellten fest, dass beim Menschen zumindest für die bifidogene Wirkung von FOS eine tägliche Aufnahme von ungefähr 4 g ausreichend ist. In der Humanstudie von Bunout *et al.* (2002) führte der Verzehr von 6 g FOS pro Tag zu keiner Beeinflussung des Immunsystems. Insofern kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Verzehr einer größeren Menge als die in dieser Studie eingesetzten 10 g FOS pro Tag möglicherweise doch zu Auswirkungen auf das Immunsystem führt.

Anderer Arbeitsgruppen untersuchten beim Menschen die Auswirkungen einer Aufnahme von Probiotika zumeist nach einer Interventionszeit von 3 Wochen. Diese Untersuchungen



sind folglich nicht vergleichbar mit der vorliegenden Humanstudie, da hier die Probanden nach einer Interventionszeit von 6 und 12 Wochen untersucht wurden. Allerdings wurde in der Humanstudie von Arunachalam *et al.* (2000) eine Beeinflussung des Immunsystems durch die Aufnahme von *B. lactis* HN019 nach 6 Wochen festgestellt, dies ist vergleichbar zu dem Zeitpunkt T 2 der vorliegenden Humanstudie.

### **5.2.5 Unterschiede zwischen Human- und Tierstudien**

Die Tierstudien der vorliegenden Arbeit hatten gezeigt, dass die Verabreichung von SYN das Immunsystem beeinflussen kann. Diese Untersuchungen führten zu der Vermutung, dass das menschliche Immunsystem durch die orale Aufnahme von SYN ebenfalls beeinflusst werden könnte. Diese Vermutung konnte in der vorliegenden Humanstudie nicht bestätigt werden. Es ist allerdings nicht völlig auszuschließen, dass der Verzehr von SYN das Immunsystem der Patienten beeinflusst hat, dieser Einfluss jedoch mit den untersuchten Parametern nicht messbar war. Es ist generell schwieriger in Humanstudien eine Beeinflussung des Immunsystems festzustellen als in Tierstudien. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die gemessenen Immunparameter beim Menschen deutlich größere Schwankungsbreiten haben als dies bei Versuchstieren der Fall ist. Eine Ursache hierfür ist die größere genetische Vielfalt der untersuchten Patienten, im Vergleich zu den Versuchstieren, die in der Regel alle einem bestimmten Inzuchtstamm angehören. Darüber hinaus ist bei älteren Menschen grundsätzlich eine Abschwächung der Immunantwort zu beobachten, und diese ist mit einer Zunahme der Variabilität zwischen den Individuen verbunden (Makinodan, 1995).

Weiterhin können im Tierversuch Faktoren wie Stress, körperliche Aktivität, Nikotinkonsum und Keimbelastung, die unabhängig von der Behandlung das Immunsystem beeinflussen, entweder ausgeschlossen werden oder sie sind für alle Versuchstiere gleich. Außerdem erhielten die Tiere in den Studien der vorliegenden Arbeit, über die gesamte Versuchszeit, eine kontrollierte Basisdiät. Maisöl und Cellulose dienten zur Deckung des Fett- und Ballaststoffbedarfs. Im Gegensatz hierzu nahmen die Patienten während der Intervention eine nicht kontrollierte Kost zu sich. Diese Nahrung beinhaltete sicher unterschiedliche Fette, mit einem unterschiedlichen Fettsäuremuster und auch unterschiedliche Ballaststoffe. Fettsäuren und Ballaststoffe sind Nahrungskomponenten, die ebenfalls einen Einfluss auf das Immunsystem ausüben können (Calder *et al.*, 2002; Schley & Field, 2002). Alle diese Faktoren tragen dazu bei, dass beim Menschen die Immunparameter sehr viel größeren Schwankungen unterworfen sind als die Immunparameter bei Versuchstieren. Dies führt dazu, dass Einflüsse auf das Immunsystem durch die Aufnahme von SYN oder anderen Substanzen beim Menschen möglicherweise erst bei einer stärkeren Beeinflussung festgestellt werden. Aufgrund der größeren Schwankungsbreite der Immunparameter beim Menschen ist es hier besonders wichtig eine Kontrollgruppe in die Untersuchung einzubeziehen, um Effekte, die unabhängig von der Behandlung auftreten, von tatsächlichen Behandlungseffekten zu unterscheiden. In der vorliegenden Studie wurde dies berücksichtigt, jedoch wurden in einer Reihe von Humanstudien anderer Arbeitsgruppen, die insbesondere die Wirkung von Probiotika untersucht haben, keine adäquaten Kontrollgruppen miteinbezogen.

### **5.2.6 Unterschiede zwischen Patienten und Versuchstieren**

Es ist jedoch eher zu vermuten, dass prinzipielle Unterschiede zwischen Versuchstieren und untersuchten Patienten dazu geführt haben, dass die Aufnahme von SYN das Immunsystem der Tiere beeinflusste, nicht jedoch das Immunsystem der Patienten. Die Versuchstiere wurden in einer relativ keimarmen Umgebung gehalten und erhielten keimarmes Futter, um

möglichen Erkrankungen der Tiere vorzubeugen. Die Patienten der Humanstudie hingegen waren im ständigen Kontakt mit einer sehr viel höheren Anzahl von Mikroorganismen. Die keimarmen Bedingungen der Tierstudien könnten Ursache dafür sein, dass das Immunsystem der Tiere auf die Verabreichung von Milchsäurebakterien stärker reagierte als das Immunsystem der Menschen in normaler Umgebung.

Unter Berücksichtigung der Größenverhältnisse ist festzustellen, dass die Aufnahme von SYN pro kg Körpergewicht in der Humanstudie erheblich geringer war als in der Tierstudie. Die Tiere hatten ein durchschnittliches Körpergewicht von  $\sim 350$  g und nahmen insgesamt  $\sim 1,47 \times 10^{10}$  cfu Milchsäurebakterien und  $\sim 1,5$  g Synergy1<sup>®</sup> pro Tag auf. Die Patienten hatten ein durchschnittliches Körpergewicht von  $\sim 80$  kg und nahmen  $2 \times 10^{10}$  cfu Milchsäurebakterien und 10 g Raftilose<sup>®</sup> Synergy1 pro Tag zu sich. Es kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die im Verhältnis geringere Aufnahmemenge zu den unterschiedlichen Ergebnissen der Human- und Tierstudien beigetragen hat. Hierbei ist zu bedenken, dass der Verzehr von FOS zu unangenehmen Begleiterscheinungen wie Blähungen, intestinalen Krämpfen und Durchfällen führen kann. Beim Menschen ist die Menge, die ohne Beschwerden verzehrt werden kann, sehr individuell verschieden. Unempfindliche Personen können ungefähr 30 g FOS zu sich nehmen, ohne dass unangenehme Begleiterscheinungen auftreten (Coussement, 1999). Dies macht deutlich, dass eine dem Tierversuch vergleichbare Dosis vom Menschen nicht ohne Beschwerden toleriert wird.

Darüber hinaus ist es sehr wichtig zu bedenken, dass grundsätzliche Abweichungen zwischen dem menschlichen Immunsystem und dem Immunsystem von Nagetieren existieren. Beispielsweise sind beim Menschen und bei Nagetieren teilweise unterschiedliche Zytokine an der Differenzierung von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen beteiligt. Die von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen sezernierten Zytokine sind ebenfalls zum Teil verschieden. Darüber hinaus sind beim Menschen die Zytokinprofile von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen nicht in dem Ausmaß voneinander abgegrenzt wie bei der Maus (Romagnani, 1999; Romagnani, 2000). Weiterhin gibt es wichtige Unterschiede bei der T-Zell-Antwort, die an Mukosaoberflächen ausgelöst wird. Beim Menschen ist die T-Zell-Antwort auf orale Antigene von T<sub>H</sub>1-Zellen geprägt. Bei Nagetieren wird durch Futter-Antigene oder die normale Darmflora die Differenzierung von T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>3-Zellen sowie von T<sub>reg</sub> angeregt. (Nagata *et al.*, 2000; MacDonald & Monteleone, 2001). Alle diese generellen Unterschiede zwischen dem Immunsystem des Menschen und dem Immunsystem von Nagetieren könnten dafür verantwortlich sein, dass das Immunsystem der Versuchsratten durch die Aufnahme von SYN beeinflusst wurde, nicht aber das Immunsystem der untersuchten Patienten.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aattouri N, Bouras M, Tome D, Marcos A, Lemonnier D (2002): Oral ingestion of lactic-acid bacteria by rats increases lymphocyte proliferation and interferon-gamma production. *Br J Nutr* 87:367-373.
- Abbas AK, Janeway CA (2000): Immunology: Improving on nature in the twenty-first century. *Cell* 100:129-138.
- Abdelali H, Cassand P, Soussotte V, Daubeze M, Bouley C, Narbonne JF (1995): Effect of dairy products on initiation of precursor lesions of colon cancer in rats. *Nutr Cancer* 24:121-132.
- Aderem A, Underhill DM (1999): Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev of Immunol* 17:593-623.
- Alam R (1998): A brief review of the immune system. *Primary Care* 25:727-738.
- Alevizopoulos A, Mermod N (1997): Transforming growth factor-beta: the breaking open of a black box. *Bioessays* 19:581-591.
- Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (2002): Krebs in Deutschland. 3. erweiterte, aktualisierte Ausgabe. Saarbrücken.
- Arends JW (2000): Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. *J Pathol* 190:412-416.
- Arimochi H, Kinouchi T, Kataoka K, Kuwahara T, Ohnishi Y (1997): Effect of intestinal bacteria on formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon. *Biochem Bioph Res Co* 238:753-757.
- Arunachalam K, Gill HS, Chandra RK (2000): Enhancement of natural immune function by dietary consumption of Bifidobacterium lactis (HN019). *Eur J Clin Nutr* 54:263-267.
- Awad AB, Kamei A, Horvath PJ, Fink CS (1995): Prostaglandin synthesis in human cancer cells: influence of fatty acids and butyrate. *Prostag Leukotr Ess* 53:87-93.
- Barone J, Hebert JR, Reddy MM (1989): Dietary fat and natural-killer cell activity. *Am J Clin Nutr* 50:861-867.
- Bassonga E, Forest V, Pierre F, Bornet F, Perrin P, Meflah K, Menanteau J (2001): Cytokine mRNA expression in mouse colon: IL-15 mRNA is overexpressed and is highly sensitive to a fibre-like dietary component (short-chain fructo-oligosaccharides) in an Apc gene manner. *Cytokine* 14:243-246.
- Beatty GL, Paterson Y (2001): Regulation of tumor growth by IFN-gamma in cancer immunotherapy. *Immunol Res* 24:201-210.
- Bennett A, Tacca MD (1975): Prostaglandins in human colonic carcinoma. *Gut* 16:409.
- Benno Y, Mitsuoka T (1992): Impact of Bifidobacterium longum on human fecal microflora. *Microbiol Immunol* 36:683-694.
- BgVV (1999): Abschlussbericht der Arbeitsgruppe "Probiotische Mikroorganismenkulturen in Lebensmitteln" am BgVV.

- Billiau A, Heremans H, Vermeire K, Matthys P (1998): Immunomodulatory properties of interferon-gamma. An update. *Ann N Y Acad Sci* 29:22-32.
- Bodana AR, Rao DR (1990): Antimutagenic activity of milk fermented by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *J Dairy Sci* 73:3379-3384.
- Boeckner LS, Schnepf MI, Tunland BC (2001): Inulin: a review of nutritional and health implications. *Adv Food Nutr Res* 43:1-63.
- Bouhnik Y, Vahedi K, Achour L, Attar A, Salfati J, Pochart P, Marteau P, Flourie B, Bornet F, Rambaud JC (1999): Short-chain fructo-oligosaccharide administration dose-dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. *J Nutr* 129:113-116.
- Bouhnik Y, Flourie B, Andrieux C, Bisetti N, Briet F, Rambaud JC (1996a): Effects of *Bifidobacterium* sp fermented milk ingested with or without inulin on colonic bifidobacteria and enzymatic activities in healthy humans. *Eur J Clin Nutr* 50:269-273.
- Bouhnik Y, Flourie B, Riottot M, Bisetti N, Gailing MF, Guibert A, Bornet F, Rambaud JC (1996b): Effects of fructo-oligosaccharides ingestion on fecal bifidobacteria and selected metabolic indexes of colon carcinogenesis in healthy humans. *Nutr Cancer* 26:21-29.
- Boutron MC, Faivre J, Marteau P, Couillaud C, Senesse P, Quipourt V (1996): Calcium, phosphorus, vitamin D, dairy products and colorectal carcinogenesis: a French case-control study. *Br J Cancer* 74:145-151.
- Brandtzaeg P (1996): The human intestinal immune system: basic cellular and humoral mechanisms. *Baillieres Clin Rheumatol* 10:1-24.
- Brandtzaeg P (1998): Development and basic mechanisms of human gut immunity. *Nutr Rev* 56:S5-S18.
- Brittenden J, Heys SD, Ross J, Eremin O (1996): Natural killer cells and cancer. *Cancer* 77:1226-1243.
- Brutkiewicz RR, Sriram V (2002): Natural killer T (NKT) cells and their role in antitumor immunity. *Crit Rev Oncol Hemat* 41:287-298.
- Buchwald UK, Geerdes-Fenge HF, Vockler J, Ziege S, Lode H (1999): Interleukin-10: effects on phagocytosis and adhesion molecule expression of granulocytes and monocytes in a comparison with prednisolone. *Eur J Med Res* 4:85-94.
- Buddington KK, Donahoo JB, Buddington RK (2002): Dietary oligofructose and inulin protect mice from enteric and systemic pathogens and tumor inducers. *J Nutr* 132:472-477.
- Buddington RK, Williams CH, Chen SC, Witherly SA (1996): Dietary supplement of neosugar alters the fecal flora and decreases activities of some reductive enzymes in human subjects. *Am J Clin Nutr* 63:709-716.
- Bunout D, Hirsch S, Pia De la Maza M, Munoz C, Haschke F, Steenhout P, Klassen P, Barrera G, Gattas V, Petermann M (2002): Effects of prebiotics on the immune response to vaccination in the elderly. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 26:372-376.

- Buts JP, Bernasconi P, Vaerman JP, Dive C (1990): Stimulation of secretory IgA and secretory component of immunoglobulins in small intestine of rats treated with *Saccharomyces boulardii*. *Dig Dis Sci* 35:251-256.
- Calder PC (1998): Dietary fatty acids and the immune system. *Nutr Rev* 56:S70-S83.
- Calder PC, Yaqoob P, Thies F, Wallace FA, Miles EA (2002): Fatty acids and lymphocyte functions. *Br J Nutr* 87:S31-S48.
- Calvert PM, Frucht H (2002): The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med* 137:603-612.
- Campbell CG, Chew BP, Luedecke LO, Shultz TD (2000): Yogurt consumption does not enhance immune function in healthy premenopausal women. *Nutr Cancer* 37:27-35.
- Campieri M, Gionchetti P (1999): Probiotics in inflammatory bowel disease: New insight to pathogenesis or a possible therapeutic alternative? 116:1246-1249.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975): An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci* 72:3666-70.
- Cerwenka A, Lanier LL (2001): Natural killer cells, viruses and cancer. *Nature* 1:41-49.
- Challa A, Rao DR, Chawan CB, Shackelford L (1997): Bifidobacterium longum and lactulose suppress azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis* 18:517-521.
- Chang L, Gusewitch GA, Chritton DB, Folz JC, Lebeck LK, Nehlsen-Cannarella SL (1993): Rapid flow cytometric assay for the assessment of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 166:45-54.
- Chapman MA (2001): The role of the colonic flora in maintaining a healthy large bowel mucosa. *Ann R Coll Surg Engl* 83:75-80.
- Chiang BL, Sheih YH, Wang LH, Liao CK, Gill HS (2000): Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses. *Eur J Clin Nutr* 54:849-855.
- Colombo MP, Trinchieri G (2002): Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:155-168.
- Corthesy B, Spertini F (1999): Secretory immunoglobulin A: from mucosal protection to vaccine development. *Biol Chem* 380:1251-1262.
- Coussement PAA (1999): Inulin and oligofructose: safe intakes and legal status. *J Nutr* 129:1412S-1417S.
- Crittenden RG (1999): Prebiotics. In: *Probiotics - a critical review*, Tannock GW (ed). Wymondham: Horizon Scientific Press, pp 141-156.
- Cummings JH, Macfarlane GT, Englyst HN (2001): Prebiotic digestion and fermentation. *Am J Clin Nutr* 73:415S-420S.
- Davidson NJ, Fort MM, Müller W, Leach MW, Rennick DM (2000): Chronic colitis in IL-10<sup>-/-</sup> mice: insufficient counter regulation of a Th1 response. *Int Rev Immunol* 19:91-121.

- De Maeyer E, De Maeyer-Guignard J (1998): Interferons. In: *The Cytokine Handbook*, Thomson AW (ed), 3rd ed. London: Academic Press Limited, pp 491-516.
- De Pablo MA, De Cienfuegos GA (2000): Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. *Immunol Cell Biol* 78:31-39.
- De Waal Malefyt R, Moore KW (1998): Interleukin-10. In: *The Cytokine Handbook*, Thomson AW (ed), 3rd ed. London: Academic Press Limited, pp 333-364.
- Delves PJ, Roitt IM (2000): The immune system (Part I + II). *N Engl J Med* 343:37-49.
- Den Hond E, Geypens B, Ghoois Y (2000): Effect of high performance chicory inulin on constipation. *Nutr Res* 20:731-736.
- Derynck R, Choy L (1998): Transforming growth factor-beta and its receptors. In: *The Cytokine Handbook*, Thomson AW (ed), 3rd ed. London: Academic Press Limited, pp 593-636.
- Deutsches Institut für Ernährungsforschung (1999): Krebsprävention durch Ernährung. Bergholz-Rehbrücke.
- Donnet-Hughes A, Rochat F, Serrant P, Aeschlimann JM, Schiffrin EJ (1999): Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose. *J Dairy Sci* 82:863-869.
- Dunne C, Murphy L, Flynn S, O'Mahony L, O'Halloran S, Feeney M, Morrissey D, Thornton G, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, Quigley EM, O'Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK (1999): Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek* 76:279-292.
- Eberhart CE, Coffey RJ, Radhik A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN (1994): Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 107:1183-1188.
- Fagarasan S, Honjo T (2003): Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nature Rev Immunol* 3:63-72.
- Fang H, Elina T, Heikki A, Seppo S (2000): Modulation of humoral immune response through probiotic intake. *FEMS Immunol Med Microbiol* 29:47-52.
- Fearon ER, Vogelstein B (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-767.
- Femia AP, Luceri C, Dolaro P, Giannini A, Biggeri A, Salvadori M, Clune Y, Collins KJ, Paglierani M, Caderni G (2002): Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 23:1953-1960.
- Fujiwara S, Akiyama M, Yamakido M, Seyama T, Kobuke K, Hakoda M, Kyoizumi S, Jones SL (1986): Cryopreservation of human lymphocytes for assessment of lymphocyte subsets and natural killer cytotoxicity. *J Immunol Methods* 90:265-273.

- Fukushima Y, Kawata Y, Hara H, Terada A, Mitsuoka T (1998): Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *Int J Food Microbiol* 42:39-44.
- Fuller R (1989): Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66:365-378.
- Fusunyan RD, Quinn JJ, Ohno Y, MacDermott RP, Sanderson IR (1998): Butyrate enhances interleukin (IL)-8 secretion by intestinal epithelial cells in response to IL-1 $\beta$  and lipopolysaccharide. *Pediatr Res* 43:84-90.
- Gaffen SL, Goldsmith MA, Greene WC (1998): Interleukin-2 and the Interleukin-2 receptor. In: *The Cytokine Handbook*, Thomson AW (ed), 3rd ed. London: Academic Press Limited, pp 73-103
- Gallaher DD, Khil J (1999): The effect of synbiotics on colon carcinogenesis in rats. *J Nutr* 129:1483S-1487S.
- Gautam SC, Beckman K, Battisto JR (1986): Natural cytotoxic T cells (NCTC) that differ from natural killer (NK) and natural cytotoxic (NC) cells are present in Peyer's patches of mice. *Cell Immunol* 101:463-475.
- Germain RN (2002): T-cell development and the CD4-CD8 lineage discussion. *Nat Rev Immunol* 2:309-322.
- Gibson GR, Beatty ER, Wang X, Cummings JH (1995): Selective stimulation of Bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* 108:975-982.
- Gibson GR, Roberfroid M (1995): Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125:1401-1412.
- Gibson GR, Wang X (1994): Enrichment of bifidobacteria from human gut contents by oligofructose using continuous culture. *FEMS Microbiol Lett* 118:121-127.
- Gill HS, Cross ML, Rutherford KJ, Gopal PK (2001a): Dietary probiotic supplementation to enhance cellular immunity in the elderly. *Br J Biomed Sci* 58:94-96.
- Gill HS, Rutherford KJ (2001a): Probiotic supplementation to enhance natural immunity in the elderly: effects of a newly characterized immunostimulatory strain *Lactobacillus rhamnosus* HN001 on leucocyte phagocytosis. *Nutr Res* 21:183-189.
- Gill HS, Rutherford KJ (2001b): Viability and dose-response studies on the effects of the immunoenhancing lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* in mice. *Br J Nutr* 86:285-289.
- Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML (2001b): Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. *J Clin Immunol* 2001:264-271.
- Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML, Gopal PK (2001c): Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN0191. *Am J Clin Nutr* 74:833-839.

- Gill HS, Rutherford KJ, Prasad J, Gopal PK (2000): Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Br J Nutr* 83:167-176.
- Giovannucci E (2002): Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 31:925-943.
- Glinghammar B, Venturi M, Rowland IR, Rafter JJ (1997): Shift from a dairy product-rich to a dairy product-free diet: influence on cytotoxicity and genotoxicity of fecal water - potential risk factors for colon cancer. *Am J Clin Nutr* 66:1277-1282.
- Gold LI (1999): The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. *Crit Rev Oncog* 10:303-360.
- Goldin BR, Gorbach SL (1984): The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Am J Clin Nutr* 39:756-761.
- Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gualtieri L, Salminen S (1992): Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 37:121-128.
- Goldin BR, Gualtieri L, Moore RP (1996): The effect of *Lactobacillus* GG on the initiation and promotion of DMH-induced intestinal tumors in the rat. *Nutr Cancer* 25:197-204.
- Guarner F, Malagelade J-R (2003): Gut flora in health and disease. *The Lancet* 360:512-519.
- Guigoz Y, Rochat F, Perruisseau-Carrier G, Rochat I, Schiffrin EJ (2002): Effects of oligosaccharide on the faecal flora and non-specific immune system in elderly people. *Nutr Res* 22:13-25.
- Hahn S, Erb P (1999): The immunomodulatory role of CD4-positive cytotoxic T-lymphocytes in health and disease. *Int Rev Immunol* 18:449-464.
- Haller D, Blum S, Bode C, Hammes WP, Schiffrin EJ (2000): Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nonpathogenic bacteria in vitro: evidence of NK cells as primary targets. *Infect Immun* 68:752-759.
- Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP (2002): Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 23:144-150.
- Hayatsu H, Hayatsu T (1993): Suppressing effect of *Lactobacillus casei* administration on the urinary mutagenicity arising from ingestion of fried ground beef in the human. *Cancer Lett* 73:173-179.
- Herich R, Revajova V, Levkut M, Bomba A, Nemcova R, Guba P, Gancarcikova S (2002): The effect of *Lactobacillus paracasei* and Raftilose P95 upon the non-specific immune response of piglets. *Food Agr Immunol* 14:171-179.
- Hershberg RM (2002): The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking V. Polarized compartmentalization of antigen processing and toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283:G833-G839.
- Hessle C, Hanson LA, Wold AE (1999): Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production. *Clin Exp Immunol* 116:276-282.



- Holzappel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JHJ (1998): Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 41:85-101.
- Hori T, Kiyoshima J, Yasui H (2003): Effect of an oral administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota on the natural killer activity of blood mononuclear cells in aged mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 67:420-422.
- Hosono A, Ozawa A, Kato R, Ohnishi Y, Nakanishi Y, Kimura T, Nakamura R (2003): Dietary fructooligosaccharides induce immunoregulation of intestinal IgA secretion by murine Peyer's patch cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 67:758-764.
- Huang S, Ullrich SE, Bar-Eli M (1999): Regulation of tumor growth and metastasis by interleukin-10: the melanoma experience. *J Interferon Cytokine Res* 19:697-703.
- Hughes R, Rowland IR (2001): Stimulation of apoptosis by two prebiotic chicory fructans in the rat colon. *Carcinogenesis* 22:43-47.
- Huston DP (1997): The biology of the immune system. *Jama-J Am Med Assoc* 278:1804-1814.
- Ilyas M, Tomlinson IPM (1996): Genetic pathways in colorectal cancer. *Histopathology* 28:389-399.
- Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K (2000): Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 356:1795-1799.
- Iwasaki A, Kelsall BL (1999): Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med* 190:229-239.
- Jahreis G, Vogelsang H, Kiessling G, Schubert R, Bunte C, Hammes WP (2002): Influence of probiotic sausage (*Lactobacillus paracasei*) on blood lipids and immunological parameters of healthy volunteers. *Food Res Int* 35:133-138.
- Janeway CA (2001): How the immune system works to protect the host from infection: A personal view. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:7461-7468.
- Jeffery NM, Sanderson P, Newsholme EA, Calder PC (1997): Effects of varying the type of saturated fatty acid in the rat diet upon serum lipid levels and spleen lymphocyte functions. *Biochim Biophys Acta* 1345:223-236.
- Jenkins DJ, Kendall CW, Vuksan V (1999): Inulin, oligofructose and intestinal function. *J Nutr* 129:1431S-1433S.
- Johnson IT (1995): Butyrate and markers of neoplastic change in the colon. *Eur J Cancer Prevent* 4:365-371.
- Juntunen M, Kirjavainen PV, Ouwehand AC, Salminen SJ, Isolauri E (2001): Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. *Clin Diag Lab Immun* 8:293-296.

- Kaffenberger W, Clasen BPE, Van Beuningen D (1992): The respiratory burst of neutrophils: a prognostic parameter in head and neck cancer? *Clin Immunol Immunopathol* 64: 57-62.
- Kaila M, Isolauri E, Soppi E, Virtanen E, Laine S, Arvilommi H (1992): Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human Lactobacillus strain. *Pediatr Res* 32:141-144.
- Kampman E, Goldbohm RA, Van den Brandt PA, Van 't Veer P (1994a): Fermented dairy products, calcium, and colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Cancer Res* 54:3186-3190.
- Kampman E, Van 't Veer P, Hiddink GJ, Van Aken-Schneijder P, Kok FJ, Hermus RJ (1994b): Fermented dairy products, dietary calcium and colon cancer: a case-control study in The Netherlands. *Int J Cancer* 59:170-176.
- Kaplan H, Hutkins RW (2000): Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol* 66:2682-2684.
- Kearney J, Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Wing A, Kampman E, Willett WC (1996): Calcium, vitamin D, and dairy foods and the occurrence of colon cancer in men. *Am J Epidemiol* 143:907-917.
- Kirjavainen PV, ElNezami HS, Salminen SJ, Ahokas JT, Wright PFA (1999): Effects of orally administered viable Lactobacillus rhamnosus GG and Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii JS on mouse lymphocyte proliferation. *Clin Diagn Lab Immunol* 6:799-802.
- Kishi A, Ohmori M, Tomita S, Niman M, Uno K, Tanigawa M, Setoguchi J, Nitta H, Ikeda T, Kishida T, Fujita S (1999): Phenotypic and functional analyses of natural killer cells: impaired NK activity partly due to the CD56+ cell dysfunction in cancer patients. *Int J Immunotherapy* 15:1-12.
- Kishi A, Uno K, Matsubara Y, Okuda C, Kishida T (1996): Effect of the oral administration of Lactobacillus brevis subsp coagulans on interferon-alpha producing capacity in humans. *J Am Coll Nutr* 15:408-412.
- Kleessen B, Sykura B, Zunft HJ, Blaut M (1997): Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity, and bowel habit in elderly constipated persons. *Am J Clin Nutr* 65:1397-13402.
- Knight JA (2000): Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin And Lab Sci* 30:145-158.
- Koo M, Rao AV (1991): Long-term effect of bifidobacteria and neosugar on precursor lesions of colonic-cancer in cf<sub>1</sub> mice. *Nutr Cancer* 16:249-257.
- Kruse HP, Kleessen B, Blaut M (1999): Effects of inulin on faecal bifidobacteria in human subjects. *Br J Nutr* 82:375-382.
- Kulkarni N, Reddy BS (1994): Inhibitory effect of Bifidobacterium longum cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial beta-glucuronidase. *Proc Soc Exp Biol Med* 207:278-283.

- Kvale D, Brandtzaeg P (1995): Constitutive and cytokine induced expression of HLA molecules, secretory component, and intercellular adhesion molecule-1 is modulated by butyrate in the colonic epithelial cell line HT-29. *Gut* 36:737-742.
- Kwiatkowska K, Sobota A (1999): Signaling pathways in phagocytosis. *Bioessays* 21: 422-431.
- Le Page C, Genin P, Baines MG, Hiscott J (2000): Interferon activation and innate immunity. *Rev Immunogenet* 2:374-386.
- Lehmann AK, Sornes S, Halstensen A (2000): Phagocytosis: measurement by flow cytometry. *J Immunol Methods* 243:229-242.
- Levy GN (1997): Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer. *FASEB J* 11:234-247.
- Lim BO, Yamada K, Nonaka M, Kuramoto Y, Hung P, Sugano M (1997): Dietary fibers modulate indices of intestinal immune function in rats. *J Nutr* 127:663-667.
- Link-Amster H, Rochat F, Saudan KY, Mignot O, Aeschlimann JM (1994): Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunol Med Microbiol* 10:55-63.
- Maassen CBM, Van Holten-Neelen C, Balk F, den Bak-Glashouwer JH, Leer RJ, Laman JD, Boersma WJA, Claassen E (2000): Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered Lactobacillus strains. *Vaccine* 18:2613-2623.
- MacDonald TT, Monteleone G (2001): IL-12 and Th1 immune responses in human Peyer's patches. *Trends Immunol* 22:244-247.
- Macpherson AJ, Hunziker L, McCoy K, Lamarre A (2001): IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes Infect* 3:1021-1035.
- Makinodan T (1995): Patterns of age-related immunologic changes. *Nutr Rev* 53:S27-S34.
- Manhard N, Spittler A, Mittlböck M, Roth E (2003): Influence of fructooligosaccharides on peyer's patch lymphocyte numbers in healthy and endotoxemic mice. *Nutrition* 19:657-660.
- Marin ML, Lee JH, Murtha J, Ustunol Z, Pestka JJ (1997): Differential cytokine production in clonal macrophage and T-cell lines cultured with bifidobacteria. *J Dairy Sci* 80: 2713-2720.
- Marin ML, Tejada-Simon MV, Lee JH, Murtha J, Ustunol Z, Pestka JJ (1998): Stimulation of cytokine production in clonal macrophage and T-cell models by Streptococcus thermophilus: comparison with Bifidobacterium sp. and Lactobacillus bulgaricus. *J Food Prot* 61:859-864.
- Markowitz SD, Roberts AB (1996): Tumor suppressor activity of the TGF-beta pathway in human cancers. *Cytokine Growth Factor Rev* 7:93-102.
- Marteau P, Pochart P, Flourie B, Pellier P, Santos L, Desjeux JF, Rambaud JC (1990): Effect of chronic ingestion of a fermented dairy product containing Lactobacillus acidophilus

- and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic flora in humans. *Am J Clin Nutr* 52:685-688.
- Mayer L (2000): Mucosal immunity and gastrointestinal antigen processing. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 30:S4-S12.
- Mazanec MB, Nedrud JG, Kaetzel CS, Lamm ME (1993): A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. *Immunol Today* 14:430-435.
- McCarn K, Yursik B, Halim S, Roche JK (2003): Peri-epithelial origin of prostanoids in the human colon. *J Cell Physiol* 194:176-185.
- McIntosh GH, Royle PJ, Playne MJ (1999): A probiotic strain of *L. acidophilus* reduces DMH-induced large intestinal tumors in male sprague-dawley rats. *Nutr Cancer* 35:153-159.
- McKellar RC, Modler HW (1989): Metabolism of fructo-oligosaccharides by *Bifidobacterium* spp. *Appl Microbiol Biot* 31:537-541.
- McMichael A (1992): Cytotoxic T lymphocytes and immune surveillance. *Cancer Surv* 13: 5-21.
- Meydani SN, Ha WK (2000): Immunologic effects of yogurt. *Am J Clin Nutr* 71:861-872.
- Miettinen M, Vuopio-Varkila J, Varkila K (1996): Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infect Immun* 64:5403-5405.
- Millard AL, Mertes PM, Ittelet D, Villard F, Jeannesson P, Bernard J (2002): Butyrate affects differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages. *Clin Exp Immunol* 130:245-255.
- Miller JS (2001): The biology of natural killer cells in cancer, infection, and pregnancy. *Exp Hematol* 29:1157-1168.
- Miller JS (2002): Biology of natural killer cells in cancer and infection. *Cancer Invest* 20: 405-419.
- Moore KW, De Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A (2001): Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683-765.
- Morotomi M, Mutai M (1986): In vitro binding of potent mutagenic pyrolysates to intestinal bacteria. *J Natl Cancer Inst* 77:195-201.
- Morton HC, Brandtzaeg P (2001): CD89: the human myeloid IgA Fc receptor. *Arch Immunol Et Ther Exp* 49:217-229.
- Mowat AM (2003): Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Rev Immunol* 3:331-341.
- Mowat AM, Viney JL (1997): The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* 156:145-166.
- Nagata S, McKenzie C, Pender SL, Bajaj-Elliott M, Fairclough PD, Walker-Smith JA, Monteleone G, MacDonald TT (2000): Human Peyer's patch T cells are sensitized to dietary antigen and display a Th cell type 1 cytokine profile. *J Immunol* 165: 5315-5321.

- Nagler-Anderson C (2001): Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nature Rev Immunol* 1:59-67.
- Narisawa T, Kusaka H, Yamazaki Y, Takahashi M, Koyama H, Koyama K, Fukaura Y, Wakizaka A (1990): Relationship between blood plasma prostaglandin E2 and liver and lung metastases in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 33:840-845.
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F (1999): Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiological Reviews* 79:1193-1226.
- Neutra MR (1999): M cells in antigen sampling in mucosal tissues. *Curr Top Microbiol Immunol* 236:17-32.
- Nicoletti C (2000): Unsolved mysteries of intestinal M cells. *Gut* 47:735-739.
- Nussler AK, Wittel UA, Nussler NC, Beger HG (1999): Leukocytes, the Janus cells in inflammatory disease. *Langenbecks Arch Surg* 384:222-232.
- O'Gorman MR (2002): Evaluation of phagocytic cell function. In: *Manual of clinical laboratory immunology*, Rose NR, Hamilton RG, Detrick B (eds), 6th ed. Washington: ASM Press, pp 265-283.
- Orrhage K, Sillerstrom E, Gustafsson JA, Nord CE, Rafter J (1994): Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mutat Res* 311:239-248.
- Ouwehand AC, Isolauri E, Kirjavainen PV, Tolkkio S, Salminen SJ (2000): The mucus binding of Bifidobacterium lactis Bb12 is enhanced in the presence of Lactobacillus GG and Lact. delbrueckii subsp bulgaricus. *Lett Appl Microbiol* 30:10-13.
- Peleg II, Wilcox CM (2002): The role of eicosanoids, cyclooxygenases, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal tumorigenesis and chemoprevention. *J Clin Gastroenterol* 34:117-125.
- Perdigon G, Vintini E, Alvarez S, Medina M, Medici M (1999): Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 82:1108-1114.
- Perrin P, Pierre F, Patry Y, Champ M, Berreur M, Pradal G, Bornet F, Meflah K, Menanteau J (2001): Only fibres promoting a stable butyrate producing colonic ecosystem decrease the rate of aberrant crypt foci in rats. *Gut* 48:53-61.
- Pessi T, Sutas Y, Hurme M, Isolauri E (2000): Interleukin-10 generation in atopic children following oral Lactobacillus rhamnosus GG. *Clin Exp Allergy* 30:1804-1808.
- Pessi T, Sutas Y, Saxelin M, Kallioinen H, Isolauri E (1999): Antiproliferative effects of homogenates derived from five strains of candidate probiotic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 65:4725-4728.
- Pestka JJ, Ha CL, Warner RW, Lee JH, Ustunol Z (2001): Effects of ingestion of yogurts containing Bifidobacterium and Lactobacillus acidophilus on spleen and Peyer's patch lymphocyte populations in the mouse. *J Food Prot* 64:392-395.
- Peters RK, Pike MC, Garabrant D, Mack TM (1992): Diet and colon cancer in Los Angeles County, California. *Cancer Causes Control* 3:457-473.

- Pierre F, Perrin P, Champ M, Bornet F, Meflah K, Menanteau J (1997): Short-chain fructo-oligosaccharides reduce the occurrence of colon tumors and develop gut-associated lymphoid tissue in Min mice. *Cancer Res* 57:225-228.
- Pool-Zobel B, Van Loo J, Rowland I, Roberfroid MB (2002): Experimental evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer. *Br J Nutr* 87:273-281.
- Pool-Zobel BL, Munzner R, Holzapfel WH (1993): Antigenotoxic properties of lactic acid bacteria in the *S. typhimurium* mutagenicity assay. *Nutr Cancer* 20:261-270.
- Poulsen M, Molck AM, Jacobsen BL (2002): Different effects of short- and long-chained fructans on large intestinal physiology and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Nutr Cancer* 42:194-205.
- Pugh S, Thomas GAO (1994): Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E(2). *Gut* 35:675-678.
- Qiao H, Duffy LC, Griffiths E, Dryja D, Leavens A, Rossman J, Rich G, Riepenhoff-Talty M, Locniskar M (2002): Immune responses in rhesus rotavirus-challenged BALB/c mice treated with bifidobacteria and prebiotic supplements. *Pediatr Res* 51:750-756.
- Rabinovitch M (1995): Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol* 5:85-87.
- Rao CV, Sanders ME, Indranie C, Simi B, Reddy BS (1999): Prevention of colonic preneoplastic lesions by the probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFMTM in F344 rats. *Int J Oncol* 14:939-944.
- Reddy BS, Hamid R, Rao CV (1997): Effect of dietary oligofructose and inulin on colonic preneoplastic aberrant crypt foci inhibition. *Carcinogenesis* 18:1371-1374.
- Reed WR, DeGowin RL (1992): Suppressive effects of pentoxifylline on natural killer cell activity. *J Lab Clin Med* 119:763-771.
- Rigas B, Goldman IS, Levine L (1993): Altered eicosanoid levels in human colon-cancer. *J Lab Clin Med* 122:518-523.
- Roberfroid MB, Delzenne NM (1998): Dietary fructans. *Annu Rev Nutr* 18:117-143.
- Roberfroid MB, Van Loo JA, Gibson GR (1998): The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *J Nutr* 128:11-19.
- Romagnani S (1999): Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis* 5:285-294.
- Romagnani S (2000): T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 85:9-18.
- Rowland IR, Rumney CJ, Coutts JT, Lievens LC (1998): Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis* 19:281-285.
- Säemann MD, Böhmig GA, Österreicher CH, Burtscher H, Parolini O, Diakos C, Stockl J, Horl WH, Zlabinger GJ (2001): Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. *FASEB J* 14:2380-2382.

- Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I (1998): Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 80:S147-S171.
- Sanders ME (2000): Consideration for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J Nutr* 130:384S-390S.
- Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M, Hla T (1995): Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 55:3785-3789.
- Saxelin M (1997): Lactobacillus GG - A human probiotic strain with thorough clinical documentation. *Food Rev Int* 13:293-313.
- Schiffirin EJ, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann JM, Donnet-Hughes A (1995): Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 78:491-497.
- Schley PD, Field CJ (2002): The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. *Br J Nutr* 87:221-230.
- Sekine K, Ushida Y, Kuhara T, Iigo M, Baba-Toriyama H, Moore MA, Murakoshi M, Satomi Y, Nishino H, Kakizoe T, Tsuda H (1997): Inhibition of initiation and early stage development of aberrant crypt foci and enhanced natural killer activity in male rats administered bovine lactoferrin concomitantly with azoxymethane. *Cancer Letters* 121:211-216.
- Sheih YH, Chiang BL, Wang LH, Liao CK, Gill HS (2001): Systemic immunity-enhancing effects in healthy subjects following dietary consumption of the lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* HN001. *J Am Coll Nutr* 20:149-56.
- Smith JA (1994): Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* 56:672-686.
- Spanhaak S, Havenaar R, Schaafsma G (1998): The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur J Clin Nutr* 52:899-907.
- Stein DS, Korvick JA, Vermund SH (1992): CD4+ lymphocyte cell enumeration for prediction of clinical course of human immunodeficiency virus disease: a review. *J Infect Dis* 165:352-363.
- Suh O, Mettlin C, Petrelli NJ (1993): Aspirin use, cancer, and polyps of the large-bowel. *Cancer* 72:1171-1177.
- Swanson KS, Grieshop CM, Flickinger EA, Bauer LL, Healy HP, Dawson KA, Merchen NR, Fahey GCJ (2002): Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. *J Nutr* 132:980-989.

- Tagliabue A, Villa L, Scapigliati G, Boraschi D (1983): Peyer's patch lymphocytes express natural cytotoxicity but not natural killer activity. *Nat Immun Cell Growth Regul* 3: 95-101.
- Takagi A, Matsuzaki T, Sato M, Nomoto K, Morotomi M, Yokokura T (2001): Enhancement of natural killer cytotoxicity delayed murine carcinogenesis by a probiotic microorganism. *Carcinogenesis* 22:599-605.
- Takahashi T, Oka T, Iwana H, Kuwata T, Yamoto Y (1993): Immune response of mice to orally administered lactic acid bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* 57:1557-1560.
- Taper HS, Delzenne NM, Roberfroid MB (1997): Growth inhibition of transplantable mouse tumors by non-digestible carbohydrates. *Int J Cancer* 71:1109-1112.
- Tartter PI, Steinberg B, Barron DM, Martinelli G (1987): The prognostic significance of natural killer cytotoxicity in patients with colorectal cancer. *Arch Surg* 122:1264-1268.
- Tejada-Simon MV, Lee JH, Ustunol Z, Pestka JJ (1999a): Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. *J Dairy Sci* 82:649-660.
- Tejada-Simon MV, Ustunol Z, Pestka JJ (1999b): Effects of lactic acid bacteria ingestion on basal cytokine mRNA and immunoglobulin levels in mouse. *J Food Prot* 62:287-291.
- Theze J, Alzari PM, Bertoglio J (1996): Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions. *Immunol Today* 17:481-486.
- Thun MJ, Namboodiri MM, Calle EE, Flanders WD, Heath CW (1993): Aspirin use and risk of fatal cancer. *Cancer Res* 53:1322-1327.
- Timonen T (1997): Natural killer cells: endothelial interactions, migration, and target cell recognition. *J Leukoc Biol* 62:693-701.
- Trinchieri G (1995): Natural killer cells wear different hats: effector cells of innate resistance and regulatory cells of adaptive immunity and hematopoiesis. *Semin Immunol* 7:83-88.
- Trinchieri G, Gerosa F (1996): Immunoregulation by interleukin-12. *J Leukoc Biol* 59:505-511.
- Uhlig HH, Powrie F (2003): Dendritic cells and the intestinal bacterial flora: a role for localized mucosal immune responses. *J Clin Invest* 112:648-651.
- Van De Water J, Keen C, Gershwin M (1999): The influence of chronic yoghurt consumption on immunity. *J Nutr* 129:1492S-1495S.
- Van den Brink MRM, Palomba ML, Basse PH, Hiserodt JC (1991): In situ localization of 3.2.3+ natural-killer-cells in tissues from normal and tumor bearing rats. *Cancer Res* 51:4931-4936.
- Van den Eertwegh AJ, Boersma WJ, Claassen E (1992): Immunological functions and in vivo cell-cell interactions of T cells in the spleen. *Crit Rev Immunol* 11:337-380.
- Van Loo J, Coussement P, De Leenheer L, Hoebregs H, Smits G (1995): On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Crit Rev Food Sci Nutr* 35:525-552.
- Viret C, Janeway CA (1999): MHC and T cell development. *Rev Immunogenet* 1:91-104.



- Vujanovic N (2001): Role of TNF family ligands in antitumor activity of natural killer cells. *Int Rev Immunol* 20:415-437.
- Vukmanovic-Stejic M, Thomas MJ, Noble A, Kemeny DM (2001): Specificity, restriction and effector mechanisms of immunoregulatory CD8 T cells. *Immunology* 102:115-122.
- Wallace FA, Neely SJ, Miles EA, Calder PC (2000): Dietary fats affect macrophage-mediated cytotoxicity towards tumour cells. *Immunol Cell Biol* 78:40-48.
- Wang X, Gibson GR (1993): Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J Appl Bacteriol* 75:373-380.
- Warren HS (1996): NK cell proliferation and inflammation. *Immunol Cell Biol* 74:473-480.
- Weisburger JH (1971): Colon carcinogens: their metabolism and mode of action. *Cancer* 28:60-70.
- Wheeler JG, Bogle ML, Shema SJ, Shirrell MA, Stine KC, Pittler AJ, Burks AW, Helm RM (1997): Impact of dietary yogurt on immune function. *Am J Med Sci* 313:120-123.
- Whiteside T, Herberman R (1995): The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr Opin Immunol* 7:704-710.
- Williams T, Fox K, Kant, JA (1991): Interleukin-2: basic biology and therapeutic use. *Hematol Pathol* 5:45-55.
- Wilson J, Balkwill F (2002): The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Semin Cancer Biol* 12:113-120.
- World Cancer Research Fund (1997): Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. London.
- Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC (1994): Inhibition of natural killer cell activity by dietary lipids. *Immunol Lett* 41:241-247.
- Yasui H, Shida K, Matsuzaki T, Yokokura T (1999): Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76:383-389.
- Zhang M, Tracey KJ (1998): Tumor Necrosis Factor. In: *The Cytokine Handbook*, Thomson AW (ed), 3rd ed. London: Academic Press Limited, pp 517-548.
- Zhang XB, Ohta Y (1991): In vitro binding of mutagenic pyrolyzates to lactic acid bacterial cells in human gastric juice. *J Dairy Sci* 74:752-757.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AOM	Azoxymethan
BB12	<i>Bifidobacterium lactis</i> BB12
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BrdU	5-Brom-2'-Desoxyuridin
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Differenzierungscluster
cfu	colony-forming units
ConA	Concanavalin A, Lektin von <i>Canavalia ensiformis</i>
COX	Cyclooxygenase
CTL	zytotoxische T-Zellen
DHR	Dihydrorhodamin 123
DiO	3,3'-Diocetadecyloxycarbocyanin-Perchlorat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMH	1,2-Dimethylhydrazin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Durchflusszytometer
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FL	Fluoreszenzkanal
FOS	Fructooligosaccharide
FSC	Vorwärtsstreulicht
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILF	einzelne lymphatische Follikel
KIR	killer immunoglobuline-like receptors
KON	Kontrolle
LAP	latent-associated peptide
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
LPS	Lipopolysaccharid
LTBP	latent TGF- $\beta$ binding protein
MF	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MLK	mesenteriale Lymphknoten
MW	Mittelwert
n	Anzahl der durchgeführten Versuche
NKT	natürliche Killer T-Zellen
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
PALS	periarteriolar lymphoid sheat
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PHA	Lektin von <i>Phaseolus vulgaris</i> , Phytohämagglutinin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMBZ	periphere mononukleäre Blutzellen

PP	Peyersche Plaques
PRÄ	Versuchsdiät mit Präbiotikum
PRO	Versuchsdiät mit Probiotika
PTX	Pentoxifyllin
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
R-PE	R-Phycoerythrin
SCFA	kurzkettige Fettsäuren
SD	Standardabweichung
SIgA	sekretorisches Immunglobulin A
spp	Subspezies
SSC	Seitwärtsstreulicht
SYN	Versuchsdiät mit Synbiotikum
TGF	Transforming Growth Factor
T <sub>H</sub> -Zellen	Helfer-T-Zellen
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zell-Rezeptor
v/v	Volumen per Volumen
VLDL	Lipoproteine sehr geringer Dichte
w/w	Gewicht pro Gewicht

## 8 Tabellenanhang

### 8.1 Tierstudie 1

#### 8.1.1 Körpergewicht, Gewichtszunahme und Futteraufnahme

Tab. 8.1: Körpergewicht und Gewichtszunahme der Versuchstiere (in g)

	Gewicht Versuchbeginn				Gewicht Versuchende				Gewichtszunahme			
	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN
	320,7	342,0	324,6	324,3	360,7	419,6	368,5	360,1	40,1	77,5	43,9	35,8
	330,2	280,9	297,3	302,0	368,9	321,6	336,7	344,7	38,7	40,8	39,4	42,7
	314,6	312,1	332,2	310,4	365,5	358,4	380,6	342,3	50,9	46,3	48,4	31,9
	316,1	311,3	293,7	327,1	378,6	349,4	346,0	377,9	62,5	38,0	52,4	50,9
	372,2	336,1	365,3	333,8	424,5	390,5	398,5	401,1	52,3	54,4	33,2	67,3
	351,0	316,0	356,4	334,9	376,7	367,1	402,0	378,5	25,7	51,2	45,6	43,6
	366,1	328,8	331,7	331,4	408,7	361,3	365,7	373,1	42,6	32,5	34,0	41,7
	333,2	299,6	340,4	327,9	378,9	350,6	382,5	364,9	45,7	51,1	42,0	37,0
	303,7	289,4	316,6	310,3	354,2	334,6	365,6	361,2	50,4	45,2	49,0	50,9
	303,3	315,3	305,0	318,5	355,8	354,2	346,7	371,6	52,5	38,8	41,7	53,1
	307,0	302,7	313,5	322,4	355,5	352,9	347,6	401,3	48,4	50,1	34,1	78,8
	301,2	338,1	342,8	322,2	353,8	399,9	386,0	387,3	52,5	61,8	43,2	65,1
	318,5	334,2	321,1	312,3	340,7	384,9	351,1	358,5	22,3	50,7	30,0	46,2
	319,9	327,6	339,8	337,4	373,9	367,6	399,6	400,0	54,0	40,1	59,7	62,6
	304,9	325,2	327,1	301,1	355,5	364,1	390,7	336,1	50,6	39,0	63,6	35,0
	329,3	328,3	336,7	349,1	368,8	376,7	382,3	399,5	39,5	48,3	45,6	50,4
	328,5	329,1	314,4	332,2	365,5	374,1	351,0	368,1	37,0	45,0	36,6	36,0
	321,8	336,9	322,7	336,3	366,2	392,8	360,8	380,4	44,4	55,9	38,0	44,1
	309,1	348,9	340,8	318,4	348,1	406,2	379,8	365,2	39,0	57,3	39,0	46,8
	328,3	324,4	304,4	329,0	381,8	357,0	342,6	367,7	53,5	32,6	38,2	38,7
<b>MW</b>	<b>324,0</b>	<b>321,3</b>	<b>326,3</b>	<b>324,1</b>	<b>369,1</b>	<b>369,2</b>	<b>369,2</b>	<b>372,0</b>	<b>45,1</b>	<b>47,8</b>	<b>42,9</b>	<b>47,9</b>
SD	19,8	17,8	18,8	12,4	19,8	24,3	20,8	19,3	9,8	10,7	8,6	12,39
n	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

Tab. 8.2: Durchschnittliche, tägliche Futteraufnahme je Tier (in g)  
(Berechnung: Futteraufnahme je Käfig/Tieranzahl im Käfig)

	KON	PRO	PRÄ	SYN
	14,7	15,5	13,1	15,0
	15,1	13,7	14,3	13,5
	16,9	15,9	14,7	17,4
	14,9	15,6	13,5	16,0
	14,8	14,8	15,4	15,0
	15,3	15,3	14,1	15,9
	15,0	14,6	14,6	14,0
	15,7	14,0	14,7	14,0
	14,0	16,5	15,5	15,6
	15,9	17,1	15,7	15,2
	15,9	13,5	12,6	16,0
	14,7	15,5	13,1	15,0
	15,1	13,7	14,3	13,5
<b>MW</b>	<b>15,3</b>	<b>15,1</b>	<b>14,4</b>	<b>15,2</b>
SD	0,8	1,2	1,0	1,1

## 8.1.2 Lymphozytensubpopulationen

Tab. 8.3: Anteil CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (in %)

	Blut				Milz				MLK			
	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN
	42,6	41,1	41,2	39,2	45,5	40,0	39,9	40,1	48,5	49,2	47,8	50,0
	39,4	49,0	47,5	45,6	41,4	44,4	43,5	47,3	53,9	49,6	47,4	53,2
	48,4	45,5	56,6	44,9	44,2	42,0	47,3	56,0	49,9	45,5	51,5	57,8
	42,7	41,6	45,3	54,8	47,9	46,3	45,5	52,5	47,0	48,3	45,4	58,7
	52,5	55,3	51,1	44,7	56,6	54,0	58,2	61,7	63,5	56,1	61,7	63,3
	43,8	49,8	41,4	45,8	57,6	58,8	61,4	58,4	61,6	63,1	63,5	58,7
	44,8	59,4	42,8	49,8	58,0	54,5	55,9	56,5	58,1	57,2	62,1	54,2
	42,3	48,1	44,4	49,6	56,8	54,0	56,0	53,7	59,2	48,9	57,7	49,4
	40,9	46,1	35,3	40,2	51,1	56,5	52,9	58,1	54,8	57,7	54,0	57,0
	44,8	39,3	40,9	42,1	57,2	54,0	52,1	62,5	54,1	59,9	51,6	56,8
	48,8	51,8	44,6	46,7	58,2	60,9	60,4	56,6	58,6	58,9	55,1	57,3
	42,5	44,9	44,6	56,8	62,3	63,0	64,6	60,1	60,2	55,2	58,9	59,9
	40,3	46,8	38,4	47,8	59,1	62,4	57,3	59,8	60,0	52,4	59,5	59,6
	41,2	65,7	44,6	48,7	61,8	64,5	70,8	59,1	54,5	54,3	62,0	56,2
	38,7	36,3	41,7	42,4	54,6	58,3	61,7	60,1	52,2	53,3	57,9	56,3
	55,5	51,3	42,4	50,9	47,4	60,4	61,6	61,3	51,3	61,4	56,3	58,7
	43,2	41,9	44,6	43,7	63,1	57,1	61,0	59,4	57,4	62,0	58,0	57,6
	41,3	42,2	43,4	47,7	62,5	55,1	59,3	55,3	60,9	56,3	57,5	53,4
	47,7	42,9	48,1	49,1	58,8	56,6	58,7	69,1	57,0	55,3	58,7	59,6
	49,3	48,2	51,9	45,7	62,9		65,2	63,5	58,5	58,2	58,4	61,1
<b>MW</b>	<b>44,5</b>	<b>47,4</b>	<b>44,6</b>	<b>46,8</b>	<b>55,4</b>	<b>54,9</b>	<b>56,7</b>	<b>57,6</b>	<b>56,0</b>	<b>55,1</b>	<b>56,2</b>	<b>56,9</b>
<b>SD</b>	<b>4,5</b>	<b>7,0</b>	<b>4,8</b>	<b>4,4</b>	<b>6,8</b>	<b>7,0</b>	<b>7,8</b>	<b>6,1</b>	<b>4,6</b>	<b>5,0</b>	<b>5,2</b>	<b>3,5</b>
<b>n</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>

Tab. 8.4: Anteil CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (in %)

	Blut				Milz				MLK			
	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN
	25,2	25,7	25,0	24,0	8,5	16,7	7,1	10,9	10,5	8,8	13,4	9,3
	25,0	29,0	22,9	24,1	7,2	11,2	15,9	18,2	10,2	12,8	13,2	14,4
	24,6	24,1	28,5	20,5	15,2	10,3	14,9	9,8	11,6	12,5	11,9	9,0
	26,7	22,2	27,2	29,3	13,6	9,6	12,1	9,7	12,8	11,5	12,0	11,5
	28,8	25,8	31,1	24,4	9,5	9,8	7,5	10,0	7,8	11,1	11,5	11,3
	24,5	21,4	23,0	24,0	9,3	11,4	9,6	11,3	9,4	11,0	8,0	12,2
	24,5	22,5	24,4	23,8	13,9	10,9	12,6	11,5	10,7	13,0	11,3	10,8
	24,2	23,8	23,7	27,9	10,9	11,8	11,5	12,9	12,0	4,3	12,0	5,1
	23,8	24,5	22,9	21,5	22,0	11,9	17,9	10,6	8,2	11,6	9,1	9,0
	24,8	23,5	25,1	22,0	12,3	10,5	15,6	9,6	5,6	9,0	9,8	10,3
	20,9	24,3	24,0	22,9	12,1	12,1	10,2	9,4	12,1	10,1	9,5	11,7
	26,3	29,2	24,6	29,0	12,4	13,8	12,1	14,9	9,9	12,7	6,4	14,4
	25,9	22,9	23,6	24,2	15,0	10,5	12,8	11,8	10,9	5,7	12,6	13,2
	24,4	23,9	23,2	27,6	11,9	9,6	3,6	13,7	8,8	8,9	9,6	13,0
	24,4	24,4	25,0	23,2	14,3	10,6	15,3	13,1	10,9	10,3	9,5	13,0
	25,1	22,8	21,8	21,1	14,4	9,6	9,3	10,9	15,9	13,2	13,7	15,0
	22,5	25,2	24,3	25,3	12,4	11,4	13,9	16,5	12,7	20,3	13,1	13,7
	24,9	26,6	24,9	26,4	12,6	15,0	13,4	12,9	12,0	12,2	12,5	10,8
	27,2	24,7	23,8	20,3	10,5	11,9	14,1	7,0	8,6	14,3	11,7	7,8
	22,6	24,1	24,9	21,2	7,8		7,5	8,2	9,3	10,8	13,0	8,4
<b>MW</b>	<b>24,8</b>	<b>24,5</b>	<b>24,7</b>	<b>24,1</b>	<b>12,3</b>	<b>11,5</b>	<b>11,8</b>	<b>11,6</b>	<b>10,5</b>	<b>11,2</b>	<b>11,2</b>	<b>11,2</b>
<b>SD</b>	<b>1,7</b>	<b>2,0</b>	<b>2,1</b>	<b>2,7</b>	<b>3,3</b>	<b>1,9</b>	<b>3,6</b>	<b>2,7</b>	<b>2,2</b>	<b>3,3</b>	<b>2,0</b>	<b>2,5</b>
<b>n</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>

**Tab. 8.5:** Verhältnis CD4<sup>+</sup>-T-Zellen/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen

	Blut				Milz				MLK			
	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN
	1,69	1,60	1,65	1,64	5,35	2,39	5,60	3,68	4,63	5,58	3,56	5,38
	1,58	1,69	2,08	1,89	5,74	3,98	2,74	2,60	5,26	3,88	3,59	3,68
	1,97	1,89	1,99	2,19	2,91	4,07	3,18	5,74	4,32	3,64	4,31	6,41
	1,60	1,87	1,67	1,87	3,52	4,80	3,75	5,42	3,69	4,18	3,78	5,12
	1,82	2,14	1,64	1,83	5,97	5,53	7,81	6,15	8,12	5,06	5,36	5,59
	1,79	2,32	1,80	1,91	6,22	5,18	6,41	5,16	6,53	5,75	7,96	4,83
	1,83	2,64	1,75	2,10	4,18	5,02	4,43	4,91	5,43	4,39	5,48	5,05
	1,75	2,02	1,87	1,78	5,20	4,58	4,86	4,18	4,92	11,30	4,79	9,67
	1,72	1,88	1,54	1,87	2,32	4,75	2,95	5,50	6,69	4,97	5,92	6,31
	1,81	1,67	1,63	1,91	4,66	5,15	3,33	6,52	9,63	6,66	5,26	5,49
	2,33	2,13	1,86	2,04	4,79	5,03	5,90	6,05	4,85	5,85	5,78	4,90
	1,61	1,54	1,82	1,96	5,03	4,57	5,34	4,02	6,07	4,33	9,17	4,16
	1,55	2,04	1,63	1,98	3,95	5,93	4,49	5,06	5,50	9,14	4,73	4,50
	1,69	2,76	1,92	1,76	5,18	6,75	19,49	4,33	6,17	6,07	6,49	4,32
	1,59	1,49	1,67	1,82	3,83	5,50	4,02	4,58	4,78	5,17	6,12	4,35
	2,22	2,25	1,95	2,42	3,30	6,27	6,65	5,62	3,23	4,65	4,10	3,92
	1,92	1,66	1,84	1,73	5,11	5,00	4,39	3,61	4,51	3,06	4,43	4,20
	1,66	1,59	1,74	1,81	4,97	3,69	4,42	4,28	5,07	4,63	4,62	4,92
	1,75	1,74	2,02	2,42	5,58	4,74	4,18	9,87	6,61	3,87	5,01	7,61
	2,18	2,00	2,08	2,16	8,08		8,64	7,78	6,32	5,41	4,51	7,29
<b>MW</b>	<b>1,80</b>	<b>1,95</b>	<b>1,81</b>	<b>1,95</b>	<b>4,79</b>	<b>4,89</b>	<b>5,63</b>	<b>5,25</b>	<b>5,62</b>	<b>5,38</b>	<b>5,25</b>	<b>5,39</b>
<b>SD</b>	<b>0,22</b>	<b>0,35</b>	<b>0,16</b>	<b>0,21</b>	<b>1,30</b>	<b>0,97</b>	<b>3,62</b>	<b>1,60</b>	<b>1,48</b>	<b>1,91</b>	<b>1,41</b>	<b>1,47</b>
<b>n</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>

### 8.1.3 Phagozytoseaktivität

**Tab. 8.6:** Anteil phagozytischer Zellen (in %) sowie deren mittlere Fluoreszenzintensität (MF)

	Blut Granulozyten								Blut Monozyten							
	KON		PRO		PRÄ		SYN		KON		PRO		PRÄ		SYN	
	%	MF	%	MF	%	MF	%	MF	%	MF	%	MF	%	MF	%	MF
	60,5	58,8	49,8	59,0	33,1	54,5	34,1	49,3	7,3	47,8	6,6	44,0	6,3	37,0	5,6	38,3
	60,7	65,2	73,0	66,1	64,9	69,0	75,1	80,9	7,2	51,1	4,9	80,9	6,3	55,0	9,3	50,8
	49,6	77,6	50,5	66,5	64,9	69,2	21,4	64,9	8,4	88,3	4,9	51,4	5,8	50,2	9,9	47,5
	57,4	62,6	63,0	72,5	65,5	62,6	28,5	110,7	7,4	53,8	9,3	41,0	10,4	40,2	3,6	63,4
	27,5	87,2	17,9	118,2	27,3	137,5	55,7	54,5	7,0	57,1	2,7	80,9	3,6	88,1	8,0	39,1
	20,3	139,8	59,9	54,8	55,0	50,1	65,6	75,9	6,1	46,4	3,4	40,6	13,6	43,2	9,3	50,6
	50,8	58,9	77,8	61,0	59,8	61,6	74,0	72,3	10,1	43,5	31,7	39,5	11,2	44,0	16,0	52,0
	71,6	74,5	70,1	67,2	65,4	60,1	54,6	46,1	21,2	54,7	16,1	47,8	12,2	40,8	5,4	32,5
	55,3	61,9	61,1	54,4	62,4	61,5	63,3	55,7	10,5	48,1	8,6	39,1	9,8	55,0	11,6	39,1
	50,7	56,4	42,9	46,5	25,3	56,4	59,4	74,0	7,6	48,5	6,0	36,4	9,0	47,0	9,5	51,9
	60,9	62,5	58,7	80,4	29,1	72,0	52,6	67,8	16,2	46,4	8,8	58,5	7,6	52,5	8,8	58,0
	40,4	72,5	43,7	55,6	47,2	68,0	36,1	49,8	7,3	57,5	3,5	57,3	8,6	52,4	2,2	37,5
	41,7	64,8	52,5	67,7	54,2	55,9	68,4	74,6	4,4	49,9	7,9	48,9	6,8	41,7	9,1	47,6
	73,1	67,3	45,7	71,4	72,6	75,7	30,9	50,7	6,1	46,9	7,3	53,0	9,7	60,8	3,5	37,8
	43,2	60,5	61,5	65,9	55,5	69,5	69,1	67,7	5,1	42,1	5,8	51,5	10,1	45,2	6,5	49,6
	42,5	58,4	54,6	50,7	69,3	54,9	51,9	53,2	8,4	47,3	14,6	40,6	20,7	47,8	10,1	46,4
	57,5	57,0	51,3	58,6	49,3	61,2	67,5	55,9	12,6	54,1	10,0	38,5	7,8	53,2	7,5	38,5
	66,6	65,0	50,3	57,6	61,2	61,0	43,0	59,5	6,6	50,3	6,4	49,5	8,1	44,5	5,6	46,7
	60,5	61,4	55,2	61,7	63,1	67,7	41,9	62,8	6,3	51,7	6,5	62,6	10,2	63,8	7,3	47,5
	47,3	70,0	70,4	65,9	70,8	57,0	61,3	60,4	3,1	36,5	6,4	39,1	4,1	37,5	9,8	42,8
<b>MW</b>	<b>51,9</b>	<b>69,1</b>	<b>55,5</b>	<b>65,1</b>	<b>54,8</b>	<b>66,3</b>	<b>52,7</b>	<b>64,3</b>	<b>8,4</b>	<b>51,1</b>	<b>8,6</b>	<b>50,1</b>	<b>9,1</b>	<b>50,0</b>	<b>7,9</b>	<b>45,9</b>
<b>SD</b>	<b>13,5</b>	<b>18,3</b>	<b>13,2</b>	<b>14,9</b>	<b>15,0</b>	<b>18,1</b>	<b>16,2</b>	<b>14,9</b>	<b>4,2</b>	<b>10,1</b>	<b>6,4</b>	<b>12,9</b>	<b>3,7</b>	<b>11,6</b>	<b>3,2</b>	<b>7,7</b>
<b>n</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>

**Tab. 8.7:** Anteil phagozytierender Zellen (in %) sowie deren MF

	Milz Granulozyten								Milz Monozyten							
	KON		PRO		PRÄ		SYN		KON		PRO		PRÄ		SYN	
	%	MF	%	MF	%	MF	%	MF	%	MF	%	MF	%	MF	%	MF
	49,6	41,5	42,8	42,9	39,0	48,6	32,9	33,6	20,2	29,9	18,1	30,8	21,7	31,5	11,9	28,4
	24,9	47,0	45,0	34,3	40,2	32,4	41,5	31,1	15,7	31,8	20,3	32,1	13,9	27,4	11,1	29,9
	39,9	29,6	35,4	28,0	44,5	39,5	45,5	40,2	14,5	28,5	15,6	28,2	17,6	32,3	18,6	30,1
	41,8	39,5	48,5	35,8	45,3	37,5	51,7	46,8	20,5	30,6	14,3	30,8	16,0	30,5	14,8	33,0
	44,2	33,7	51,8	35,4	49,7	31,8	46,1	32,0	11,4	29,9	12,2	31,8	9,8	32,0	15,9	22,7
	40,2	29,3	44,3	29,0	42,3	31,2	41,9	38,6	9,1	30,6	12,9	25,7	15,5	25,8	15,0	29,0
	54,6	35,0	34,3	29,1	42,9	34,1	39,9	35,6	18,3	23,9	11,4	29,6	14,2	25,5	15,4	31,4
	56,4	31,1	28,2	31,5	36,7	29,8	30,0	30,5	20,6	26,4	15,0	29,1	15,4	27,0	16,5	29,8
	27,2	27,3	26,3	25,1	24,6	31,3	30,8	27,9	13,8	29,4	13,1	24,1	12,4	27,0	10,6	27,7
	39,5	32,4	25,6	26,6	31,8	28,8	41,8	46,8	16,6	27,4	11,3	24,7	14,0	27,1	16,4	34,6
	44,2	30,5	40,5	47,2	31,5	37,4	36,9	46,7	18,7	26,7	18,5	34,6	13,1	34,1	17,0	35,2
	43,8	49,9	42,3	31,8	39,9	32,6	43,4	37,3	21,0	35,4	14,9	29,4	17,6	29,5	19,3	31,7
	46,2	31,1	43,3	37,9	30,7	25,6	41,6	37,2	18,3	30,1	24,2	30,4	13,7	26,4	19,8	29,3
	45,6	35,7	31,2	30,2	40,3	37,1	60,0	28,0	21,1	29,4	17,7	32,1	21,1	29,9	20,7	26,6
	39,9	26,8	29,7	28,3	51,0	34,6	32,7	27,1	14,8	28,0	8,8	26,7	18,1	30,5	11,1	26,8
	37,9	30,1	42,1	28,7	38,1	28,4	31,4	25,4	20,1	29,3	13,4	29,1	16,1	27,2	14,7	28,4
	27,8	24,6	38,7	32,3	40,3	28,1	42,1	30,7	10,2	29,5	17,0	26,5	17,6	26,2	17,9	26,1
	37,8	27,2	44,2	34,1	42,1	30,1	34,4	30,4	20,3	29,4	16,9	28,6	18,6	26,3	14,5	27,2
	19,1	27,8	24,0	24,8	19,8	25,6	36,7	31,5	14,7	25,5	18,0	30,3	9,8	28,6	17,4	30,0
	31,4	29,4			26,4	27,5	28,6	25,5	16,0	31,2	11,0	30,3	11,6	30,2	14,4	28,6
<b>MW</b>	<b>39,6</b>	<b>33,0</b>	<b>37,8</b>	<b>32,3</b>	<b>37,9</b>	<b>32,6</b>	<b>39,5</b>	<b>34,1</b>	<b>16,8</b>	<b>29,1</b>	<b>15,2</b>	<b>29,2</b>	<b>15,4</b>	<b>28,8</b>	<b>15,6</b>	<b>29,3</b>
<b>SD</b>	<b>9,6</b>	<b>6,8</b>	<b>8,3</b>	<b>5,8</b>	<b>8,1</b>	<b>5,5</b>	<b>7,8</b>	<b>6,9</b>	<b>3,7</b>	<b>2,5</b>	<b>3,7</b>	<b>2,7</b>	<b>3,3</b>	<b>2,5</b>	<b>2,9</b>	<b>2,9</b>
<b>n</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>

### 8.1.4 Oxidativer Burst

**Tab. 8.8:** Anteil aktiver Granulozyten im Blut (in %) sowie deren MF

	KON		PRO		PRÄ		SYN	
	%	MF	%	MF	%	MF	%	MF
	32,0	43,6	32,2	44,2	41,9	53,8	23,1	47,5
	62,0	45,6	35,7	45,8	44,0	48,3	53,7	37,8
	24,1	46,8	30,8	47,5	37,2	48,3	33,1	43,3
	36,7	52,3	34,3	44,4	27,2	40,3	52,0	34,0
	49,5	40,6	11,8	35,8	26,6	36,0	25,3	52,8
	38,9	48,6	21,9	44,0	19,4	53,9	48,0	43,7
	25,7	49,6	38,8	37,6	40,2	44,9	35,0	41,0
	38,9	48,5	45,5	45,0	40,4	41,2	42,5	33,0
	36,4	39,1	46,3	47,2	48,9	34,7	52,6	32,5
	46,4	37,3	60,7	57,0	42,0	32,8	30,5	42,3
	27,0	49,3	46,1	52,3	31,3	40,5	28,8	41,8
	59,3	53,4	58,8	48,6	52,8	42,5	46,9	41,4
	28,0	42,0	34,4	60,4	53,1	43,7	20,1	39,0
	24,2	50,8	29,7	56,9	45,0	51,6	30,3	43,0
	68,7	50,4	53,8	54,5	29,1	48,9	41,6	38,0
	55,9	41,8	50,5	45,2	41,3	38,4	47,3	47,3
	59,4	51,9	31,6	53,0	57,1	51,0	45,8	39,0
	43,0	52,3	51,5	39,5	47,4	46,2	37,2	44,6
	28,4	49,6	47,6	41,9	36,2	45,5	27,1	56,5
			28,9	51,2	41,7	41,2	33,2	50,0
<b>MW</b>	<b>41,3</b>	<b>47,0</b>	<b>39,5</b>	<b>47,6</b>	<b>40,1</b>	<b>44,2</b>	<b>37,7</b>	<b>42,4</b>
<b>SD</b>	<b>14,3</b>	<b>4,9</b>	<b>12,6</b>	<b>6,6</b>	<b>9,7</b>	<b>6,2</b>	<b>10,5</b>	<b>6,3</b>
<b>n</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>

### 8.1.5 Aktivität der natürlichen Killerzellen

**Tab. 8.9:** NK-Aktivität der Immunzellen aus Blut und Milz (spezifische Aktivität in %)

	Blut				Milz			
	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN
	19,5	31,1	24,4	23,8	55,7	60,5	48,9	56,7
	23,7	26,0	19,8	22,2	54,0	59,3	39,1	43,9
	22,5	23,8	23,6	18,2	52,7	44,4	51,5	48,3
	15,3	18,6	22,7	20,3	39,4	59,1	56,7	35,3
	7,6	14,0	14,4	16,9	46,2	39,8	46,8	59,2
	14,0	21,6	15,8	21,3	41,7	49,8	48,5	35,3
	10,4	26,4	9,4	24,1	50,8	33,2	46,1	43,0
	8,8	13,1	17,1	17,0	47,9	48,8	37,3	38,8
	11,1	12,0	12,4	18,3	42,9	36,8	48,0	46,9
	12,6	14,7	14,6	14,2	53,7	44,8	36,3	35,3
	11,2	16,8	18,1	18,8	42,8	51,9	40,8	40,6
	11,2	28,7	9,9	28,9	37,1	29,1	36,7	23,8
	26,2	16,4	14,6	22,7	27,4	35,3	30,3	56,3
	22,7	16,0	14,2	18,6	51,6	49,2	51,9	38,8
	26,2	20,6	10,2	33,0	34,0	46,6	41,6	38,9
	9,8	9,7	9,4	12,1	50,2	53,2	47,7	51,0
	12,2	18,3	10,5	19,5	47,5	29,3	32,3	37,9
	12,2	14,0	14,7	13,5	36,7	36,3	44,9	28,1
	12,8	12,4	23,6	9,4	49,1	28,0	32,8	36,5
	10,1	8,2	13,7	9,2	38,5	41,0	38,5	41,7
<b>MW</b>	<b>15,0</b>	<b>18,1</b>	<b>15,7</b>	<b>19,1</b>	<b>45,0</b>	<b>43,8</b>	<b>42,8</b>	<b>41,8</b>
<b>SD</b>	<b>6,1</b>	<b>6,4</b>	<b>4,9</b>	<b>6,0</b>	<b>7,7</b>	<b>10,3</b>	<b>7,3</b>	<b>9,2</b>
<b>n</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>

**Tab. 8.10:** NK-Aktivität der Immunzellen aus MLK und PP (spezifische Aktivität in %)

	MLK				PP			
	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN
	54,3	57,0	55,7	53,0	60,4	57,6	54,4	63,6
	54,5	50,4	37,9	47,3	63,1	54,8	52,3	51,2
	46,9	47,9	46,6	46,0	43,1	49,2	44,2	58,5
	40,1	52,7	51,7	41,4	52,4	69,0	43,4	43,2
	42,1	45,6	38,3	51,7	47,6	35,2	45,1	44,2
	47,4	49,4	45,7	53,4	42,9	61,9	53,6	56,3
	42,1	43,5	51,9	56,5	55,2	41,6	47,3	54,4
	47,9	49,6	55,3	36,7	49,4	51,7	44,4	61,5
	46,0	38,0	33,3	49,9	35,3	31,5	46,8	42,1
	47,5	50,6	31,2	44,8	52,9	51,1	39,7	30,0
	37,7	58,0	46,6	40,2	18,9	53,7	52,7	27,3
	29,7	49,4	39,4	25,6	49,3	35,7	19,6	62,5
	31,0	41,5	36,1	52,9	48,3	38,9	35,8	34,6
	45,3	58,4	48,5	43,8	45,8	49,5	35,8	42,8
	30,0	51,3	51,2	35,7	29,1	46,0	34,9	52,5
	60,7	44,8	41,6	47,3	43,1	41,9	37,8	42,0
	39,7	29,3	41,4	30,2	29,9	37,3	28,1	35,4
	40,1	43,4	52,2	21,9	34,5	37,5	32,9	35,9
	39,5	24,4	31,1	38,8		54,3	27,9	55,2
	37,0	42,8	38,5	52,8			42,9	
<b>MW</b>	<b>43,0</b>	<b>46,4</b>	<b>43,7</b>	<b>43,5</b>	<b>44,5</b>	<b>47,3</b>	<b>41,0</b>	<b>47,0</b>
<b>SD</b>	<b>8,1</b>	<b>8,7</b>	<b>7,9</b>	<b>9,7</b>	<b>11,4</b>	<b>10,1</b>	<b>9,4</b>	<b>11,3</b>
<b>n</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>19</b>



**Tab. 8.11:** Hemmung der NK-Aktivität durch PTX (spezifische Aktivität in %)

	ohne PTX	PTX 50 µg/ml
	47,01	21,88
	57,89	28,96
	56,84	21,95
	69,52	39,32
59,79	27,92	
<b>MW</b>	<b>58,21</b>	<b>28,01</b>
SD	8,03	7,13
n	5	5

### 8.1.6 Proliferation

**Tab. 8.12:** Proliferation der Immunzellen aus Milz, MLK und PP (OD der Enzym-Farb-Reaktion)

	Milz				MLK				PP			
	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN
1,08	1,13	0,61	0,28	1,31	1,55	1,20	0,89	1,70	1,05	0,70	0,92	
1,84	0,95	0,48	1,59	0,62	0,14	0,13	0,23	1,02	1,28	0,93	1,13	
0,79	0,41	1,18	1,23	0,16	2,02	0,05	0,76	1,03	1,23	0,39	0,14	
0,52	0,90	0,89	0,82	0,49	1,93	1,93	2,04	0,55	0,71	1,28	0,81	
0,28	0,81	0,54	1,33	2,14	1,75	1,86	1,73	1,64	1,41	1,13	1,22	
0,58	1,00	1,12	0,59	1,93	1,70	2,09	1,34	0,67	2,50	1,08	1,44	
1,76	0,40	1,08	0,85	1,34	0,95	1,34	1,45	2,76	2,30	0,50	1,19	
0,18	0,12	0,12	0,15	2,25	1,04	0,71	0,83	1,79	2,17	2,21	1,77	
0,31	0,15	0,25	0,64	1,05	1,74	2,24	2,29	1,83	1,89	1,79	1,74	
0,60	0,81	0,45	0,29	1,60	2,21	0,47	1,22	2,53	1,80	1,88	0,38	
1,08	0,64	0,26	0,26	0,79	0,46	0,30	1,73	1,30	1,32	1,35	1,51	
1,07	0,23	0,43	1,42	1,53	2,21	2,28	2,37	1,40	0,44	1,34	1,83	
1,32	1,41	0,78	1,01	0,17	1,40	1,14	1,94	1,79		2,19	2,13	
2,35	1,22	1,89	0,15	1,13	1,93	2,14	2,17			1,80		
1,84	0,11	1,20	1,97	2,13	2,49	0,94	0,60					
0,17	2,19	1,79	1,75	2,30	1,24	1,32	0,20					
2,52		1,80		1,43	0,59	0,25	2,06					
				0,51	0,22	2,23	0,91					
				1,10	0,53		.					
<b>MW</b>	<b>1,08</b>	<b>0,78</b>	<b>0,87</b>	<b>0,90</b>	<b>1,26</b>	<b>1,37</b>	<b>1,26</b>	<b>1,38</b>	<b>1,54</b>	<b>1,51</b>	<b>1,33</b>	<b>1,25</b>
SD	0,75	0,56	0,56	0,60	0,69	0,72	0,80	0,70	0,65	0,64	0,59	0,58
n	17	16	17	16	19	19	18	18	13	12	14	13

### 8.1.7 Interleukin-10

**Tab. 8.13:** IL-10-Sekretion der Immunzellen aus Milz, MLK und PP (pg/ml)

	Milz				MLK				PP			
	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN
272	190	262	297	91	129	112	117	500	295	390	249	
193	215	301	148	101	68	66	67	653	632	615	1081	
359	283	363	631	76	153	91	151	398	363	852	226	
570	1019	328	451	122	133	78	77	286	278	560	333	
566	254	512	381	160	109	205	377	298	372	1471	285	
378	281	391	142	174	144	154	67	87	114	220	1215	
238	175	253	172	63	69	206	57	442	466	160	187	
206	222	326	125	93	104	98	55	309	850	1472	318	
392	144	198	415	86	80	65	102	235	289	636	471	
111	113	163	508	86	149	95	179	270	234	347	467	
231	574	285	422	65	222	154	163	230	377	432	243	
365	233	302	249	71	107	68	179	300	114	552	423	
259	358	271	214	181	154	87	208	306	231	381	484	
187	220	354	205	47	78	196	134	303	256	496	699	
444	318	342	368	79	74	143	114	252	620	289	452	
409	420	331	277	122	173	116	230	241	259	227	303	
163	198	280	105	172	55	41	51	224	478	285	298	
120	191	218	264	77	43	81	46		379	529		
253	125	101	225	33	33	57	125					
383	234	196	613	73	109	184	83					
<b>MW</b>	<b>305</b>	<b>288</b>	<b>289</b>	<b>311</b>	<b>99</b>	<b>109</b>	<b>115</b>	<b>129</b>	<b>314</b>	<b>367</b>	<b>551</b>	<b>455</b>
SD	133	203	90	157	43	48	52	80	127	187	377	291
n	20	20	20	20	20	20	20	20	17	18	18	17

### 8.1.8 Interferon- $\gamma$

**Tab. 8.14:** IFN- $\gamma$ -Sekretion der Immunzellen aus Milz, MLK und PP (pg/ml)

	Milz				MLK				PP			
	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN
160	49	54	68	96	31	7	28	3840	2236	2702	3750	
84	150	87	90	15	118	58	59	3266	4240	3294	4792	
86	100	187	214	62	8	210	47	4584	3272	3116	1855	
84	916	184	80	0	30	8	18	2916	3110	5990	2036	
173	42	89	266	148	23	34	202	3136	3118	8222	2130	
255	124	113	113	116	85	18	36	1514	1570	3112	6442	
171	80	89	74	18	51	59	28	3002	2412	1930	1929	
36	211	37	65	47	105	23	74	2090	4878	8616	2548	
64	121	74	169	24	104	70	149	2786	2688	4492	3244	
230	102	258	5	157	102	338	22	2534	1805	2740	2740	
112	45	58	49	117	39	49	31	1742	2952	2310	2602	
136	116	27	74	66	136	40	62	2512	886	2952	2368	
15	36	19	5	31	39	46	20	2824	1459	2154	3136	
15	154	79	4	34	142	132	17	2230	2008	3082	2576	
106	14	50	70	40	74	43	40	2502	3628	1870	2188	
63	0	109	1	23	31	66	28	2224	2210	2112	2290	
0	288	156	102	4	373	147	78	1872	3784	2276	1936	
118			87	116			66		1976	3374		
<b>MW</b>	<b>106</b>	<b>150</b>	<b>98</b>	<b>85</b>	<b>62</b>	<b>88</b>	<b>79</b>	<b>56</b>	<b>2681</b>	<b>2680</b>	<b>3575</b>	<b>2857</b>
SD	77	211	65	71	50	85	85	49	768	1038	2020	1194
n	18	17	17	18	18	17	17	18	17	18	18	17

## 8.1.9 Sekretorisches Immunglobulin A

Tab. 8.15: SIgA-Konzentration des Ileum- und des Caecum-Inhalts (OD der Enzym-Farb-Reaktion)

	Ileum				Caecum			
	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN
	0,21	0,72	0,67	0,31	0,49	0,85	0,97	0,73
	0,38	1,53	0,61	1,26	0,42	0,77	0,42	0,40
	0,58	0,54	1,31	0,62	0,35	0,67	2,44	0,40
	1,17	1,02	1,58	1,29	0,23	0,70	1,66	0,94
	0,91	0,99	1,07	1,75	0,43	0,94	0,32	0,41
	1,36	1,00	1,33	2,05	1,28	0,67	0,80	1,05
	0,90	1,37	1,50	0,82	0,85	0,62	0,97	0,59
	0,71	1,17	0,79	0,95	0,45	0,44	0,52	0,70
	0,66	0,40	1,15	0,74	0,29	0,50	2,05	0,53
	0,31	0,45	3,02	1,34	0,41	0,58	0,81	0,71
	0,55	0,65	0,52	1,29	0,71	0,58	2,42	0,96
	0,74	0,54	1,25	0,74	0,86	1,39	1,10	1,21
	1,34	0,82	0,60	1,13	0,44	0,44	0,93	0,49
	0,62	0,84	0,65	0,62	1,90	1,55	0,48	0,57
	1,43	1,70	0,80	2,32	0,65	0,82	0,79	1,58
	0,80	1,56	0,63	1,82	0,98	0,49	0,75	0,49
	0,86	0,25	1,90	3,51	1,11	1,60	0,90	0,69
	0,54	0,93	0,68	1,09	0,54	0,38	0,58	0,60
		1,04	0,66	1,03	0,22	2,80	2,95	0,55
<b>MW</b>	<b>0,78</b>	<b>0,92</b>	<b>1,09</b>	<b>1,30</b>	<b>0,66</b>	<b>0,88</b>	<b>1,15</b>	<b>0,72</b>
<b>SD</b>	<b>0,36</b>	<b>0,41</b>	<b>0,62</b>	<b>0,74</b>	<b>0,42</b>	<b>0,59</b>	<b>0,77</b>	<b>0,31</b>
<b>n</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>19</b>

## 8.2 Tierstudie 2 A

### 8.2.1 Lymphozytensubpopulationen

Tab. 8.16: Anteil CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (in %)

	Milz				MLK			
	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN
	45,9	41,7	39,1	58,3	46,1	51,9	53,6	57,9
	46,1	40,2	48,2	37,7	51,5	50,9	48,8	45,0
	50,6	51,3	50,6	46,6	55,7	44,1	55,8	60,6
	49,5	47,2	49,2	49,2	36,9	55,6	50,2	50,3
	56,9	45,0	42,8	43,8	52,8	48,5	50,0	54,0
	56,6	39,4	46,8	39,3	54,7	57,8	52,8	51,0
	52,5	46,8	44,8	35,6	43,4	47,2	45,5	53,7
	40,6	52,6	52,2	43,5	51,0	47,8	56,8	49,1
	39,0	58,0	42,3	43,2	49,3	40,8	43,7	53,5
	41,3	46,1	37,0	41,4	42,0	45,5	45,4	56,9
	48,0	42,5	43,1	46,9	46,9	50,9	52,8	50,5
	45,6	42,7	42,1	43,8	57,2	41,7	52,6	49,7
	55,7	47,8	52,3	37,7	47,5	57,2	56,3	47,7
	43,8	43,8	42,5	44,8	47,5	51,5	51,8	51,8
	48,6		39,2	42,7		46,1	51,6	
<b>MW</b>	<b>48,1</b>	<b>46,1</b>	<b>44,8</b>	<b>43,6</b>	<b>48,7</b>	<b>49,2</b>	<b>51,2</b>	<b>52,3</b>
<b>SD</b>	<b>5,7</b>	<b>5,2</b>	<b>4,9</b>	<b>5,5</b>	<b>5,6</b>	<b>5,2</b>	<b>4,0</b>	<b>4,2</b>
<b>n</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>14</b>

**Tab. 8.17:** Anteil CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (in %)

	Milz				MLK			
	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN
	7,9	11,1	16,1	5,2	12,1	10,7	8,8	7,3
	5,2	8,7	19,0	5,1	10,7	9,9	12,2	15,4
	6,0	7,4	8,9	9,0	10,4	13,8	8,2	9,5
	5,9	7,7	11,6	6,4	11,3	8,7	13,3	8,9
	6,5	6,4	13,8	7,6	8,8	10,1	9,7	10,1
	8,5	11,5	5,0	5,9	9,2	11,3	7,8	9,7
	6,7	7,2	6,3	9,2	6,8	16,3	6,5	11,8
	7,2	12,6	8,1	8,5	8,4	16,1	8,8	8,1
	7,4	13,0	4,8	6,9	6,2	13,5	8,8	9,3
	2,7	6,3	7,4	6,5	8,0	9,9	8,1	7,2
	8,6	7,2	7,0	9,5	15,8	8,6	8,3	8,5
	8,4	5,0	5,2	19,0	7,5	8,5	7,0	6,9
	5,2	4,1	5,2	5,4	15,9	9,4	8,4	7,9
	7,2	6,0	8,1	6,0	14,4	7,7	9,6	8,6
	9,4	8,2	7,5			8,4	8,2	
<b>MW</b>	<b>6,8</b>	<b>8,2</b>	<b>8,9</b>	<b>7,9</b>	<b>10,4</b>	<b>10,9</b>	<b>8,9</b>	<b>9,2</b>
SD	1,7	2,7	4,3	3,6	3,2	2,8	1,8	2,2
n	15	15	15	14	14	15	15	14

**Tab. 8.18:** Verhältnis CD4<sup>+</sup>-T-Zellen/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen

	Milz				MLK			
	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN
	5,79	3,75	2,44	11,18	3,82	4,83	6,12	7,99
	8,80	4,63	2,54	7,41	4,79	5,15	3,99	2,91
	8,46	6,91	5,67	5,17	5,34	3,20	6,84	6,40
	8,42	6,14	4,25	6,87	3,26	6,38	3,77	5,66
	8,77	6,99	3,09	5,17	5,98	4,80	5,17	5,37
	6,69	3,41	9,41	6,05	5,94	5,13	6,81	5,28
	7,79	6,53	7,07	4,71	6,40	2,90	7,04	4,55
	5,66	4,16	6,42	5,10	6,07	2,96	6,50	6,10
	5,28	4,45	8,74	5,99	7,93	3,03	4,95	5,74
	15,52	7,33	5,01	7,17	5,25	4,60	5,59	7,91
	5,55	5,90	6,19	4,61	2,96	5,91	6,40	5,93
	5,45	8,57	8,18	1,98	7,58	4,92	7,49	7,16
	10,69	11,60	10,12	8,33	2,98	6,09	6,67	6,06
	6,12	5,33	5,23	7,13	3,29	6,66	5,38	6,01
	5,17		5,22			5,53	6,31	
<b>MW</b>	<b>7,61</b>	<b>6,12</b>	<b>5,97</b>	<b>6,21</b>	<b>5,11</b>	<b>4,81</b>	<b>5,94</b>	<b>5,93</b>
SD	2,76	2,18	2,40	2,13	1,66	1,26	1,10	1,30
n	15	14	15	14	14	15	15	14

## 8.2.2 Phagozytoseaktivität

Tab. 8.19: Anteil phagozytischer Zellen in der Milz (in %) sowie MF der aktiven Zellen

	Granulozyten								Monozyten							
	KON		PRO		PRÄ		SYN		KON		PRO		PRÄ		SYN	
	%	MF	%	MF	%	MF	%	MF	%	MF	%	MF	%	MF	%	MF
	44,5	26,1	27,1	25,4	34,2	28,0	19,7	24,7	27,6	31,8	21,5	28,5	20,3	29,0	20,1	29,9
	25,6	26,8	28,9	27,9	28,3	26,8	40,9	31,4	20,8	25,0	26,0	30,0	17,7	29,8	18,4	33,3
	26,3	27,1	33,5	24,6	39,7	23,7	34,8	30,3	23,1	26,9	18,1	23,1	22,5	30,1	19,2	35,5
	35,6	45,7	37,0	37,0	48,9	39,4	39,2	26,7	29,8	43,1	21,1	41,3	25,2	38,6	13,2	28,3
	27,8	31,4	35,3	38,5	33,5	31,7	34,1	26,9	20,3	33,5	19,4	38,7	16,0	34,7	11,9	30,9
	25,3	28,7	47,6	32,6	36,4	30,1	32,5	28,6	14,9	29,4	23,6	37,4	18,4	30,7	13,9	32,8
	31,6	35,3	28,3	29,5	27,6	27,4	36,9	27,9	22,3	32,8	15,9	29,9	16,0	27,5	16,3	28,7
	27,5	38,2	33,7	29,9	31,5	30,7	28,1	32,7	17,5	39,0	23,6	31,7	14,5	30,9	14,3	41,9
	30,7	37,4	28,1	27,1	24,1	37,3	36,7	22,3	19,3	39,3	13,0	29,8	17,9	36,4	11,7	24,4
	39,9	41,3	31,5	37,4	41,9	41,0	24,1	25,9	31,1	44,0	18,8	35,8	25,7	38,3	17,9	26,8
	30,7	30,2	24,7	34,7	35,5	29,7	29,5	23,9	26,4	32,1	12,1	35,1	23,7	29,1	18,9	23,7
	36,3	30,7	32,8	25,3	29,3	28,2	28,0	34,3	19,7	27,7	22,2	22,1	19,1	26,8	14,7	35,1
	37,2	36,2	32,8	26,4	21,6	24,3	39,3	46,4	22,6	39,7	22,0	25,6	16,3	23,9	30,6	37,0
	44,8	39,3	46,7	40,4	34,7	37,4	34,8	39,1	26,3	37,6	23,9	34,6	21,3	38,4	19,5	34,9
	45,3	35,6			34,2		36,8	30,5	24,5	33,7					26,3	28,9
<b>MW</b>	<b>33,9</b>	<b>34,0</b>	<b>33,4</b>	<b>31,2</b>	<b>33,4</b>	<b>31,1</b>	<b>33,0</b>	<b>30,1</b>	<b>23,1</b>	<b>34,4</b>	<b>20,1</b>	<b>31,7</b>	<b>19,6</b>	<b>31,7</b>	<b>17,8</b>	<b>31,5</b>
<b>SD</b>	7,2	5,8	6,7	5,5	7,2	5,5	6,0	6,3	4,6	5,9	4,1	5,8	3,6	4,7	5,2	5,0
<b>n</b>	15	15	14	14	14	14	15	15	15	15	14	14	14	14	15	15

## 8.2.3 Aktivität der natürlichen Killerzellen

Tab. 8.20: NK-Aktivität der Immunzellen aus Milz, MLK und PP (spezifische Aktivität in %)

	Milz				MLK				PP			
	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN
	22,9	13,8	23,4	18,8	17,5	20,3	14,5	27,0	29,5	20,5	26,1	36,06
	13,1	13,0	14,2	11,2	15,3	18,0	22,2	18,5	30,1	27,8	45,5	34,46
	11,8	14,5	21,2	17,2	15,6	21,4	19,3	17,8	28,0	26,3	50,2	39,49
	12,2	12,9	8,8	21,4	31,8	21,5	27,3	26,7	31,6	47,8	49,5	50,68
	12,8	14,8	21,8	27,1	21,1	29,2	31,8	32,2	42,2	42,1	30,9	51,25
	16,3	12,4	15,5	28,5	27,8	15,6	21,1	23,3	42,6	40,6	44,0	46,07
	25,8	22,2	21,6	30,1	21,9	22,6	22,7	26,8	27,3	31,7	37,4	45,08
	24,3	23,5	24,2	27,5	37,4	25,9	33,9	36,1	33,5	36,3	30,8	29,93
	21,6	27,7	28,1	39,5	28,0	30,8	25,1	24,2	24,9	31,7	32,8	43,54
	24,9	29,6	28,0	38,5	23,7	31,2	34,9	26,1	30,0	30,0	32,5	45,55
	34,8	28,1	32,0	34,7	32,4	26,9	34,0	31,0	29,3	33,5	41,3	41,53
	40,6	46,0	33,0	23,1	26,4	26,7	31,0	28,4	33,1	41,4	40,9	41,84
	17,5	33,1	40,0	26,8	39,9	22,8	26,8	25,3	39,3	33,0	39,1	45,16
	25,6	33,7	31,4	23,3	34,6	23,8	33,0	29,6	25,7			42,06
	21,6	18,4	25,9	49,6		45,4	31,4					
<b>MW</b>	<b>21,7</b>	<b>22,9</b>	<b>24,6</b>	<b>27,8</b>	<b>26,7</b>	<b>25,5</b>	<b>27,3</b>	<b>26,7</b>	<b>31,9</b>	<b>34,1</b>	<b>38,5</b>	<b>42,3</b>
<b>SD</b>	8,3	10,0	8,0	9,8	7,9	7,1	6,3	4,9	5,7	7,5	7,6	5,9
<b>n</b>	15	15	15	15	14	15	15	14	14	13	13	14

## 8.2.4 Proliferation

**Tab. 8.21:** Proliferation der Immunzellen aus Milz, MLK und PP (OD der Enzym-Farb-Reaktion)

	Milz				MLK				PP			
	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN
	1,94	1,16	0,05	0,02	0,55	0,22	2,23	2,25	1,54	0,74	0,96	1,63
	1,17	1,78	1,24	1,09	0,93	0,75	0,62	0,10	0,61	1,14	2,05	0,30
	1,16	1,89	1,13	1,54	0,56	0,96	2,08	1,13	1,19	1,52	1,37	0,02
	1,22	1,05	1,42	0,78	0,10	0,95	0,73	0,90	1,89	1,12	1,18	0,36
	1,75	1,20	0,30	1,02	1,00	0,49	1,14	0,95	1,33	1,30	1,44	0,09
	1,43	1,34	1,26	1,19	0,61	0,67	1,39	0,36	0,95	1,26	1,73	0,03
	1,57	1,08	1,42	1,76	0,39	0,31	0,70	0,00	0,84	0,99	0,98	0,41
	1,38	1,21	1,47	1,67	0,43	0,32	1,60	1,38	0,94	1,42	0,69	0,63
	1,87	0,98	2,09	0,04	1,42	0,10	2,09	0,94	1,70	0,80	1,83	0,97
	2,00	2,20	2,55	0,90	0,60	1,85	0,90	0,89	2,04	1,63	1,32	0,74
	0,96	1,75	0,88	0,72	0,65	2,23	1,36	0,47	1,87	1,65	1,42	0,38
	0,60	0,17	0,99	1,64	0,67	1,72	0,70	1,21	1,71	1,28	1,11	1,03
	1,29	0,34	1,00	1,40	0,02	0,95	0,52	0,59	1,78	1,35	0,56	0,76
	1,65	0,14	1,14	0,00	1,18	1,20	0,61	1,67	1,75			0,57
	1,60	1,12	1,37	0,03		0,09	0,26					0,87
<b>MW</b>	<b>1,44</b>	<b>1,16</b>	<b>1,22</b>	<b>0,92</b>	<b>0,65</b>	<b>0,85</b>	<b>1,13</b>	<b>0,92</b>	<b>1,44</b>	<b>1,25</b>	<b>1,28</b>	<b>0,59</b>
<b>SD</b>	<b>0,39</b>	<b>0,61</b>	<b>0,61</b>	<b>0,64</b>	<b>0,38</b>	<b>0,66</b>	<b>0,63</b>	<b>0,61</b>	<b>0,46</b>	<b>0,29</b>	<b>0,43</b>	<b>0,44</b>
<b>n</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>15</b>

## 8.2.5 Interleukin-10

**Tab. 8.22:** IL-10-Sekretion der Immunzellen aus Milz, MLK und PP (pg/ml)

	Milz				MLK				PP			
	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN
	469	551	762	500	188	112	201	253	241	316	307	309
	562	802	523	424	120	137	225	114	0	343	272	118
	581	814	775	588	125	177	201	212	203	275	502	117
	690	551	651	689	133	148	114	252	305	186	321	289
	598	636	652	622	129	135	168	155	240	284	335	487
	800	629	469	744	127	88	154	195	162	271	230	333
	914	927	701	1296	147	149	230	45	110	289	257	240
	711	730	493	671	91	131	113	107	135	239	321	253
	652	856	744	478	123	94	136	216	240	207	234	170
	692	577	1096	673	183	77	154	180	243	255	278	512
	1016	761	606	915	111	119	242	119	329	226	557	627
	624	1036	703	717	143	144	223	136	179	416	308	292
	743	925	902	779	65	222	209	138	183	237	461	356
	612	719	506	12	220	159	128	200	119	161	327	285
	640	703	578	575		184	178		270	201	252	469
<b>MW</b>	<b>687</b>	<b>748</b>	<b>677</b>	<b>646</b>	<b>136</b>	<b>138</b>	<b>178</b>	<b>166</b>	<b>197</b>	<b>260</b>	<b>331</b>	<b>324</b>
<b>SD</b>	<b>139</b>	<b>147</b>	<b>168</b>	<b>272</b>	<b>40</b>	<b>38</b>	<b>44</b>	<b>60</b>	<b>85</b>	<b>65</b>	<b>99</b>	<b>147</b>
<b>n</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>

## 8.2.6 Interferon- $\gamma$

**Tab. 8.23:** IFN- $\gamma$ -Sekretion der Immunzellen aus Milz, MLK und PP (pg/ml)

	Milz				MLK				PP			
	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN
	55	0	55	0	12	21	0	0	1729	2718	2100	2550
	0	104	0	0	0	176	2	0	2034	1435	4126	3030
	0	31	14	0	0	26	21	0	2410	3334	2084	951
	0	0	0	17	0	1	0	0	1236	2792	2274	1546
	0	58	0	0	0	74	0	0	1742	2034	1327	1151
	0	23	0	0	0	3	0	0	135	1737	1625	451
	5	23	67	5	2	0	110	0	257	1028	1514	3502
	46	0	0	130	92	0	2	278	1792	925	3614	2660
	238	0	27	66	50	0	5	59	1407	3320	2194	1867
	111	56	93	8	0	38	20	0	3434	800	2646	1699
	128	44	2	0	0	80	0	0	912	1406	1605	1755
	131	83	0	0	0	103	0	0	1025	1226	1948	3122
	0	11	11	1	0	0	56	0	887	1001		2176
	0	26	13	2	0	0	0	0	2368			2420
	5	71	8			50	0					
<b>MW</b>	<b>48</b>	<b>35</b>	<b>19</b>	<b>16</b>	<b>11</b>	<b>38</b>	<b>14</b>	<b>24</b>	<b>1526</b>	<b>1827</b>	<b>2255</b>	<b>2063</b>
<b>SD</b>	<b>72</b>	<b>33</b>	<b>29</b>	<b>37</b>	<b>27</b>	<b>51</b>	<b>30</b>	<b>75</b>	<b>887</b>	<b>920</b>	<b>846</b>	<b>880</b>
<b>n</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>14</b>

## 8.3 Tierstudie 2 B

### 8.3.1 Lymphozytensubpopulationen

**Tab. 8.24:** Anteil CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (in %)

	Milz				MLK			
	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN
	49,6	48,1	33,8	49,6	50,7	46,9	57,2	51,1
	49,8	41,4	47,8	53,0	48,5	48,0	52,1	56,4
	55,6	48,5	39,1	49,1	56,2	52,4	53,4	50,2
	50,6	51,3	57,9	48,6	55,1	53,3	46,8	
			46,6				59,3	
<b>MW</b>	<b>51,4</b>	<b>47,3</b>	<b>45,0</b>	<b>50,1</b>	<b>52,6</b>	<b>50,2</b>	<b>53,8</b>	<b>52,6</b>
<b>SD</b>	<b>2,8</b>	<b>4,2</b>	<b>9,2</b>	<b>2,5</b>	<b>3,6</b>	<b>3,2</b>	<b>4,9</b>	<b>3,3</b>
<b>n</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>3</b>

**Tab. 8.25:** Anteil CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (in %)

	Milz				MLK			
	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN
	3,1	3,5	7,0	3,7	4,7	7,7	8,1	5,0
	3,3	3,7	5,1	4,9	4,8	9,1	7,0	8,7
	4,7	5,2	4,6	5,3	8,7	7,1	6,8	7,0
	4,6	7,1	7,2	8,6	7,5	6,6	5,7	
			5,3	5,5			7,4	
<b>MW</b>	<b>3,9</b>	<b>4,9</b>	<b>5,8</b>	<b>5,6</b>	<b>6,4</b>	<b>7,6</b>	<b>7,0</b>	<b>6,9</b>
<b>SD</b>	<b>0,8</b>	<b>1,7</b>	<b>1,2</b>	<b>1,8</b>	<b>2,0</b>	<b>1,1</b>	<b>0,9</b>	<b>1,8</b>
<b>n</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>3</b>

**Tab. 8.26:** Verhältnis CD4<sup>+</sup>-T-Zellen/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen

	Milz				MLK			
	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN
	10,98	11,22	8,82	5,73	7,36	5,27	7,05	6,51
	11,95	9,34	8,03	8,91	6,44	7,41	7,99	7,21
	15,23	7,24	8,51	10,89	10,17	8,04	8,19	10,21
	15,80	13,77	9,32	13,45	10,69	6,10	7,89	
			4,81				7,40	
<b>MW</b>	<b>13,49</b>	<b>10,39</b>	<b>7,90</b>	<b>9,75</b>	<b>8,67</b>	<b>6,71</b>	<b>7,70</b>	<b>7,98</b>
SD	2,38	2,78	1,79	3,26	2,08	1,25	0,47	1,97
n	4	4	5	4	4	4	5	3

### 8.3.2 Phagozytoseaktivität

**Tab. 8.27:** Anteil phagozytischer Zellen in der Milz (in %) sowie MF der aktiven Zellen

	Granulozyten								Monozyten							
	KON		PRO		PRÄ		SYN		KON		PRO		PRÄ		SYN	
	%	MF	%	MF	%	MF	%	MF	%	MF	%	MF	%	MF	%	MF
	32,6	27,4	35,5	28,4	17,1	22,0	26,4	29,1	21,8	30,5	22,3	34,3	10,8	24,6	15,7	31,2
	31,1	28,6	27,6	31,0	33,7	30,6	27,1	27,6	21,7	34,4	18,6	34,4	21,3	30,2	15,9	31,7
	29,6	33,4	26,2	33,8	28,8	26,2	32,8	29,4	19,1	34,1	18,7	29,4	21,0	31,3	21,5	33,4
	26,8	25,0	21,9	27,4	17,7	25,4	23,2	33,3	19,3	37,7	16,7	25,7	12,0	25,9	17,3	27,7
					18,4	28,4	24,0	27,1					9,0	28,7	10,9	26,4
<b>MW</b>	<b>30,0</b>	<b>28,6</b>	<b>27,8</b>	<b>30,2</b>	<b>23,2</b>	<b>26,5</b>	<b>26,7</b>	<b>29,3</b>	<b>20,5</b>	<b>34,2</b>	<b>19,1</b>	<b>31,0</b>	<b>14,8</b>	<b>28,1</b>	<b>16,3</b>	<b>30,1</b>
SD	2,5	3,5	5,7	2,9	7,6	3,2	3,8	2,4	1,5	2,9	2,3	4,2	5,9	2,8	3,8	2,9
n	4	4	4	4	5	5	5	5	4	4	4	4	5	5	5	5

### 8.3.3 Aktivität der natürlichen Killerzellen

**Tab. 8.28:** NK-Aktivität der Immunzellen aus Milz, MLK und PP (spezifische Aktivität in %)

	Milz				MLK				PP			
	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN
	30,4	36,5	55,5	31,1	23,6	34,0	37,2	35,5	40,9	42,9	33,4	51,9
	28,6	39,1	48,3	36,1	27,4	44,7	29,4	42,1	41,4	49,5	35,6	51,6
	27,4	40,1	41,7	36,5	35,0	34,8	31,8	25,0	36,8	50,6	43,7	33,9
	35,9	40,3	33,0	32,0	30,0	31,3	24,9	27,5	38,0	42,8	38,1	41,7
			34,1	30,4			26,5				41,4	
<b>MW</b>	<b>30,6</b>	<b>39,0</b>	<b>42,5</b>	<b>33,2</b>	<b>29,0</b>	<b>36,2</b>	<b>29,9</b>	<b>32,5</b>	<b>39,3</b>	<b>46,5</b>	<b>38,5</b>	<b>44,8</b>
SD	3,8	1,8	9,5	2,9	4,8	5,9	4,9	7,8	2,2	4,2	4,2	8,7
n	4	4	5	5	4	4	5	4	4	4	5	4



### 8.3.4 Proliferation

**Tab. 8.29:** Proliferation der Immunzellen aus Milz, MLK und PP (OD der Enzym-Farb-Reaktion)

	Milz				MLK				PP			
	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN
	2,22	1,92	1,22	2,03	0,68	0,24	1,11	1,43	0,66	0,24	1,02	0,22
	1,68	1,82	1,86	1,73	0,58	0,09	1,55	0,68	1,43	0,51	0,67	0,26
	0,95	0,26	1,84	1,56	0,08	0,36	1,29	1,42	0,92	2,20	0,80	0,50
	0,61	0,33	1,11	0,47	0,80	1,03	1,07	0,41	2,09	1,70	1,28	1,36
			1,13	1,91			0,70				1,60	
<b>MW</b>	<b>1,37</b>	<b>1,08</b>	<b>1,43</b>	<b>1,54</b>	<b>0,54</b>	<b>0,43</b>	<b>1,14</b>	<b>0,99</b>	<b>1,28</b>	<b>1,16</b>	<b>1,07</b>	<b>0,59</b>
<b>SD</b>	0,72	0,91	0,38	0,62	0,32	0,41	0,31	0,52	0,63	0,94	0,37	0,53
<b>n</b>	4	4	5	5	4	4	5	4	4	4	5	4

### 8.3.5 Interleukin-10

**Tab. 8.30:** IL-10-Sekretion der Immunzellen aus Milz, MLK und PP (pg/ml)

	Milz				MLK				PP			
	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN
	694	842	700	616	88	73	122	219	191	52	237	316
	791	792	1776	769	74	57	130	129	282	217	234	222
	477	481	973	894	62	51	145	121	317	192	382	376
	409	461	578	551	110	96	188	89	291	418	298	317
			752	782			134				334	
<b>MW</b>	<b>592</b>	<b>644</b>	<b>956</b>	<b>722</b>	<b>83</b>	<b>69</b>	<b>144</b>	<b>140</b>	<b>270</b>	<b>220</b>	<b>297</b>	<b>308</b>
<b>SD</b>	180	201	480	138	21	20	26	56	55	151	64	64
<b>n</b>	4	4	5	5	4	4	5	4	4	4	5	4

### 8.3.6 Interferon- $\gamma$

**Tab. 8.31:** IFN- $\gamma$ -Sekretion der Immunzellen aus Milz, MLK und PP (pg/ml)

	Milz				MLK				PP			
	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN	KON	PRO	PRÄ	SYN
	73	109	25	25	0	0	0	0	3306	698	2558	831
	63	45	91	41	0	0	54	0	2156	1375	1850	1239
	5	0	13	35	0	0	0	0	1748	2300	3120	1305
	55	15	0	28	34	0	17	34	1724	1869	1525	1682
				32			0				1758	
<b>MW</b>	<b>49</b>	<b>42</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>9</b>	<b>0</b>	<b>14</b>	<b>9</b>	<b>2234</b>	<b>1561</b>	<b>2162</b>	<b>1264</b>
<b>SD</b>	30	48	40	6	17	0	24	17	742	688	660	349
<b>n</b>	4	4	4	5	4	4	5	4	4	4	5	4

## 8.4 Humanstudie

### 8.4.1 Phagozytoseaktivität

Tab. 8.32: Anteil phagozytierender Zellen (in %) der Krebspatienten

	Granulozyten						Monozyten					
	KON			SYN			KON			SYN		
	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3
	53,1	31,9	56,3		25,4	72,1	9,8	18,9	18,4		7,1	23,8
	18,3	38,0	49,0	46,0	5,6	66,8	9,6	15,9	11,6	9,0	3,2	15,6
	53,2	1,6	30,6	25,0	38,2	57,7	35,4	0,0	9,3	12,5	15,5	15,0
	91,0	50,9	38,9	26,0	31,9	46,8	39,7	24,0	8,5	6,7	21,8	20,3
	75,1	78,5	56,0	50,3	0,6	39,9	39,4	30,9	24,7	18,2	0,0	9,6
	41,9	54,7	29,5	53,1	0,7	39,9	21,9	20,4	21,9	17,9	0,6	16,0
	57,3	31,0	19,8	65,8	71,9	56,1	20,6	16,1	13,9	25,1	31,3	25,3
	16,6	36,0	62,5	52,8	35,1	31,9	8,9	5,2	39,5	25,5	18,0	22,4
	39,2	38,9	15,6	61,6	52,6	15,2	17,2	12,2	8,6	17,7	20,4	8,4
	47,1	21,3	25,4	66,7	49,4	15,4	13,7	9,3	21,1	31,4	17,9	8,8
	58,9	39,8	27,2	34,8	33,0	50,9	26,7	20,9	14,4	9,3	19,2	28,8
	47,5	36,9	73,5	30,9	27,1	37,6	19,4	24,1	44,0	20,9	21,2	25,7
	42,7	20,2		59,8	44,0		27,1	13,5		26,7	15,9	
		35,0	43,2	27,2	43,4			14,5	25,2	12,2	16,7	
		50,1	74,3	32,8	21,8			17,8	26,7	31,1	9,3	
				33,8	50,7	46,1				9,6	19,9	19,2
				69,8		39,2				38,4		10,4
					48,6	82,7					18,4	33,7
				71,7	46,3	64,3				43,9	14,3	24,0
<b>MW</b>	<b>49,4</b>	<b>37,7</b>	<b>43,0</b>	<b>47,5</b>	<b>34,8</b>	<b>47,7</b>	<b>22,3</b>	<b>16,2</b>	<b>20,6</b>	<b>20,9</b>	<b>15,0</b>	<b>19,2</b>
<b>SD</b>	<b>20,1</b>	<b>17,4</b>	<b>19,4</b>	<b>16,6</b>	<b>19,0</b>	<b>18,8</b>	<b>10,9</b>	<b>7,8</b>	<b>11,0</b>	<b>10,9</b>	<b>8,1</b>	<b>7,6</b>
<b>n</b>	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>16</b>	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>16</b>

Tab. 8.33: Anteil phagozytierender Zellen (in %) der Patienten mit Polypen

	Granulozyten						Monozyten					
	KON			SYN			KON			SYN		
	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3
	21,7	32,8	26,3	23,7	42,0	23,8	6,5	15,6	19,7	8,8	16,4	12,9
	47,1	39,5	36,0	20,1	36,5	20,2	22,7	19,1	15,3	12,7	8,9	11,8
	52,7	8,4	61,6	34,0	37,5	22,4	15,1	1,4	17,7	7,7	18,9	10,7
	37,9	10,9	57,8	35,7	16,1	18,8	17,1	8,0	22,5	25,6	6,6	11,3
	23,8	51,1	41,7	34,9	9,5	56,3	18,2	32,6	17,9	14,4	9,0	29,9
	31,6	58,5		30,7	44,2	38,9	21,1	29,5		17,7	34,7	24,4
	37,6	58,3		63,4	60,2		20,0	21,5		25,9	19,3	
	63,4	37,4	30,4	15,1	21,1	38,4	36,9	23,4	6,3	8,8	18,5	7,1
	9,8	12,1	13,8	64,4	60,9		8,1	12,2	5,1	21,1	43,3	
	10,3	14,4	18,8	55,5	67,1		4,6	9,0	3,1	29,3	28,9	
	40,7	27,5	40,4	58,4	52,0	77,7	20,6	18,8	8,8	14,1	25,6	23,3
	43,3	27,7	67,8	29,2	34,7	31,5	21,7	16,8	25,6	27,3	28,1	3,5
	30,0	41,2	58,1	17,6	35,9	51,7	13,0	24,2	24,6	16,7	9,0	16,1
	28,0	58,7	45,3	77,5	37,0	55,4	19,9	24,8	17,5	43,5	1,7	7,7
	10,3	30,3	30,3	52,7	27,4	75,4	7,7	16,9	18,4	13,6	3,2	21,7
	18,1		66,1	16,1		70,7	5,2		21,7	10,3		21,4
	60,3		16,9	17,5		61,7	32,0		6,7	11,2		33,3
	40,2	47,1	71,6	63,6		18,5	22,4	9,7	37,0	31,7		14,0
		53,2	69,3	59,6	51,4	77,7		25,1	32,0	16,9	29,0	26,7
	49,4	29,6	75,2				8,9	22,9	21,1			
	42,0	80,0	50,0				9,2	23,0	18,8			
<b>MW</b>	<b>34,9</b>	<b>37,8</b>	<b>46,2</b>	<b>40,5</b>	<b>39,6</b>	<b>46,2</b>	<b>16,5</b>	<b>18,6</b>	<b>17,9</b>	<b>18,8</b>	<b>18,8</b>	<b>17,2</b>
<b>SD</b>	<b>15,9</b>	<b>19,4</b>	<b>19,9</b>	<b>20,2</b>	<b>16,2</b>	<b>22,3</b>	<b>8,8</b>	<b>7,9</b>	<b>9,0</b>	<b>9,5</b>	<b>12,0</b>	<b>8,8</b>
<b>n</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>16</b>	<b>16</b>

**Tab. 8.34:** MF der aktiven Zellen der Krebspatienten

	Granulozyten						Monozyten					
	KON			SYN			KON			SYN		
	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3
	17,0	20,1	23,3		14,8	29,2	112,0	46,4	15,9		101,1	27,2
	21,4	16,3	16,1	16,4	18,2	29,1	14,1	19,3	17,9	17,1	11,2	24,2
	23,9	5,5	15,5	20,3	20,6	17,6	25,9	0,0	17,9	13,6	16,9	11,9
	51,8	16,2	22,3	20,0	18,4	15,5	51,4	13,8	18,7	16,2	22,3	10,7
	36,2	17,5	36,7	21,7	5,5	13,3	28,3	15,3	27,3	46,7	0,0	16,1
	15,5	16,3	12,9	24,6	5,0	13,1	13,9	15,3	15,7	21,9	6,8	12,3
	18,8	11,6	16,5	31,3	15,4	36,8	12,6	14,0	32,1	21,0	15,2	22,1
	5,9	12,9	23,9	20,5	12,3	19,5	4,0	10,1	22,4	15,2	11,3	15,7
	13,5	23,2	18,5	15,3	22,2	15,3	12,8	18,5	13,3	14,1	17,2	14,3
	15,7	20,9	23,4	15,6	27,3	21,1	12,4	14,5	15,3	14,8	20,2	18,5
	26,7	21,1	20,5	22,2	26,5	23,4	21,0	19,5	15,3	19,6	21,0	14,6
	22,7	18,4	44,1	22,2	21,3	22,6	21,3	16,0	29,4	18,0	20,3	19,7
	25,7	13,2		22,6	18,0		35,8	11,6		12,7	13,3	
		9,2	24,5	20,5	19,9			11,0	18,0	23,7	14,4	
		41,3	59,6	23,8	21,2			22,0	32,1	22,7	17,9	
				20,6	15,6	25,4				15,9	17,2	14,9
				34,0		34,8				29,4		37,9
					10,5	39,5					11,3	17,5
				31,1	8,6	35,1				42,2	13,3	12,9
<b>MW</b>	<b>22,7</b>	<b>17,6</b>	<b>25,6</b>	<b>22,5</b>	<b>16,7</b>	<b>24,5</b>	<b>28,1</b>	<b>16,5</b>	<b>20,8</b>	<b>21,5</b>	<b>19,5</b>	<b>18,2</b>
<b>SD</b>	<b>11,4</b>	<b>8,1</b>	<b>12,9</b>	<b>5,3</b>	<b>6,4</b>	<b>8,8</b>	<b>28,1</b>	<b>9,8</b>	<b>6,6</b>	<b>9,7</b>	<b>21,1</b>	<b>7,0</b>
<b>n</b>	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>16</b>	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>16</b>

**Tab. 8.35:** MF der aktiven Zellen der Patienten mit Polypen

	Granulozyten						Monozyten					
	KON			SYN			KON			SYN		
	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3
	11,8	21,7	20,5	12,3	24,1	21,7	9,3	20,3	22,9	13,8	17,8	18,5
	21,3	18,3	19,2	18,4	21,4	20,2	23,7	16,6	29,9	15,3	20,7	25,9
	25,4	17,7	26,4	21,4	17,2	19,4	18,3	23,8	18,7	24,5	17,2	44,1
	22,9	16,1	24,3	20,3	15,5	20,9	21,1	14,9	42,5	19,0	14,7	17,2
	24,0	20,3	21,8	23,7	15,2	25,0	20,4	14,8	21,5	17,1	14,8	18,4
	21,2	21,8		17,7	17,3	24,3	18,9	17,8		12,8	16,6	17,0
	21,2	23,6		29,1	24,4		18,3	18,4		38,0	18,8	
	25,2	18,0	10,0	15,2	15,3	11,9	20,3	26,7	9,9	15,3	11,5	10,0
	16,4	13,3	8,2	29,2	35,5		12,7	14,9	12,6	24,8	26,0	
	14,8	14,1	9,8	26,8	35,0		16,6	11,0	15,4	16,0	32,8	
	21,7	19,0	9,0	22,4	15,7	40,9	14,8	20,8	11,9	19,2	17,2	21,4
	19,1	16,6	14,4	20,7	11,9	8,3	30,3	26,0	13,9	18,9	15,4	9,4
	20,5	14,5	30,4	18,4	10,7	9,6	19,6	14,8	17,9	17,6	16,7	11,1
	19,8	14,7	24,9	27,2	13,3	10,3	18,2	15,3	16,8	20,6	10,7	9,1
	18,1	10,6	20,7	20,4	10,8	37,1	16,9	11,8	14,3	93,6	9,9	22,2
	19,4		24,8	18,1		20,8	15,2		58,8	15,8		22,2
	31,1		34,1	18,5		32,6	26,4		23,7	21,1		75,9
	23,7	9,3	37,1	37,2		34,5	21,7	13,0	20,0	26,6		30,2
		12,1	35,0	12,4	43,8	60,7		12,5	24,0	17,4	40,8	45,8
	10,9	16,1	53,7				13,9	13,7	43,2			
	8,7	37,7	38,9				17,0	15,3	38,0			
<b>MW</b>	<b>19,9</b>	<b>17,7</b>	<b>24,4</b>	<b>21,5</b>	<b>20,4</b>	<b>24,9</b>	<b>18,7</b>	<b>17,0</b>	<b>24,0</b>	<b>23,5</b>	<b>18,9</b>	<b>24,9</b>
<b>SD</b>	<b>5,4</b>	<b>6,2</b>	<b>11,9</b>	<b>6,2</b>	<b>9,8</b>	<b>13,7</b>	<b>4,7</b>	<b>4,6</b>	<b>13,0</b>	<b>17,9</b>	<b>8,1</b>	<b>17,5</b>
<b>n</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>16</b>	<b>16</b>

## 8.4.2 Oxidativer Burst

**Tab. 8.36:** Anteil aktiver Granulozyten (in %) und deren MF der Krebspatienten

	aktive Granulozyten						MF der aktiven Granulozyten					
	KON			SYN			KON			SYN		
	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3
	98,0	98,8	91,7		93,6	93,6	19,1	25,4	28,3		13,8	30,5
	78,4	90,1	90,4	96,7	96,4	90,3	13,4	13,4	23,1	19,1	21,4	27,7
	93,0		80,6	71,9	89,2	91,8	11,2		10,5	19,5	17,1	25,3
	84,6	92,6	94,3	74,9	97,0	90,0	18,5	11,9	13,1	19,3	17,1	22,6
	71,3	95,5	92,1	93,4		88,0	18,8	16,0	16,4	13,4		18,1
	81,0	84,8	77,9	93,2	82,1	87,2	15,4	25,9	19,1	12,3	14,9	13,8
	89,5	91,4	89,3	71,7	87,5	89,4	15,2	24,8	14,8	17,7	14,3	18,4
	94,3	89,2	90,5	82,8	86,0	92,5	12,4	11,4	12,7	12,1	25,2	15,3
	97,0	95,1	95,8	95,6	94,6	93,8	11,5	13,9	19,0	15,5	16,2	15,6
	85,9	94,9	91,4	92,1	88,2	92,5	11,0	15,6	16,7	16,1	19,9	17,6
	83,9	83,4	91,4	90,5	92,3	87,8	13,8	13,7	17,1	15,4	15,3	16,5
	83,2	88,3		86,3	92,1	91,5	14,4	19,0		14,0	22,7	21,6
	90,5	94,4	95,9	82,5	77,5		19,8	17,3	20,8	22,4	14,8	
		94,5	92,5	93,6	95,2			19,2	44,0	21,7	21,9	
	93,2	83,6	87,1	85,6	95,0	94,5	24,0	54,7	39,7	17,1	14,9	20,4
				90,3	82,6	90,4				17,5	16,0	32,5
				90,7	84,7	94,4				11,9	15,9	35,1
					90,9	93,6					14,3	45,3
					86,0	88,3					68,5	47,4
<b>MW</b>	<b>87,4</b>	<b>91,2</b>	<b>90,1</b>	<b>87,0</b>	<b>89,5</b>	<b>91,2</b>	<b>15,6</b>	<b>20,2</b>	<b>21,1</b>	<b>16,6</b>	<b>20,2</b>	<b>24,9</b>
<b>SD</b>	<b>7,6</b>	<b>4,8</b>	<b>5,2</b>	<b>8,2</b>	<b>5,6</b>	<b>2,4</b>	<b>3,9</b>	<b>11,1</b>	<b>9,9</b>	<b>3,3</b>	<b>12,5</b>	<b>10,2</b>
<b>n</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>17</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>17</b>

**Tab. 8.37:** Anteil aktiver Granulozyten (in %) und deren MF der Patienten mit Polypen

	aktive Granulozyten						MF der aktiven Granulozyten					
	KON			SYN			KON			SYN		
	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3
	91,7	91,8	92,5	84,8	94,4	93,2	16,7	19,4	18,0	18,4	18,4	17,9
	89,8	90,8	94,1	89,2	84,7	86,0	13,1	17,0	17,8	14,4	11,8	13,4
	93,5	94,5	86,1	88,5	90,3	49,2	20,6	21,1	15,3	9,1	12,4	11,5
	90,9	86,7	87,6	93,3	96,0	83,7	22,4	19,1	16,7	19,2	19,3	19,2
	86,8	91,7	91,3	92,1	89,2	88,1	18,1	16,8	14,9	17,6	16,9	15,5
	79,3	74,5		94,6	96,0	90,2	20,3	16,1		15,0	15,3	14,5
	82,9	92,4		80,9	92,9		17,0	16,7		19,3	22,0	
	94,6	95,9	84,6	92,2	95,9	76,0	16,6	19,6	15,8	18,2	18,1	16,4
	90,0	97,9	85,6	87,5	93,0	93,9	16,8	16,1	13,7	19,1	21,6	16,3
	93,2	95,2	75,3	93,2	92,7	94,3	17,0	17,6	16,3	15,8	23,4	16,9
	91,0	82,0	89,2	91,7	88,0	91,6	21,7	14,2	69,8	15,7	12,7	33,9
	88,8	81,2	89,4	93,2		91,8	19,1	13,0	13,6	13,4		8,7
	90,1	90,7	88,1	89,8		82,7	25,6	16,4	31,2	12,8		7,2
	79,8	87,8	94,9	87,5		88,4	14,7	13,8	25,3	14,6		7,7
	82,0	93,7	91,2	92,4	75,4	93,2	17,0	23,1	34,9	14,2	16,0	31,2
	79,4	90,0	91,8	82,1	88,8	93,9	11,6	18,7	30,5	11,7	18,1	27,2
	82,7	87,5	92,6	91,1	87,9	93,5	12,1	18,9	39,1	13,5	18,8	18,8
	91,2	99,8	96,6	85,8	87,3	93,3	13,5	72,5	54,6	15,4	24,5	54,7
		88,1	94,2	92,7	95,9	89,0		12,0	54,7	15,9	43,2	35,0
	83,3	90,6	98,2				15,8	22,9	37,4			
	85,7	87,0	76,9				68,1	48,1	36,8			
<b>MW</b>	<b>87,3</b>	<b>90,0</b>	<b>89,5</b>	<b>89,6</b>	<b>90,5</b>	<b>87,3</b>	<b>19,9</b>	<b>21,6</b>	<b>29,3</b>	<b>15,4</b>	<b>19,5</b>	<b>20,3</b>
<b>SD</b>	<b>5,0</b>	<b>5,8</b>	<b>6,0</b>	<b>4,0</b>	<b>5,4</b>	<b>10,7</b>	<b>11,9</b>	<b>13,8</b>	<b>16,4</b>	<b>2,8</b>	<b>7,4</b>	<b>12,0</b>
<b>n</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>16</b>	<b>18</b>

### 8.4.3 Aktivität der natürlichen Killerzellen

Tab. 8.38: NK-Aktivität der PMBZ (spezifische Aktivität in %)

	Krebspatienten						Patienten mit Polypen					
	KON			SYN			KON			SYN		
	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3
	5,0	17,3		8,1		10,5	6,2			7,4	15,4	14,7
	12,0	10,7	14,5	6,5	7,9	7,4	6,4			7,5		12,7
	11,3		10,1	6,3	11,1	7,9			19,3		18,3	
	14,2		19,9	7,8	21,1				11,4		21,7	
	13,7			15,9	13,3	12,3		21,6				9,7
	6,2	6,8	8,3	8,2	8,1	11,3			19,4			
	7,8	13,4	8,2	10,6	14,1	5,9			26,3		23,9	12,2
	12,8	23,5	5,3			7,7						16,4
	25,7	26,9	10,4		10,5	6,4						20,3
		14,3	6,7	9,8		6,6						
	15,6		11,4	21,3			15,1		16,1	21,1		24,7
			25,4	23,0			25,6	16,2	22,6		25,2	25,1
			10,6			34,1	20,1	23,2	26,2		25,3	22,9
		21,8	38,4						21,9	26,9	14,2	23,8
	15,5	27,4	31,0			16,5		13,3	22,9	38,1	18,4	18,3
						14,5	34,7	26,5	25,6			16,6
				21,6	17,4			11,1	9,3			
				17,7	12,5	33,0		12,0	18,5		13,9	
				21,9	26,1	29,5	34,8	22,1	58,8	23,2	18,7	17,8
							13,3	15,8	14,2			
							18,7	16,7	19,5			
<b>MW</b>	<b>12,7</b>	<b>18,0</b>	<b>15,4</b>	<b>13,7</b>	<b>14,2</b>	<b>14,5</b>	<b>19,4</b>	<b>17,8</b>	<b>22,1</b>	<b>20,7</b>	<b>19,5</b>	<b>18,1</b>
<b>SD</b>	<b>5,6</b>	<b>7,3</b>	<b>10,3</b>	<b>6,6</b>	<b>5,8</b>	<b>10,1</b>	<b>10,7</b>	<b>5,2</b>	<b>11,3</b>	<b>11,8</b>	<b>4,3</b>	<b>5,0</b>
<b>n</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>14</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>6</b>	<b>10</b>	<b>13</b>

### 8.4.4 Interleukin-2

Tab. 8.39: IL-2-Sekretion der PMBZ (pg/ml)

	Krebspatienten						Patienten mit Polypen					
	KON			SYN			KON			SYN		
	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3
	266	426	154	906	101	129	20	87	119	32	211	204
	686	135	100	184	11	99	366	282	636	184	140	6
	82	50	119	287	75	320	79	198	300	219	318	5
	179	67	10	1021	262	489	5	140	587	4	99	89
	843	43	261	201	56	170	60	469	1248	39	41	157
	98	92	139	349	143	13	286	25	272	131	670	598
	80	58	153	75	45	111	167	113	589	250	151	308
	49	372	323	167	170	50	189	434	162	36	11	20
	60	150	62	30	112	92	96	31	162	261	206	269
	40	79	53	39	51	80	26	29	168	181	162	466
	271	56	172	3	212	5	192	132	548	248	11	145
	83	6	66	3	185	785	6	142	497	99	484	199
	415	226	135	348	21	925	172	26	395	22	127	24
	603	150	67	7	274	268	33	34	357	216	184	120
	140	326	158	176	114	107		3	212	38	21	2
				102	14	234	171	650	409	129	330	277
				185	165	82	298	225	301	87	2	155
				229	81	118	505	108	121	432	219	118
				154	101	128	630	20	265	299	218	89
							4	29	11	32	211	204
							50	34	46			
<b>MW</b>	<b>260</b>	<b>149</b>	<b>132</b>	<b>235</b>	<b>115</b>	<b>221</b>	<b>168</b>	<b>153</b>	<b>353</b>	<b>153</b>	<b>190</b>	<b>171</b>
<b>SD</b>	<b>259</b>	<b>130</b>	<b>81</b>	<b>279</b>	<b>79</b>	<b>252</b>	<b>174</b>	<b>174</b>	<b>276</b>	<b>116</b>	<b>170</b>	<b>160</b>
<b>n</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>21</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>

### 8.4.5 Interleukin-10

Tab. 8.40: IL-10-Sekretion der PMBZ (pg/ml)

	Krebspatienten						Patienten mit Polypen					
	KON			SYN			KON			SYN		
	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3
121	242	90	238	69	72	11	149	186	26	119	82	
114	51	63	100	89	14	225	204	307	29	283	142	
485	104	193	174	69	104	47	128	83	34	123	208	
223	5	79	109	141	168	2	101	83	2	47	314	
242	0	252	149	106	303	18	211	435	57	33	93	
79	260	619	381	89	0	597	102	214	70	133	61	
124	335	106	165	13	227	102	79	132	57	75	210	
110	244	64	85	250	58	146	166	17	16	10	0	
22	180	42	7	100	125	53	0	94	78	113	155	
4	137	74	0	149	77	0	164	0	82	447	0	
192	103	24	357	176	71	69	97	52	152	30	154	
114	0	78	279	64	105	148	149	133	48	173	140	
132	9	54	118	103	108	145	75	189	2	118	108	
48	131	253	66	377	231	42	44	147	259	190	137	
63	124	40	121	80	85		39	114	7	17	0	
			78	31	239	178	100	107	208	0	156	
			291	375	202	271	405	251	166	0	181	
			115	47	79	237	86	123	260	434	75	
			78	66	63	181	116	131	0	333	397	
						5	56	122				
						203	64	82				
<b>MW</b>	<b>138</b>	<b>128</b>	<b>135</b>	<b>153</b>	<b>126</b>	<b>123</b>	<b>134</b>	<b>121</b>	<b>143</b>	<b>82</b>	<b>141</b>	<b>138</b>
<b>SD</b>	117	106	152	109	103	83	140	85	99	85	140	101
<b>n</b>	15	15	15	19	19	19	20	21	21	19	19	19

### 8.4.6 Interleukin-12

Tab. 8.41: IL-12-Sekretion der PMBZ (pg/ml)

	Krebspatienten						Patienten mit Polypen					
	KON			SYN			KON			SYN		
	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3
2754	510	686	3144	209	1437	8	1066	934	25	2531	2334	
571	1118	461	1180	0	70	312	522	1262	161	596	990	
653	400	678	558	248	1235	2	1409	626	45	861	1006	
663	198	1032	1485	1004	1677	0	744	1394	0	1097	1219	
570	194	1668	278	421	686	209	482	83	177	189	358	
521	614	13	549	392	0	643	18	670	850	614	66	
503	766	985	853	1220	2052	490	566	705	514	384	334	
123	844	1292	731	1368	2	111	544	449	789	36	13	
470	1	566	112	847	1046	1311	18	1076	44	699	8	
352	2	1200	79	565	1188	398	663	1090	751	1098	6	
1499	479	25	347	727	22	5	2453	939	0	16	1184	
863	0	618	1326	1272	1506	5	1008	55	4	1639	684	
2399	1764	292	910	7	913	919	8	2166	0	49	12	
297	733	423	557	2262	380	186	5	412	57	919	713	
5	1641	1237	302	148	57		0	1447	1336	650	48	
			106	5	2520	263	172	834	450	76	321	
			575	504	926	1022	1061	963	566	0	606	
			792	1109	829	199	297	576	689	513	486	
			917	337	871	884	4	1146	21	1699	999	
						2	613	74				
						1317	89	500				
<b>MW</b>	<b>816</b>	<b>618</b>	<b>745</b>	<b>779</b>	<b>665</b>	<b>917</b>	<b>414</b>	<b>559</b>	<b>829</b>	<b>341</b>	<b>719</b>	<b>599</b>
<b>SD</b>	794	552	481	701	592	728	447	605	512	395	677	598
<b>n</b>	15	15	15	19	19	19	20	21	21	19	19	19

### 8.4.7 Tumornekrosefaktor- $\alpha$

Tab. 8.42: TNF- $\alpha$ -Sekretion der PMBZ (pg/ml)

	Krebspatienten						Patienten mit Polypen					
	KON			SYN			KON			SYN		
	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3
	13743	2015	4219	26573	1032	16275	386	3761	4937	1754	9830	25625
	13498	3418	3008	6415	1886	144	4380	8975	10689	730	4214	3288
	21547	6487	3587	6148	692	11887	9571	5803	3291	3067	4063	3557
	13350	1182	9405	23742	2933	16011	21	16090	43768	0	2251	15583
	7165	1113	63076	6297	6089	11622	5073	11139	7246	561	859	3591
	4718	5425	746	31100	17940	166	2341	1321	4256	24712	10398	2916
	2906	6516	13926	8201	7070	27739	1885	0	6700	2524	3991	8021
	1589	4981	2245	3365	13977	126	1356	5538	4030	3437	1975	420
	2270	0	2146	427	6534	11845	7151	1134	10199	2744	9225	1803
	1001	75	3956	1224	16820	9000	1784	7695	2801	50012	64797	457
	12579	2251	856	1731	1884	626	515	59012	5047	973	366	4723
	5246	121	6867	8484	5551	17611	86	35375	646	370	6995	2016
	22370	47264	1569	4660	715	6776	7724	929	20042	383	3709	753
	3326	3799	3092	82	9613	1608	2523	260	1365	2679	16474	6367
	1318	7432	9881	1402	1959	2366		389	14046	19239	3276	359
				1084	548	8544	5368	18641	4648	4042	645	1512
				4703	2168	6846	8355	3763	6294	4273	195	5705
				40774	7370	20036	12482	1728	4294	6226	3014	2856
				9283	3728	2040	52592	752	7337	1756	19759	4754
							299	3957	12624			
							14195	1849	3167			
<b>MW</b>	<b>8442</b>	<b>6139</b>	<b>8572</b>	<b>9773</b>	<b>5711</b>	<b>9014</b>	<b>6904</b>	<b>8958</b>	<b>8449</b>	<b>6815</b>	<b>8739</b>	<b>4963</b>
<b>SD</b>	<b>7242</b>	<b>11651</b>	<b>15542</b>	<b>11765</b>	<b>5417</b>	<b>7940</b>	<b>11555</b>	<b>14210</b>	<b>9325</b>	<b>12301</b>	<b>14610</b>	<b>6135</b>
<b>n</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>21</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>19</b>

### 8.4.8 Interferon- $\gamma$

Tab. 8.43: IFN- $\gamma$ -Sekretion der PMBZ (pg/ml)

	Krebspatienten						Patienten mit Polypen					
	KON			SYN			KON			SYN		
	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3
	148	331	662	1724	333	1630	259	723	901	97	390	1254
	2848	1604	1330	1227	111	2109	333	376	1621	494	466	25
	220	139	202	397	168	659	452	650	1068	461	469	24
	128	42	16	553	327	698	21	891	1818	17	1423	1804
	1016	138	1262	493	200	471	522	1528	1276	90	92	449
	475	772	774	554	499	17	2074	594	2369	3551	3970	3309
	1153	1496	590	537	326	1752	74	286	483	638	786	1275
	122	315	160	505	1183	139	333	1369	567	729	114	156
	126	459	184	65	137	83	341	679	484	794	639	1575
	87	335	38	132	1023	1535	172	630	1254	604	551	46
	1332	247	1134	22	214	30	1293	2931	1426	798	73	449
	346	25	331	20	438	2305	1107	3377	101	141	506	365
	1943	1924	615	780	84	1707	689	106	1109	369	1974	1131
	2049	1382	1605	25	2029	1720	51	32	1093	2526	930	576
	401	1907	1784	337	304	426		23	3817	2898	2185	31
				720	44	1775	1312	2997	1441	434	1103	686
				524	495	750	1592	1799	1017	1122	30	1008
				3281	1502	2233	462	154	295	1288	1986	660
				304	166	301	3410	62	1727	586	1558	879
							595	1291	2677			
							1913	794	1108			
<b>MW</b>	<b>826</b>	<b>741</b>	<b>712</b>	<b>642</b>	<b>504</b>	<b>1071</b>	<b>850</b>	<b>1014</b>	<b>1317</b>	<b>928</b>	<b>1013</b>	<b>826</b>
<b>SD</b>	<b>871</b>	<b>710</b>	<b>584</b>	<b>767</b>	<b>541</b>	<b>819</b>	<b>866</b>	<b>1009</b>	<b>857</b>	<b>991</b>	<b>989</b>	<b>809</b>
<b>n</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>21</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>19</b>

## 8.4.9 Transforming Growth Factor- $\beta$ 1

Tab. 8.44: TGF- $\beta$ 1-Konzentration im Fäzeswasser (pg/ml)

	Krebspatienten						Patienten mit Polypen					
	KON			SYN			KON			SYN		
	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3
5230	6475		1658	3177	192	3090	2943	2422	384	454	562	
6924	6691	6360	1503	325	751	1635	961	1976	412	385	356	
4046	5239	1718	1130	152	135	833	553	609	5733	5409	5457	
1666	638	467	152	7130	2312	568	527	5610	720	1205	532	
5229	5109	4615	148	194	219	549	477	442	848	5357	5481	
3124	2111	3418	461	1289	1314	5736	4147	4525	3444	3296	3059	
216	527	450	2541	445	572	600	365	1595	437	421	295	
172	232	872	577	504	1107	894	4419	1113	572	471	813	
1857	4247	4880	499	446	562	3323	3970	1182	2731	5352		
363	186	232	702		2220	1448	3593	2204	2080	2946	5305	
505	649	776	1008	551	684	1928	1156	519	2619	4913	4675	
499	545	462	623	835	517	444	791	548	157	276	1824	
514	589	696	3441	3499	931	2758	1133	898	1140	197	1241	
832	1082	3087	802	594	524	4255	670	1867	511			
5738	5712	4970	2007	487	243	245	262	244	238	299	238	
			310	4926	658	1049	935	2020	211	2805	208	
			717	2184		4136		2809	865	792	422	
			458	290	336	404	703	434	3551	4076	1766	
			248	420	352	32	83	322	473	593	470	
						330	469	477				
						3513	2248	4071				
<b>MW</b>	<b>2461</b>	<b>2669</b>	<b>2357</b>	<b>999</b>	<b>1525</b>	<b>757</b>	<b>1799</b>	<b>1520</b>	<b>1709</b>	<b>1428</b>	<b>2180</b>	<b>1924</b>
<b>SD</b>	<b>2372</b>	<b>2557</b>	<b>2133</b>	<b>879</b>	<b>1951</b>	<b>633</b>	<b>1633</b>	<b>1453</b>	<b>1500</b>	<b>1527</b>	<b>2066</b>	<b>2034</b>
<b>n</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>19</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>21</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>19</b>	<b>18</b>	<b>17</b>

## 8.4.10 Prostaglandin E<sub>2</sub>

Tab. 8.45: PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Fäzeswasser (pg/ml)

	Krebspatienten						Patienten mit Polypen					
	KON			SYN			KON			SYN		
	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3	T 1	T 2	T 3
4460	11047		20051	34517	24800	33206	18165	10734	16298	15836	12268	
96814	99507	97083	15493	28800	24411	44702	33511	31310	42190	7447	6013	
98694	98181	97882	17839	18477	24930	15652	9402	18080	17391	33294	51117	
20350	36770	14135	16537	94230	21718	8270	5671	5886	3874	4017	3146	
46691	40644	32817	11987	15986	30549	8236	7157	13188	10553	8265	11172	
4498	6415	6814	19566	25525	27874	51719	72764	30068	30343	6128	13124	
14556	3266	43132	49191	62256	73593	38685	11806	17501	17706	17715	26390	
50597	38894	15995	92406	45028	55791				12446	5815	9155	
11135	72810	13806	18114	20196	80281	9614	5433	7360	3594	4586		
29883	9939	13901	1922		3636	8953	10710	13204	7673	8638	8479	
12226	16153	9084	40701	8809	19831	7317	4726	6042	2658	3210	3975	
72147	35318	36761	22108	11803	24900	4910	4886	5078	4914	3048	4820	
5408	5707	4847	67011	27791	28721	3716	3652	5643	2578	2836	3454	
4466	4618	3085	23328	18542	10693	3464	3010	2238	4897			
5966	8860	5352	3736	3468	3797	3113	1838	3310	3294	4032	3648	
			1861	2999	2590	3912	2397	6530	2460	3249	2591	
				1950	2857	4395		3069	3995	4245	2990	
			3478	3035	3146	4020	5415	3268	4849	4232	4677	
			3396	6443	2987	3681	4618	4327	3708	6373	5088	
						4154	2374	2676				
						3910	3327	2068				
<b>MW</b>	<b>31859</b>	<b>32542</b>	<b>28192</b>	<b>23818</b>	<b>23881</b>	<b>24584</b>	<b>13281</b>	<b>11098</b>	<b>9579</b>	<b>10285</b>	<b>7943</b>	<b>10124</b>
<b>SD</b>	<b>33542</b>	<b>33153</b>	<b>31862</b>	<b>24327</b>	<b>23767</b>	<b>22995</b>	<b>15404</b>	<b>16680</b>	<b>8699</b>	<b>10691</b>	<b>7575</b>	<b>12104</b>
<b>n</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>18</b>	<b>17</b>



# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten:

Name: Monika Roller  
Geburtsdatum, -ort: 08.05.1967 in Calw  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

## Schul Ausbildung:

1973 – 1977 Grundschule Wildberg-Effringen, Kreis Calw  
1977 – 1986 Otto-Hahn-Gymnasium Nagold  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife  
09/1987 – 07/1990 Ausbildung zur Kauffrau in der Grundstücks- und Wohnungswirtschaft

## Hochschulausbildung:

10/1993 – 03/2000 Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Karlsruhe (TH)  
Prüfungsfächer: Zoologie, Genetik, Mikrobiologie, Wasserchemie;  
Diplomarbeit am Institut für Ernährungsphysiologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung in Karlsruhe: Einfluss von Anthocyanen auf die Cytokinsekretion und -synthese in T-Lymphocyten (JURKAT) und Monocyten (THP-1)  
Diplom-Gesamtnote: sehr gut  
seit 09/2000 Anfertigung der Doktorarbeit am Institut für Ernährungsphysiologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung in Karlsruhe

## Beruflicher Werdegang:

07/1990 – 09/1993 Tätigkeit als kaufmännische Angestellte  
09/2000 – 12/2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Ernährungsphysiologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung in Karlsruhe

## **DANKSAGUNG**

Herrn Prof. Dr. G. Rechkemmer danke ich für die Vergabe des Themas, für die wissenschaftliche Betreuung und die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. R. Paulsen danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Bernhard Watzl für die umfangreiche wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit, für die hilfreiche Unterstützung bei der Planung und Durchführung der experimentellen Arbeiten und für die gute Zusammenarbeit.

Bei Gisela Schultheiß bedanke ich mich herzlich für die gute Zusammenarbeit, die zuverlässige Unterstützung im Laboralltag und vor allem für ihren großen persönlichen Einsatz bei der Durchführung der Tierstudien.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft bei großen und kleinen Laborproblemen und für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Frau Prof. Dr. Giovanna Caderni und ihren Mitarbeitern (Universität Florenz) danke ich für die gute Kooperation bei der Durchführung der Tierstudie.

Herrn Prof. Dr. Kevin Collins und Yvonne Clune (Universität Cork) danke ich für die gute Kooperation bei der Durchführung der Humanstudie.

Mein spezieller Dank gilt Stefan Abert für das sorgfältige Korrekturlesen und seine kritischen Anmerkungen zum Manuskript dieser Arbeit.

Ganz besonders danke ich meiner Mutter für ihre Unterstützung während der Anfertigung meiner Dissertation.