

**Einfluss probiotischer Substanzen auf den
antioxidativen Status von neugeborenen Hundewelpen**

Julia Schwarzer

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Univ.-Prof. Dr. H.-J. Gabius

Arbeit angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. W.A. Rambeck

**Einfluss probiotischer Substanzen auf den
antioxidativen Status von neugeborenen Hundewelpen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Julia Schwarzer
aus
Frankfurt am Main

München 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Prof. Dr. W. Rambeck
Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. P. Kölle

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

In Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A Einleitung	1
B Schrifttum	3
1 Freie Radikale und Antioxidantien	3
1.1 Definition und Ursprung freier Radikale	3
1.2 Reaktive Sauerstoffspezies	4
1.3 Antioxidatives Abwehrsystem	6
1.4 Oxidativer Stress und Erkrankungen	8
2 Oxidativer Stress bei Neugeborenen	10
2.1 Antioxidativer Status von Neugeborenen	11
2.2 Prädisponierende Faktoren für oxidativen Stress bei Neugeborenen	13
2.2.1 Antioxidatives Abwehrsystem von Neugeborenen	13
2.2.2 Eisenfreisetzung im Plasma	15
2.2.3 Hypoxie	18
2.3 Neugeborenenenerkrankungen durch reaktive Sauerstoffspezies	19
2.3.1 Retinopathie der Frühgeborenen	20
2.3.2 Bronchopulmonale Dysplasie	21
2.3.3 Neonatale nekrotisierende Enterocolitis	22
2.3.4 ROS- Erkrankungen bei neugeborenen Tieren	23
3 Aufzucht von Hundewelpen ohne Muttermilch	25
3.1 Muttermilch versus Ersatzmilch	26
3.2 Auswirkungen auf den antioxidativen Status	28
4 Prophylaktische und therapeutische Beeinflussung des antioxidativen Abwehrsystems	30
4.1 Antioxidative Pharmaka	31
4.2 Probiotika	35
4.2.1 Grundsätzliche Wirkungen von Probiotika	36
4.2.2 Antioxidative Eigenschaften von Probiotika	40
4.2.3 Einsatz von Probiotika bei Neugeborenen	42
4.3 Lactoferrin	45
4.3.1 Grundsätzliche Wirkungen von Lactoferrin	45

4.3.2	Antioxidative Eigenschaften von Lactoferrin	48
4.3.3	Einsatz von Lactoferrin bei Neugeborenen	50
C	Material und Methoden	52
1	Versuchsaufbau	52
2	Tiere und Tierhaltung	54
2.1	Tiere	54
2.2	Versuchsgruppen	54
2.2.1	Lactoferrin-Versuch	54
2.2.2	Ec. faecium-Versuch	55
2.2.3	Mutteraufzucht	56
2.3	Tierhaltung	56
3	Fütterung	57
3.1	Futtermittel und ihre Zusammensetzung	57
3.1.1	Milchaustauscher	57
3.1.2	Lactoferrin	59
3.1.3	Probiotikum	59
3.1.4	Festfutter	59
3.2	Fütterungstechnik	61
4	Entwurmung	62
5	Kennzeichnung	62
6	Impfung	62
7	Allgemeine Untersuchungsparameter	63
7.1	Allgemeine klinische Untersuchung	63
7.2	Futteraufnahme und Gewichtsentwicklung	63
7.3	Kotabsatz und Kotkonsistenz	64
8	Spezifische Wirksamkeitsparameter für probiotische Substanzen	64
8.1	Kotuntersuchungen	64
8.2	Untersuchungen der Darmwand	65
8.3	Blutbild	65
8.4	Untersuchungen des Immunsystems	66

9	Untersuchung des antioxidativen Status	66
	9.1 Blutentnahme	66
	9.2 Behandlung und Lagerung der Blutproben	67
	9.3 Bestimmung des antioxidativen Status im Blut	67
	9.3.1 Testprinzip	68
	9.3.2 Reagenzien	68
	9.3.3 Methode	69
	9.3.4 Berechnung	70
	9.3.4.1 Kalibrierkurve	70
	9.3.4.2 TEAC	70
	9.4 Bestimmung von freiem Eisen und der latenten Eisenbindungs- kapazität im Serum	71
	9.4.1 Testprinzip	71
	9.4.2 Reagenzien	71
	9.4.3 Testdurchführung	72
	9.4.4 Berechnung	73
	9.4.4.1 Freies Eisen	73
	9.4.4.2 Latente Eisenbindungskapazität	73
	9.5 Bestimmung der Gesamteisenkonzentration im Serum	74
	9.5.1 Testprinzip	74
	9.5.2 Reagenzien	74
	9.5.3 Methode	75
	9.5.4 Berechnung	75
	9.5.4.1 Gesamteisenkonzentration im Serum	75
	9.5.4.2 Totale Eisenbindungskapazität und Transferrin-Sättigung	76
	9.6 Bestimmung der Vitamin E- Konzentration im Plasma	76
	9.6.1 Prinzip	76
	9.6.2 Reagenzien	76
	9.6.3 Methode	77
	9.6.3.1 Herstellung eines Vitamin E- Standards	77
	9.6.3.2 Vitamin E- Extraktion	77

9.6.3.3	HPLC- Analytik	78
9.6.4	Auswertung	78
9.7	Bestimmung der Vitamin C- Konzentration im Serum	79
9.7.1	Prinzip	79
9.7.2	Reagenzien	79
9.7.3	Methode	80
9.7.3.1	Herstellung eines Vitamin C- Standards	80
9.7.3.2	Probenvorbereitung	80
9.7.3.3	HPLC- Analytik	81
9.7.4	Auswertung	81
10	Statistische Methoden	81
D	Ergebnisse	83
1	Allgemeine Untersuchungsparameter	83
1.1	Futteraufnahme und Gewichtsentwicklung	83
1.2	Futterverwertung	85
2	Antioxidativer Status	85
2.1	Antioxidativer Status der Hundewelpen	85
2.2	Einfluss von Lactoferrin	87
2.3	Einfluss von Enterococcus faecium	89
2.4	Vergleich mutterlose Aufzucht – Mutteraufzucht	90
3	Vitamin E- Konzentrationen im Plasma	90
3.1	Vitamin E- Konzentrationen der Welpen des Lactoferrin-Versuchs	90
3.2	Vitamin E- Konzentrationen der Welpen des Ec. faecium-Versuchs	91
3.3	Vergleich der Vitamin E- Konzentrationen von Lactoferrin-, Probiotikum- und Mutteraufzuchtswelpen	93
3.4	Korrelation: Antioxidativer Status – Vitamin E- Konzentrationen	93
4	Vitamin C- Konzentrationen im Serum	94
5	Freies Eisen	94
5.1	Freies Eisen und latente Eisenbindungskapazität	94
5.2	Gesamteisen, totale Eisenbindungskapazität und Transferrinsättigung	94

E	Diskussion	96
1	Diskussion des Versuchsaufbaus	96
1.1	Eigenschaften der verwendeten probiotischen Substanzen	96
1.2	Dosierung der probiotischen Substanzen	98
1.3	Bestimmung des antioxidativen Status und verwendetes Probenmaterial	98
1.4	Zusammensetzung des Milchaustauschers	99
2	Diskussion der Ergebnisse	101
2.1	Futtermittelaufnahme, Gewichtsentwicklung und Futtermitterverwertung	101
2.2	Der antioxidative Status neugeborener Hundewelpen ist verschlechtert	102
2.3	Einfluss von Lactoferrin auf den antioxidativen Status	104
2.4	Einfluss von Enterococcus faecium auf den antioxidativen Status	105
2.5	Antioxidativ wirksame Vitamine im Blut der Hundewelpen	106
2.6	Freie Eisenionen im Blut als Ursache des verschlechterten antioxidativen Status	109
2.7	Gesundheitliche Folgen des verschlechterten antioxidativen Status	112
F	Zusammenfassung	113
G	Summary	115
H	Literaturverzeichnis	117
I	Anhang	140
1	Abkürzungsverzeichnis	140
2	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	142

A Einleitung

Bei einer Reihe von Neugeborenenenerkrankungen sind Sauerstoffradikale in der Pathogenese beteiligt. Insbesondere beim Frühgeborenen können sie zur Entstehung von bronchopulmonalen Dysplasien, Retinopathien, nekrotisierenden Enterocolitiden und intrazerebralen Blutungen beitragen. Die erhöhte Anfälligkeit des neugeborenen Säuglings gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies wird mit dem erniedrigten antioxidativen Status zum Geburtszeitpunkt erklärt. Auch bei neugeborenen Kälbern und Fohlen gibt es erste Hinweise auf ein geburtsnah erniedrigtes antioxidatives Abwehrsystem. Neben dem Gestationsalter gilt der antioxidative Status als wichtiger prognostischer Faktor für die Krankheitsanfälligkeit und Mortalität des Säuglings.

Über die Ernährung kann der antioxidative Status des Neugeborenen beeinflusst werden. So sind mit Muttermilch gestillte Säuglinge weniger anfällig für sauerstoffradikalinduzierte Erkrankungen als Neugeborene, die mit Ersatzmilchpräparaten aufgezogen werden. Auf der Suche nach Inhaltsstoffen in der Muttermilch, die für den antioxidativen Schutzmechanismus verantwortlich sind, entdeckte man das Glykoprotein Lactoferrin, das durch die Bindung von Eisenionen die Bildung freier Radikale verhindert. Die Zugabe von Lactoferrin zu Milchaustauschpräparaten kann Oxidationsprozesse verringern und erscheint so zur Verbesserung des antioxidativen Status und zur Reduzierung der Jungtiersterblichkeit nützlich zu sein.

Auch einige milchsäurebildende Bakterien, die als Probiotika zum Einsatz kommen, besitzen antioxidative Eigenschaften. Während Probiotika bei landwirtschaftlichen Nutztieren vor allem zur Steigerung der Gewichtszunahmen und zur Verbesserung der Futtermittelverwertung verabreicht werden, stehen bei Hunden und Katzen eher gesundheitliche Aspekte im Vordergrund. Es ist denkbar, dass Probiotika neben der Regulierung der Darmflora und der immunmodulatorischen Eigenschaften die Gesundheit von Hundewelpen durch antioxidative Aktivitäten fördern können.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, den antioxidativen Status von neugeborenen Beagle-Welpen zu bestimmen und festzustellen, ob dieser nach der Geburt wie bei anderen Spezies erniedrigt ist. Anhand einiger spezifischer Parameter wurden mögliche Ursachen für den beeinträchtigten antioxidativen Status untersucht. Die mutterlos aufgezogenen Welpen

wurden mit einem Milchaustauscher gefüttert, dem Lactoferrin bzw. ein Probiotikum zugesetzt worden war. Man erhoffte sich davon eine positive Beeinflussung des antioxidativen Status und des Gesundheitszustandes sowie eine Reduzierung der Aufzuchtverluste bei Hundewelpen.

B Schrifttum

1 Freie Radikale und Antioxidantien

Viele Jahre lang wurde den freien Radikalen jegliche Existenz in lebenden Organismen versagt und ihre Bedeutung in der Medizin nicht anerkannt. Lediglich Chemikern waren sie im Zusammenhang mit Strahlungs- und Verbrennungstechnologien ein Begriff.

Im Jahre 1954 fanden Gerschmann et al. heraus, dass der toxische Effekt hoher Sauerstoffkonzentrationen auf die Bildung von freien Radikalen zurückzuführen ist. McCord und Fridovich (1969) waren die Ersten, die ein Enzym entdeckten, das mit freien Radikalen als Substrat reagiert. Diese Superoxid-Dismutase, die in menschlichen und tierischen Geweben vorkommt, katalysiert die Umwandlung von Superoxid-Radikalen zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. Die Autoren vermuteten, dass das Enzym eine wichtige, wenn nicht sogar lebenswichtige Rolle beim Schutz des Organismus vor schädlichen Einflüssen durch Superoxid-Radikale spielt.

Mit der Bestimmung von Lipidperoxidationsprodukten in Geweben und Körperflüssigkeiten wurden die Schäden durch radikale Kettenreaktionen messbar. Seitdem sind freie Radikale in der Pathogenese vieler Krankheiten beschrieben und werden z.T. auch für die Ätiologie verantwortlich gemacht (Diplock, 1994; Wiseman & Halliwell, 1996; Saugstad, 1990).

1.1 Definition und Ursprung freier Radikale

Als freies Radikal wird ein Atom oder Molekül bezeichnet, das ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzt. Es kann auf drei verschiedene Weisen entstehen:

- 1) Homolytische Spaltung einer kovalenten Bindung eines Moleküls, bei der jedes Fragment eines der gepaarten Elektronen erhält.
- 2) Verlust eines Elektrons von einem Molekül.
- 3) Addition eines Elektrons an ein Molekül.

In biologischen Systemen kommt die letztere Möglichkeit, der Elektronentransfer, weitaus häufiger vor als die homolytische Spaltung, bei der hohe Energien wie UV-Licht oder ionisierende Strahlung nötig sind.

Im Körper werden freie Radikale u.a. während der Atmungskette in den Mitochondrien gebildet. Dabei wird ein geringer Teil an Sauerstoff direkt zum Superoxid-Radikal reduziert.

Diese Reaktion ist kinetisch begrenzt und macht unter normoxischen Bedingungen nur 1-2 % aus. Bei Hyperoxie dagegen steigt dieser Anteil, und es können massenhaft Superoxid-Radikale und H_2O_2 aus den Mitochondrien der Lunge freigesetzt werden (Turrens et al., 1982 a und b).

Weiterhin werden freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen freigesetzt und von zahlreichen Enzymen während der katalytischen Reaktionen gebildet.

So werden durch das Enzym Xanthin-Oxidase nach der Reperfusion von ischämischem Gewebe explosionsartig Sauerstoffradikale produziert. Während der Ischämie (Hypoxie) kommt es zu einer Ansammlung von Adenosin-Monophosphat (AMP), das zu Hypoxanthin katabolisiert wird (Granger et al, 1981). In der anschließenden Reperfusion wandelt die Xanthin-Oxidase das Hypoxanthin mit dem wieder vorhandenen Sauerstoff zu Harnsäure um und es entstehen Superoxid-Radikale und H_2O_2 . Dieser Mechanismus erklärt den Gewebeschaden nach Hypoxie-Reoxygenation, der bei einer Reihe von Erkrankungen auftritt (siehe 1.4).

1.2 Reaktive Sauerstoffspezies

In dem Begriff „reaktive Sauerstoffspezies“ („reactive oxygen species“, ROS) werden Sauerstoffradikale sowie reaktive Nicht-Radikale (z.B. Wasserstoffperoxid, H_2O_2) zusammengefasst, die die Fähigkeit besitzen, Biomoleküle zu oxidieren. Sie gelten damit als Verursacher von oxidativen Schäden an Proteinen, Lipiden und der DNA (Sies, 1991a; Halliwell, 1996).

Zu den wichtigsten reaktiven Sauerstoffspezies zählen Peroxyl-Radikale, Stickstoffmonoxid-Radikale, Wasserstoffperoxid (H_2O_2), einatomiger Sauerstoff, Ozon (O_3), das Superoxid-Radikal-Anion ($O_2^{\bullet -}$) und als reaktivste Spezies das Hydroxyl-Radikal (OH^{\bullet}). Dieses kann in der Gegenwart von katalytischen Eisenionen aus Wasserstoffperoxid gebildet werden (Fenton-Reaktion):



Sofortige Radikal-Kettenreaktionen am Ort der Entstehung sind Ausdruck der hohen Reaktivität des Hydroxyl-Radikals.

Bei unzureichender antioxidativer Abwehr können die Radikale Schäden in unterschiedlichen Zellkompartimenten anrichten. In Zellmembranen kommt es durch Lipidperoxidationen und fortlaufenden Kettenreaktionen zu Anhäufungen von Peroxyl-Radikalen, die die Membranen destabilisieren und sie für Ionen durchgängig werden lassen (Cheeseman, 1985).

Freie Radikale können die Sulfhydrylgruppen in Proteinen oxidieren, wodurch Rezeptorfunktionen, Enzyme und Transportproteine beeinträchtigt werden. Dies kann sich auch sekundär auf andere Biomoleküle auswirken, z.B. bei der Inaktivierung von DNA-Reperaturenzymen. Zusätzlich werden bei ROS-Angriffen auf Proteine Peroxide gebildet, die sich weiter zersetzen und den initialen Schaden vorantreiben (Ambe und Tappel, 1961; Fu et al., 1995).

Auch die Nukleinsäure wird durch freie Radikale geschädigt. Durch Reaktion mit dem Hydroxyl-Radikal entstandene hydroxylierte Purin- und Pyrimidinbasen können Ursache für DNA-Strangbrüche sein, die Mutationen, Wachstumshemmungen und gestörte Proteinsynthesen nach sich ziehen. Trotz eines effizienten Reperatursystems im Körper, das diese Alterationen zu verhindern versucht, kommt es über viele Jahre hinweg zu Ansammlungen von DNA-Mutationen, die für den Alterungsprozess und das Auftreten von Krebs verantwortlich gemacht werden („free radical theory of aging“, Beckman und Ames 1998).

Lange Zeit wurden reaktive Sauerstoffspezies nur als schädliche Nebenprodukte des aeroben Stoffwechsels angesehen. Erst kürzlich wurde offensichtlich, dass bestimmte ROS auch als Signalmoleküle in der Zellantwort dienen. Schreck et al. (1991) zeigten, dass bestimmte Transkriptionsfaktoren der NFκB/rel-Familie, die für die Aktivierung von Genen des frühen Abwehrsystems zuständig sind, nicht nur durch Interleukin-1 und Tumornekrose-Faktor aktiviert werden können, sondern auch durch ionisierende Strahlung und geringe Konzentrationen an oxidierenden Substanzen (v.a. H₂O₂). Somit gilt NFκB in eukaryotischen Zellen als Antwortfaktor auf oxidativen Stress.

Mehrere Autoren berichten, dass reaktive Sauerstoffspezies, insbesondere H₂O₂, von bestimmten Zellen als Antwort auf spezifische Zytokine oder Wachstumsfaktoren gebildet werden und diese anschließend als Second messenger bei Entzündungsreaktionen oder der Kontrolle des Zellzyklus agieren (Sundaresan et al., 1995; Lee et al., 1998 a; Robinson et al., 1999; Rhee et al., 2003).

Bei der Immunabwehr helfen ROS im Rahmen des sog. „respiratory burst“, in den Körper eingedrungene Mikroorganismen zu zerstören. Dabei kommt es in aktivierten Phagozyten zu vermehrter Sauerstoffaufnahme, mit der große Mengen an Wasserstoffperoxid, Superoxid-

Radikalen und Hydroxyl-Radikalen produziert werden. Diese reaktiven Sauerstoffspezies werden in die phagozytierten Vesikel aufgenommen und wirken auf die dort befindlichen Mikroorganismen bakterizid (Babior, 1978).

1.3 Antioxidatives Abwehrsystem

Da die Bildung freier Radikale unvermeidlich ist, hat der Körper ein antioxidatives Abwehrsystem entwickelt, um die Oxidationsschäden weitestgehend einzudämmen.

Ein Antioxidans wird definiert als „eine Substanz, die die Oxidation eines Substrats signifikant verzögert oder verhindert und dabei in geringerer Konzentration als dieses Substrat vorliegt“ (Halliwell, 1995).

Die Antioxidantien können eingeteilt werden in enzymatische und nicht-enzymatische. Zu den wichtigsten Enzymen gehört die Superoxid-Dismutase (SOD), die in den Mitochondrien als Manganese-SOD und im Zytoplasma als Kupfer-Zink-SOD vorliegt. Sie katalysiert die Umwandlung des hoch reaktiven Superoxid-Radikals $O_2^{\bullet -}$ zu H_2O_2 und Sauerstoff. Das entstehende Wasserstoffperoxid wird von den Enzymen Katalase (CAT) und Glutathion-Peroxidase (GPX) unschädlich gemacht. Letzteres Enzym kommt in 5 Isoenzymen vor, von denen die zytosolische und mitochondriale Glutathion-Peroxidase neben H_2O_2 auch Lipidperoxide reduziert.

Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien zählen die Vitamine E und C, Carotinoide, Flavonoide, Harnsäure und Bilirubin.

Das fettlösliche Vitamin E (α -Tocopherol) wirkt in Membranen und anderen Lipoproteinen als Kettenreaktion-abbrechendes Antioxidans. Es verhindert die Lipidperoxidation, indem es Peroxyl-Radikale zu Hydroperoxiden umwandelt und dabei selbst zum Tocopheroxyl-Radikal oxidiert wird. Dieses ist aber gegenüber ungesättigten Fettsäuren weniger reaktiv und kann von Ascorbinsäure oder Glutathion (GSH) wieder in die Ausgangsform reduziert werden. Daneben reagiert Vitamin E auch mit einatomigem Sauerstoff und Peroxynitriten und gilt somit im Vergleich zu anderen fettlöslichen Antioxidantien als das wirksamste in der Fettphase (Niki, 1987).

Vitamin C (Ascorbinsäure) ist wasserlöslich und kommt in hohen Konzentrationen in vielen Geweben und im Plasma vor. Es wirkt als Fänger von ROS und reagiert hierbei insbesondere mit dem Superoxid-Radikal, H_2O_2 , einatomigem Sauerstoff und dem Hydroxyl-Radikal.

Neben der Fähigkeit, Vitamin E aus dem Tocopheroxyl-Radikal zu regenerieren, besitzt Vitamin C auch prooxidative Eigenschaften. In der Gegenwart von freien Übergangsmetallionen (Fe^{2+} , Cu^{2+}) unterstützt es die Bildung von $\text{O}_2^{\bullet -}$, H_2O_2 und OH^{\bullet} . In vivo sind die Mengen an freien Metallionen durch die metallbindenden Proteine Caeruloplasmin und Transferrin jedoch sehr gering, so dass dieser prooxidative Effekt nur bei Krankheiten und Gewebsverletzungen mit erhöhter Eisen- bzw. Kupfer-Freisetzung von Bedeutung wird (Halliwell und Gutteridge, 1990).

Harnsäure ist ein Abbauprodukt des Purinstoffwechsels und gilt beim Menschen als eines der wichtigsten wasserlöslichen Antioxidantien. Bei Tieren dagegen wird Harnsäure durch das Enzym Uricase weiter zu Allantoin umgewandelt und liegt im Plasma im Vergleich zum Menschen in viel geringeren Konzentrationen vor. Die antioxidativen Eigenschaften beziehen sich auf das Einfangen verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies und das Binden von Eisenionen (Sevanian et al., 1991).

Die Rolle des Bilirubin als Radikalfänger wurde schon mehrfach beschrieben (Stocker et al., 1987; Miller et al., 1993). Unkonjugiertes Bilirubin reagiert mit Superoxid- und Peroxyl-Radikalen und dient als Fänger für einatomigen Sauerstoff. Im neonatalen Plasma wurden erhöhte Bilirubinwerte nachgewiesen (Maisels, 1988). Sie trugen bei neugeborenen Ratten zur Steigerung des antioxidativen Status bei und schützten die Tiere so vor oxidativem Stress (Dennery et al., 1995). Dani et al. (2003) konnten dagegen bei neugeborenen Babys keinen vergleichbaren antioxidativen Effekt einer Hyperbilirubinämie finden.

Eine weitere Möglichkeit, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zu verhindern, ist die Kontrolle der freien Eisen- und Kupferionenkonzentrationen. Dazu liegen im Plasma die metallbindenden Proteine Caeruloplasmin, Transferrin und Ferritin vor. Nach Resorption von zweiwertigem Eisen aus dem Darm wird dieses im Blut durch die Ferroxidasaktivität von Caeruloplasmin zu Fe^{3+} oxidiert und von Transferrin übernommen, das als Transportprotein für Eisenionen im Blut fungiert. Nicht benötigtes Eisen wird an Apoferritin gebunden und als Ferritin in den Zellen gespeichert. Durch diese Mechanismen werden Lipidperoxidationen und DNA-Schäden durch katalytisch wirksame Metallionen sicher verhindert.

Als letzter antioxidativer Abwehrmechanismus kommt der Reperaturprozess in Frage, der geschädigte Biomoleküle entfernt, bevor sie akkumulieren und weitere Schäden anrichten können. So werden oxidativ geschädigte Nukleinsäuren durch spezifische Enzyme repariert,

oxidierte Proteine durch proteolytische Enzyme entfernt und Lipidperoxide durch Lipasen und Peroxidasen unschädlich gemacht.

1.4 Oxidativer Stress und Erkrankungen

Kommt das natürliche Gleichgewicht zwischen Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und antioxidativem Abwehrsystem zugunsten der ROS aus dem Gleichgewicht, spricht man von oxidativem Stress (Sies, 1991).

Oxidativer Stress kann auftreten bei:

- 1) einem Mangel an Antioxidantien durch Fehlernährung (unzureichende Aufnahme von α -Tocopherol, Ascorbinsäure, Riboflavin oder schwefelhaltigen Aminosäuren für die Bildung von GSH)
- 2) übermäßiger Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (z.B. Exposition in hohen Sauerstoffkonzentrationen; Aufnahme von Toxinen, die zu freien Radikalen metabolisiert werden; exzessive Aktivierung von „natürlichen“ Radikalbildnern, z.B. unverhältnismäßige Aktivierung von Phagozyten bei chronischen Entzündungskrankheiten wie rheumatoider Arthritis oder ulcerativer Colitis (Halliwell et al., 1992; Grisham, 1993)).

Geringgradiger oxidativer Stress kann von den Körperzellen toleriert werden und wird meist durch eine Synthesesteigerung des antioxidativen Abwehrsystems beantwortet. Bei massiveren ROS-Einwirkungen kommt es zu verändertem Zellmetabolismus, DNA-Strangbrüchen, geschädigten Ionentransportern in den Zellmembranen und Lipidperoxidationen. Als Folge kann der Zelltod eintreten (Cochrane, 1991).

Seit man oxidativen Schaden im Gewebe messen kann, steigt die Zahl der Erkrankungen, bei denen freie Radikale in der Ätiologie vermutet werden, stetig an. Dabei haben bereits 1984 Halliwell und Gutteridge darauf hingewiesen, dass es bei den meisten Erkrankungen mit Gewebeschäden zu einer gesteigerten Bildung von freien Radikalen kommt und diese somit die Folge aber nicht die Ursache der Krankheit sind.

Eine gesicherte Rolle spielen reaktive Sauerstoffspezies in der Ätiologie der Arteriosklerose, bei der oxidativer Stress zu Lipidperoxidationen von low density Lipoproteinen (LDL) führt, die dadurch proatherogene Eigenschaften erlangen (Berliner und Heinecke, 1996).

Weiterhin sind freie Radikale durch oxidative Schädigung der DNA an initialen Stadien der Karzinogenese beteiligt und fördern durch Induktion von Nekrose und Apoptose an

Nervenzellen die Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen wie Parkinson und Alzheimer (Simonian und Coyle, 1996). Rheumatoide Arthritis ist durch eine gesteigerte Aktivität von Makrophagen charakterisiert, die zusammen mit anderen Entzündungszellen das synoviale Gewebe infiltrieren (Mulherin et al., 1996). Die aktivierten Makrophagen, Monozyten und Granulozyten bilden reaktive Sauerstoffspezies, die die rheumatoide Erkrankung vorantreiben und unterhalten. Dabei verschlimmern hohe Eisenkonzentrationen durch ihren prooxidativen Effekt die Gelenkentzündung. Araujo et al. (1998) bestimmten bei Kindern mit juveniler rheumatoider Arthritis (JRA) Lipidperoxidationsprodukte und Antioxidantien im Plasma und stellten signifikant erhöhte Malondialdehyd- und Wasserstoffperoxid-Konzentrationen bei erniedrigten Vitamin E- und β -Carotin-Spiegeln fest. Die Autoren schlossen daraus, dass sich dieses Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien im Blutkreislauf von JRA-Patienten in der polyartikulären und systemischen Form manifestiert.

Das Hypoxanthin/Xanthin-Oxidase-System ist ein wirkungsvoller Radikalbildner nach Ischämie-Reperfusion-Vorgängen, wie sie bei der neonatalen nekrotisierenden Enterocolitis (Hsueh et al., 2002), der Asphyxie des Neugeborenen (Fellman & Raivio, 1997) und bei Herz- und Hirninfarkten auftreten (Jolly et al., 1984; Demopoulos et al., 1980). Die übermäßig freigesetzten Radikale überfordern das antioxidative Abwehrsystem und führen so zum Gewebeschaden.

Seit einigen Jahren wird die Bedeutung von oxidativem Stress auch in der Tiermedizin erkannt. Art et al. (1999) stellten fest, dass Pferde mit chronisch-obstruktiver Lungenkrankheit während einer akuten Phase in der Bronchiallavage-Flüssigkeit signifikant höhere GSSG-Werte (oxidiertes Glutathion, als Marker für oxidativen Stress) als gesunde Pferde aufwiesen. Interessanterweise waren dabei auch die Blut-GSH-Werte signifikant erhöht (Kirschvink et al., 2002), so dass vermutet wird, dass die Entzündung der Luftwege einen pulmonalen oxidativen Stress verursacht, der sich auch auf den systemischen oxidativen Status auswirkt.

Möglicherweise spielen reaktive Sauerstoffspezies auch bei der „exercise-induced pulmonary haemorrhage, EIPH“ des Pferdes eine Rolle (Derksen, 1997), in dem sie Kapillarwände oxidativ schädigen, die Freisetzung von Entzündungsmediatoren fördern und die Bildung von Stickstoff-Monoxid (NO, einem Vasodilatator) reduzieren. Geschädigte Gefäßwände und gesteigerte Vasokonstriktion können so während extremer Anstrengungen zum Bild der EIPH führen.

Sowohl die „equine motor neuron disease“ als auch die „canine motor neuron disease“ werden mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht. Die betroffenen Tiere weisen erhöhte Serumkonzentrationen an Kupfer (prooxidative Eigenschaften) und erniedrigte Vitamin E-Konzentrationen auf (Delguste et al., 2002; Green et al., 2001).

Skoumalova et al. (2003) untersuchten den Prozess der Neurodegeneration bei Hunden und stellten eine signifikant erhöhte Radikalbildung im Gehirn von Tieren mit Demenz, dem Pendant zur menschlichen Alzheimer Erkrankung, fest. Erhöhte Lipidperoxidationsprodukte und erniedrigte Vitamin E-Konzentrationen im Gehirn der betroffenen Hunde deuten auf eine Beteiligung von oxidativem Stress hin.

Miller et al. (1993a) untersuchten die Auswirkungen von oxidativem Stress auf Milchkühe und stellten eine beeinträchtigte Fortpflanzung sowie vermehrtes Auftreten von Euterödemen fest. Sie vermuteten als Ursache eine Inaktivierung von Steroenzymen durch Lipidperoxidationen. Trächtige Kühe, die mit antioxidativ wirksamen Vitamin E supplementiert wurden, wiesen kurz vor der Geburt höhere Östrogen- und niedrigere Progesteronwerte als un-supplementierte Kühe auf, außerdem litten sie weniger häufig an Nachgeburtverhalten (Thomas et al., 1990 und 1992).

Bei der Labmagenverlagerung der Kühe treten Ischämie-Reperfusionsschäden durch Superoxid-Radikale auf. Direkt nach der Operation (Reperfusion) nimmt die Aktivität der Superoxid-Dismutase (als Parameter für den antioxidativen Status) im Blut stark ab und erreicht die Ausgangswerte nur langsam wieder. Eine Behandlung mit Ascorbinsäure, Vitamin E oder Prednisolon vor der Rückverlagerung des Labmagens zeigt erste Erfolge hinsichtlich des antioxidativen und metabolischen Status der Kühe (Fürll et al., 1999).

2 Oxidativer Stress bei Neugeborenen

Die erhöhte Anfälligkeit von Neugeborenen gegenüber hohen Sauerstoffkonzentrationen ist schon lange Zeit bekannt. So vermuteten bereits 1949 Kinsey und Zacharia einen Zusammenhang zwischen der Beatmung mit reinem Sauerstoff und dem Auftreten der Frühgeborenen-Retinopathie. Erste Untersuchungen über oxidative Schädigung von neonatalen Zellen führten Wright et al. 1951 durch und stellten dabei eine hohe Empfindlichkeit der Erythrozyten gegenüber oxidativen Substanzen fest.

Bereits der Vorgang der Geburt ist mit oxidativem Stress für den Neugeborenen verbunden. Der Fetus wechselt aus einer hypoxischen Umgebung des Uterus mit Sauerstoffpartialdrücken

um 20-25 mmHg in die Außenwelt mit pO_2 von 100 mmHg, wobei die Lungenepithelzellen während der Einatmung einem Druck von ungefähr 140 mmHg ausgesetzt werden. Robles et al. (2001) bestimmten die Konzentration an Hydroperoxiden als Marker für Lipidperoxidationen und oxidativen Stress in der Erythrozytenmembran von neugeborenen Säuglingen und stellten direkt nach der Geburt einen Anstieg der Werte fest, der bei Frühgeborenen aufgrund des unreifen antioxidativen Abwehrsystems noch stärker ausfiel. Die Auswirkungen, die diese frühzeitigen Belastungen mit reaktiven Sauerstoffspezies auf den antioxidativen Status von Neugeborenen haben, werden kontrovers diskutiert.

2.1 Antioxidativer Status von Neugeborenen

Beim menschlichen Säugling wurde der antioxidative Status in den ersten Lebenstagen schon mehrfach untersucht. So bestimmten Sullivan und Newton 1988 die antioxidative Aktivität im Serum von 25 Neugeborenen unterschiedlichen Gestationsalters, in dem sie die Hemmung der Bildung von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen in Hirnhomogenisaten (TBARS, als Marker für Lipidperoxidationen) durch das Serum photometrisch ermittelten. Sie konnten dabei die Ergebnisse von Gutteridge und Stocks (1981) bestätigen, dass Neugeborene im Blut eine niedrigere antioxidative Aktivität als Erwachsene aufweisen. Bei frühreifen Säuglingen fanden sie extrem niedrige Werte. Auch Karmazsin et al. (1990) bestimmten auf diese Weise die antioxidative Kapazität im Serum von Neugeborenen und kamen zu dem gleichen Ergebnis.

Miller et al. (1993b) ermittelten die TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) im Serum von Neugeborenen und deren Müttern. Die Methode basiert auf der Absorption von $ABTS^{•+}$ -Radikalen und ihrer Inaktivierung durch Antioxidantien im Serum. Frühgeborene wiesen signifikant niedrigere TEAC-Werte als zeitig geborene Kinder auf. Auch waren ihre Werte im Verhältnis zum antioxidativen Status der Mütter erniedrigt. Kinder mit physiologischem Gestationsalter wiesen dagegen keine Unterschiede zu ihren Müttern auf.

Silvers et al. (1994) untersuchten die antioxidative Aktivität von Frühgeborenen, indem sie die Fähigkeit des Plasmas, Lipidperoxidationen zu verhindern, bestimmten (TBARS in Hirnhomogenisaten). Sie korrelierte positiv mit dem Gestationsalter. Zusätzlich fanden sie heraus, dass eine niedrige antioxidative Aktivität im Plasma mit einem gesteigerten Mortalitätsrisiko des Neugeborenen verbunden war. Selbst nach Korrektur für das Gestationsalter und Geburtsgewicht blieb diese Relation signifikant. Die Autoren vermuteten, dass die nach der

Geburt im Plasma gemessene antioxidative Aktivität einen wichtigen prognostischen Faktor für das Mortalitätsrisiko des Frühgeborenen darstellt.

Bei der Bestimmung des TRAP (total radical trapping antioxidant parameter) im Plasma von Neugeborenen und Erwachsenen durch Lindeman et al. (1989) wurde die Verzögerung der Peroxidation von Linolensäure durch Plasmaantioxidantien gemessen. Die TRAP-Werte von reifen Kinder waren gleich hoch und die von prämaternen Kindern höher als die Werte der Erwachsenen. Auch Luukkainen et al. (1999) erhielten bei ihren Messungen höhere TRAP-Werte für Frühgeborene. Sie erklärten sich diese gegensätzlichen Ergebnisse zu den obengenannten durch die unterschiedlichen Analyseverfahren. Die TBARS-Bestimmung in autoxydierten Hirnhomogenisaten misst die präventiven Antioxidantien (z.B. Caeruloplasmin, Transferrin), während die TRAP-Methode die Peroxyl-Radikalfänger (Harnsäure, Vitamin E und C) erfasst. Die TEAC-Bestimmung basiert auf den gleichen Radikalfängern wie die TRAP-Methode. Beim TRAP spielt die Harnsäure jedoch eine wesentlich größere Rolle als bei der TEAC. Dies erklärt die erhöhten TRAP-Werte von frühgeborenen Säuglingen, die häufig aufgrund einer verringerten glomerulären Filtrationsrate der Niere höhere Harnsäurekonzentrationen im Blut aufweisen.

Bei neugeborenen Tieren liegen bisher nur wenige Studien über systematische Untersuchungen des antioxidativen Status vor. Loudenslager et al. (1986) fütterten trächtigen Säuen eine mit Vitamin E und Selen angereicherte Diät und untersuchten die Auswirkungen auf den antioxidativen Status der Ferkel und auf ihre Fähigkeit, mit einer parenteralen Eisenadministration umzugehen. Sie entdeckten, dass die Ferkel mit sehr geringen α -Tocopherol-, Selen- und Glutathionspiegeln im Blut geboren werden und diese Werte nach der Aufnahme von Kolostrum ansteigen. Die Mutterschweine, die die angereicherte Diät erhielten, hatten höhere Vitamin E- und Selengehalte im Kolostrum als unsupplementierte Schweine. Dies wirkte sich positiv auf den antioxidativen Status ihrer Ferkel aus, der bereits an Tag 2 stärker angestiegen war.

Inanami et al. (1999) untersuchten bei neonatalen Kälbern den Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und Antioxidantiengehalt im Serum. Sie bestimmten Lipidperoxide im Blut, indem sie bei den Kälbern und ihren Muttertieren die Konzentrationen an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen maßen. Die Neugeborenen wiesen am 1. Tag nach der Geburt im Vergleich zu den Muttertieren signifikant höhere TBARS-Werte und deutlich niedrigere antioxidative Aktivitäten (gemessen als Ferroxidase-Aktivität, Superoxid-Radikalfänger-Aktivität und Konzentration an Bilirubin-assoziiertem Albumin) auf. In den

darauffolgenden Tagen sanken die Lipidperoxidationsprodukte im neonatalen Serum langsam ab.

Stohrer et al. (2001) untersuchten den antioxidativen Status von Kälbern und Fohlen, indem sie die TEAC und die antioxidativen Vitamine E und C sowie Harnsäure und Bilirubin im Blut der Neugeborenen und ihrer Muttertiere bestimmten. Direkt nach der Geburt war der antioxidative Status der Fohlen gleich hoch wie der der Stuten. In der ersten Lebenswoche sank er jedoch signifikant ab und blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum (6 Wochen) erniedrigt. Ein ähnliches Ergebnis ergab sich für die Kälber. Die TEAC-Werte korrelierten positiv mit den Blutspiegeln der Antioxidantien Vitamin E und C, Harnsäure und Bilirubin.

So ergeben sich Hinweise, dass auch bei neugeborenen Tieren der antioxidative Status nach der Geburt beeinträchtigt ist. Bei Hundewelpen wurden noch keine diesbezüglichen Angaben gemacht.

2.2 Prädisponierende Faktoren für oxidativen Stress bei Neugeborenen

Marker für oxidativen Stress, z.B. Hydroperoxide, können beim Neugeborenen in wesentlich höheren Konzentrationen als beim Erwachsenen gemessen werden (Robles et al., 2001). Für die erhöhte Anfälligkeit gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies sind in der Literatur verschiedene Erklärungsversuche zu finden.

2.2.1 Antioxidatives Abwehrsystem von Neugeborenen

Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass einige Antioxidantien im neonatalen Plasma in wesentlich geringeren Konzentrationen als beim Adulten vorhanden sind. Baydas et al. (2002) bestimmten die Blutspiegel von Vitamin E, A und C bei Neugeborenen mit physiologischem Gestationsalter und Frühgeborenen sowie bei ihren Müttern. Die Vitamin E - Konzentrationen waren bei den Neugeborenen signifikant niedriger als bei den Müttern, was mit der geringen Permeabilität der Plazenta für fettlösliche Vitamine zu erklären ist. Zu dem gleichen Ergebnis kamen Shah et al. (1987), Chen et al. (1996) und Chan et al. (1999). Prämatüre Säuglinge wiesen im Vergleich zu zeitig Geborenen niedrigere Vitamin E- Spiegel auf. Obwohl Chan et al. diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede messen konnten, stellten sie bei den Frühgeborenen häufiger einen Vitamin E- Mangel fest. Die Ergebnisse zeigen, dass der

Vitamin E- Gehalt im Fetus während des letzten Trimesters stark ansteigt und Frühgeborene somit für einen Vitamin E- Mangel prädisponiert sind.

Für den Vitamin A- Gehalt stellten Baydas et al. entsprechende Verhältnisse fest. Im mütterlichen Serum lagen höhere Vitamin A- Konzentrationen als im Nabelschnurblut vor. Frühgeborene wiesen signifikant niedrigere Vitamin A- Spiegel als Neugeborene mit physiologischem Gestationsalter auf. Schweigert et al. (1998) untersuchten den Einfluss des Alters auf die Vitamin A- Konzentrationen im Plasma von Hunden und stellten fest, dass Welpen mit geringen Vitamin A- Blutspiegeln auf die Welt kommen und innerhalb von 4 Wochen das Niveau adulter Hunde erreicht haben. Auch Kälber weisen direkt nach der Geburt einen sehr geringen β -Carotin- und Retinol-Gehalt im Plasma auf, der jedoch mit der ersten Kolostrumaufnahme innerhalb einer Woche ansteigt (Zanker et al., 2000).

Vitamin C kommt im Plasma von Neugeborenen, und insbesondere von Frühgeborenen, in höheren Konzentrationen als im Plasma von Erwachsenen vor (Baydas et al., 2002, Lindeman et al., 1989; Silvers et al., 1994). Obwohl Vitamin C als wichtiges extrazelluläres Antioxidans gilt, kann es in der Gegenwart von katalytischen Metallionen zur Bildung von freien Radikalen und Lipidperoxidationen beitragen. Diese Reaktion wird durch die Ferroxidase-Aktivität von Caeruloplasmin verhindert, dessen Konzentrationen im neonatalen Plasma jedoch deutlich erniedrigt sind (Hilderbrand et al., 1974; Silvers et al., 1994). Zusätzlich wird die Ferroxidase-Aktivität von Caeruloplasmin durch hohe Vitamin C- Konzentrationen gehemmt (Gutteridge, 1991). Powers et al. (1995) zeigten, dass dieser Effekt bei Neugeborenen auftreten kann, wenn die Vitamin C- Spiegel im Plasma hoch und die Caeruloplasmin-Gehalte niedrig sind.

So sind insbesondere Frühgeborene durch die verminderten Vitamine E und A, sowie die hohen Vitamin C- Konzentrationen und die reduzierte Caeruloplasmin-Aktivität für oxidativen Stress anfällig.

Das wasserlösliche Antioxidans Harnsäure liegt bei menschlichen Säuglingen direkt nach der Geburt wie bei Adulten in hohen Konzentrationen vor und fällt innerhalb der ersten zwei Lebenswochen auf geringere Werte ab (van Zoeren-Grobbe et al., 1994; Schrod et al., 1997). Der Bilirubingehalt im neonatalen Plasma ist signifikant höher als im maternalen und bewirkt eine höhere Resistenz gegenüber Cu^{2+} -induzierter Lipidperoxidation (Kiely et al., 1999; Wiedemann et al., 2003). Die Autoren schlossen daraus, dass der Neugeborene durch diese erhöhten Antioxidantiengehalte im Plasma besser gegen oxidativen Stress geschützt ist. Auch Dennery et al. (1995) zeigten, dass eine Hyperbilirubinämie bei neugeborenen Ratten

oxidative Schäden nach Hyperoxie vermindern kann. Dani et al. (2003) sahen dagegen keinen Zusammenhang zwischen dem Bilirubingehalt im Plasma und vermindertem oxidativen Stress. In ihrem Versuch sanken die Bilirubinwerte innerhalb der ersten 24 Lebensstunden der Neugeborenen ab und wurden von einem steigenden antioxidativen Status begleitet.

Die Fähigkeit des Plasmas, eiseninduzierte Lipidperoxidationen mit Hilfe der Proteine Caeruloplasmin und Transferrin zu verhindern, verglichen Lindeman et al. (1992) bei neugeborenen Säuglingen und Erwachsenen. Im neonatalen Plasma fanden sie im Vergleich zum adulten geringe Caeruloplasmin-Konzentrationen, die bei Frühgeborenen besonders niedrig waren. Sie bestätigten damit die Ergebnisse von Hilderbrand et al. (1974), die eine positive Korrelation des Caeruloplasmingehalts mit dem Gestationsalter feststellten. Die Transferrinkonzentration im Plasma war bei den Neugeborenen ebenfalls niedriger als bei den Erwachsenen und stand mit dem Gestationsalter in Beziehung. Zu dem gleichen Ergebnis kamen Scott et al. (1975).

Die Expression der antioxidativen Enzyme Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase und Katalase findet bei Labortieren erst kurz vor der Geburt in verstärktem Maße statt (Frank et al., 1987). Während die Glutathion-Peroxidase-Konzentrationen bei Neugeborenen bereits hoch sind, steigen die Superoxid-Dismutase- und Katalase-Spiegel erst nach der Geburt langsam an (Gupta et al., 1999). Einen ähnlichen Verlauf konnten McElroy et al. (1992) bei neugeborenen Babys nachweisen. Als mögliche Erklärung für den signifikanten Anstieg der antioxidativen Enzyme kurz vor der Geburt nennen Frank et al. (1996) den zeitgleichen Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies im Lungengewebe, die den Enzymen als Substrat dienen und ihre Expression regulieren. Während Neugeborene mit physiologischem Gestationsalter somit auf oxidativen Stress bei der Geburt vorbereitet sind, weisen Frühgeborene ein unterentwickeltes antioxidatives Enzymsystem auf.

2.2.2 Eisenfreisetzung im Plasma

Freie Eisenionen spielen eine zentrale Rolle bei der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, indem sie die Fenton-Reaktion katalysieren, bei der hochreaktive Hydroxyl-, Alkoxy- und Peroxylradikale entstehen (siehe Review Ryan und Aust, 1992). Um diesen Effekt im Körper zu verhindern, liegen Eisenionen während des Transportes und der Lagerung in proteingebundener Form vor (Transferrin, Ferritin, Hämproteine). Bei erwachsenen Menschen ist das Transferrin lediglich zu 1/3 mit Eisen gesättigt (Cazzola et al, 1985), so dass der Rest als

„latente Eisenbindungskapazität“ zur Verfügung steht und keine katalytisch wirksamen freien Eisenionen vorkommen.

Bei Neugeborenen wurden dagegen schon mehrfach freie Eisenionen im Plasma gemessen. So bestimmten Evans et al. (1992) mit der Bleomycin-Methode (Gutteridge et al, 1981a) nicht protein-gebundenes Eisen (NPBI) im Plasma von Neugeborenen unterschiedlichen Gestationsalters und untersuchten zusätzlich die Transferrinsättigung. Sie entdeckten bei 3 von 15 prämaternen Säuglingen freies Eisen im Plasma, von denen 2 eine Transferrinsättigung von 100% aufwiesen. Zu ihrer Überraschung stellten sie auch bei einigen Neugeborenen mit physiologischem Gestationsalter nicht protein-gebundenes Eisen fest (bei 5 von 27 und 6 von 25). Dabei war die Transferrinsättigung nicht in jedem Fall 100%. Als Erklärung vermuteten sie, dass das freie Eisen als Chelat vorliegt und so nur schlecht vom Transferrin gebunden werden kann.

Auch Lindeman et al. (1992) fanden bei einigen Neugeborenen freies Eisen im Plasma (Bleomycin-Test). Häufig lag keine oder nur eine sehr geringe latente Eisenbindungskapazität vor. Sie untersuchten bei den Neugeborenen und bei Erwachsenen die Fähigkeit des Plasmas, eiseninduzierte Lipidperoxidationen zu verhindern. In allen adulten Plasmen wurde die Peroxidation unterdrückt, wohingegen bei 43% der Säuglinge, unabhängig vom Gestationsalter, die Peroxidation sogar stimuliert wurde. Dies konnte durch Zusatz von Ovo-Transferrin, Apotransferrin oder Desferrioxamin verhindert werden. Die eisenbindende antioxidative Aktivität (ausgedrückt als % Inhibition der Peroxidation) korrelierte positiv mit der latenten Eisenbindungskapazität und negativ mit der Konzentration an nicht protein-gebundenem Eisen im neonatalen Plasma.

So ist der Neugeborene sowohl durch die geringen Caeruloplasmin- und Transferrinkonzentrationen und als auch durch eventuell vorhandene freie Eisenionen einem erhöhten Risiko für eiseninduzierte Schädigungen durch reaktive Sauerstoffspezies ausgesetzt.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Moison et al. (1993), die die Peroxidation von Surfactant durch neonatales Plasma untersuchten. Die Lipidperoxidation korrelierte positiv mit dem Auftreten von nicht protein-gebundenem Eisen im Plasma. Die Autoren stellten dabei einen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Gestationsalters fest: 48% der Frühgeborenen wiesen freie Eisenionen im Blut auf (versus 25% der zeitig Geborenen) und 50% zeigten eine Stimulation der Lipidperoxidation im Surfactant (versus 4%).

Da nur Fe^{3+} - Ionen in der Lage sind, Peroxidationen zu katalysieren, untersuchten Berger et al. (1995), in welchem Zustand das freie Eisen vorliegt, das im neonatalen Plasma gefunden

wird (Fe^{2+} oder Fe^{3+}). Sie entdeckten, dass die nicht protein-gebundenen Eisenionen durch die geringen Caeruloplasminkonzentrationen und die hohen Vitamin C- Spiegel, die die Ferroxidase-Aktivität hemmen (Powers et al., 1995), im Fe^{3+} -Zustand gehalten werden und somit prooxidativen Charakter besitzen.

Buonocore et al. (1998) stellten bei prämaternen Säuglingen einen höheren intraerythrozytären freien Eisengehalt als bei zeitig Geborenen und Erwachsenen fest. Diese Konzentration an intraerythrozytärem freien Eisen korrelierte negativ mit dem Gestationsalter und positiv mit einigen Hypoxieparametern wie Hypoxanthin-Plasmaspiegel, Blut-pH-Wert und Basenexzess. Sie schlossen daraus, dass Hypoxie bei der Geburt zu intraerythrozytärer Eisenfreisetzung führt und damit die Gefahr von oxidativer Schädigung durch Radikalbildung fördert. Ciccoli et al. (2003) untersuchten die Eisenfreisetzung in den Erythrozyten nach oxidativem Stress (hier aerobe Inkubation) und fanden in neonatalen Erythrozyten signifikant höhere freie Eisenkonzentrationen als in adulten. Auch hier war die Eisenfreisetzung bei hypoxischen Neugeborenen höher als bei normoxischen. Außerdem konnten die Autoren einen Zusammenhang zwischen intraerythrozytärer Eisenfreisetzung und nicht protein-gebundenem Eisen im Plasma ausmachen. Sie zeigten, dass die freien Eisenionen nach aerober Inkubation (oxidativer Stress) aus den Erythrozyten in das Inkubationsmedium diffundieren.

Das Auftreten von freien Eisenionen im neonatalen Plasma ist somit nicht nur eine Folge von unzureichenden Transferrinkonzentrationen, deren Eisenbindungskapazität überschritten wurde, sondern kommt auch durch eine intraerythrozytäre Eisenfreisetzung nach Hypoxie und oxidativem Stress zustande, bei der die freien Eisenionen aus den fetalen Erythrozyten ins Plasma diffundieren.

Es wird vermutet, dass die freien Eisenionen eine zentrale Rolle bei der Oxidation von Membranproteinen der Erythrozyten spielen, die zur Bildung von seneszentem Zellantigen (SCA) auf der Erythrozytenoberfläche führt und somit die Entfernung der neonatalen roten Blutzellen aus dem Blutstrom durch Makrophagen fördert. Dies könnte die physiologische Hyperbilirubinämie in den ersten Lebenswochen erklären (Berger et al., 1995, Comporti et al., 2002).

Das nicht protein-gebundene Eisen im Plasma, das in katalytisch wirksamer Form vorliegt, wird für eine Reihe von Neugeborenenenerkrankungen verantwortlich gemacht („free radical disease of the neonate“, siehe 2.3). So entdeckten Dorrepaal et al. (1996), dass freie Eisenionen bei der Neugeborenen-Asphyxie eine wichtige Rolle in der Entstehung radikalbedingter Gehirnschäden spielen, und sie einen wichtigen prognostischen Faktor für

die neuronale Entwicklung der Kinder darstellen. Buonocore et al. (2003) bestätigten dieses Ergebnis und gaben genaue Konzentrationen für nicht protein-gebundene Eisenionen an, bei denen es mit 100% iger Sicherheit zu einer guten oder beeinträchtigten neuronalen Entwicklung kommt.

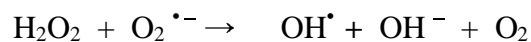
2.2.3 Hypoxie

Hypoxie tritt häufig in der perinatalen Phase auf und ist eine wichtige Ursache für die Morbidität von Neugeborenen. Sie kommt als Folge der neonatalen Asphyxie vor, die durch ein unphysiologisches oder gar ausbleibendes Einsetzen der Atmung nach der Geburt gekennzeichnet ist. Insbesondere bei Frühgeborenen ist die Intensität des ersten Atemzugs vermindert und das Surfactant-System noch nicht ausgereift, wodurch die Lunge nur unvollständig entfaltet wird. Lungenatelektasen und -kongestionen mit mangelndem Gasaustausch sind die Folge. Auch nach Geburtsverzögerungen wie Wehenschwäche, Torsio uteri, Lage-, Stellungs- oder Haltungsanomalien der Früchte und nach vorzeitiger Ablösung der Placenta fetalis sowie durch die Verlegung der Atemwege mit Fruchthüllen entstehen hypoxische Zustände im Neugeborenen.

Während der Hypoxie kommt es durch die herabgesetzte oxidative Phosphorylierung zu verminderter Produktion von ATP und damit zu einer Anhäufung von AMP und Hypoxanthin (HX). Letzteres dient als Substrat für das Enzym Xanthin-Oxidase, die während der Reperfusionphase mit dem wieder verfügbaren Sauerstoff verstärkt freie Radikale bildet:



Das Superoxid-Radikal kann mit dem Wasserstoffperoxid weiterreagieren und bildet dabei das hochreaktive Hydroxyl-Radikal:



Daneben gibt es weitere zelluläre Mechanismen, die während der Hypoxie zur Bildung freier Radikale führen, z.B. ein Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} , das verschiedene Enzymsysteme wie die Cyclooxygenase und Lipoxigenase aktiviert, die über den Arachidonsäure-Stoffwechsel freie Radikale bilden. Auch die Stickstoffmonoxid-Synthase kann aktiviert werden, wodurch Stickstoffmonoxid und andere reaktive Sauerstoffspezies wie Hydroxyl-Radikale produziert werden (Mishra and Delivoria-Papadopoulos, 1999). Bolli et al. (1987)

entdeckten, dass eisenkatalysierte Reaktionen eine entscheidende Rolle bei der myokardialen Dysfunktion nach Ischämie-/Reperfusionsvorgängen spielen und diese durch die Behandlung mit Desferrioxamin, einem Eisenchelator, wirkungsvoll unterbunden werden können. Während der Ischämie kommt es zu einem 30-fachen Anstieg von nicht protein-gebundenem Eisen, das bei sinkendem pH-Wert vom Speicherprotein Ferritin freigesetzt wird. Über die Fenton-Reaktion katalysieren diese freien Eisenionen die Bildung von Hydroxyl-Radikalen, die für die Reperfusionsschäden verantwortlich gemacht werden (Voogd et al., 1992).

Bei Mangel an zellulären hochenergetischen Verbindungen (ATP) kann es zu einer Eisenfreisetzung vom Ferritin in den Zellen oder vom Transferrin im Plasma kommen. Diese freien Eisenionen katalysieren über die Fenton-Reaktion die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Buonocore et al. (1998) untersuchten bei 164 neugeborenen Säuglingen die hypoxiebedingte Eisenfreisetzung und fanden eine signifikante Korrelation zwischen der Konzentration an intraerythrozytärem freien Eisen und dem pH-Wert und Basenexzess im Blut.

Mehrere Autoren haben einen Zusammenhang zwischen neonataler Hypoxie, hohen Plasmakonzentrationen an Hydroperoxiden und Malondialdehyd (als Marker für Lipidperoxidationen) und der Entwicklung der Neugeborenen festgestellt (Pitkanen et al. 1990; Supnet et al., 1994; Schmidt et al., 1996). Buonocore et al. (2000) untersuchten zusätzlich die Reaktion von freien Radikalen mit Proteinen nach Gewebehypoxie und fanden im Blut von 39 prämaternen asphyktischen Neugeborenen signifikant erhöhte Plasmaspiegel an Hydroperoxiden und advanced oxidation protein products (AOPP). Diese Ergebnisse bestätigten ihre Hypothese, dass Hypoxie die Bildung freier Radikale erhöht und für oxidativen Stress beim hypoxischen Neugeborenen sorgt.

2.3 Neugeborenenenerkrankungen durch reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies werden für eine Reihe von Erkrankungen des Neugeborenen verantwortlich gemacht. Dazu zählen u.a. die Retinopathie der Frühgeborenen (ROP), die bronchopulmonale Dysplasie (BPD, auch chronische Lungenkrankheit CLD), die nekrotisierende Enterocolitis (NEC) und intraventrikuläre Hämorrhagien.

Saugstad (1988) untersuchte das Hypoxanthin / Xanthin-Oxidase-System unter hypoxischen Bedingungen und stellte fest, dass die Xanthin-Oxidase während der Hypoxie aus der Leber in die Zirkulation freigesetzt wird. Während der Reoxygenation werden Sauerstoffradikale im

Übermaß produziert und verschiedene Organe angegriffen. Deshalb vermutete der Autor, dass es sich bei den verschiedenen Neugeborenenkrankheiten nicht um mehrere, sondern um verschiedene Erscheinungen einer Krankheit handelt. Diese sog. „oxygen radical disease in neonatology“ würde sich klinisch in dem Organ manifestieren, welches am schwersten betroffen ist.

Die größere Inzidenz dieser Erkrankungen bei Frühgeborenen lässt vermuten, dass Prämaturnität einige Faktoren für die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies beinhaltet. Sullivan (1988) schlug deshalb den Namen „oxygen radical disease of prematurity“ vor. Er war dabei aber der Ansicht, dass das gehäufte Auftreten dieser Erkrankungen bei Frühgeborenen eher mit dem verminderten antioxidativen Abwehrsystem als mit der Superoxid-Radikalbildung nach erhöhten Hypoxanthinkonzentrationen zu erklären ist, da prämaturne und mature Neugeborene gleich hohe Hypoxanthinspiegel im Blut aufweisen.

Die Hypothese der „oxygen radical disease of neonatology“ hat sich nicht bestätigt, doch gibt es immer mehr Beweise für eine Beteiligung freier Radikale bei Krankheitsprozessen wie der bronchopulmonalen Dysplasie, der Retinopathie der Frühgeborenen, der neonatalen nekrotisierenden Enterocolitis und intraventrikulären Hämorrhagien (Saugstad, 2001).

2.3.1 Retinopathie der Frühgeborenen

Die Retinopathie der Frühgeborenen ist eine vaskuläre Entwicklungsstörung der Retina, die nur bei prämaturnen Neugeborenen auftritt. Sie wurde erstmals von Terry 1942 beschrieben. In der Fetalentwicklung wachsen die Netzhautgefäße von der Papille ausgehend und erreichen beim Menschen um die 40. Schwangerschaftswoche die Peripherie (Ashton, 1970). Bei Frühgeborenen besteht eine avaskuläre Zone in der Netzhautperipherie, deren Breite von der Unreife des Neugeborenen abhängt. Nach der Geburt werden Frühgeborene wegen der Unreife ihrer Lungen mit zusätzlichem Sauerstoff beatmet, wodurch das Risiko eines wesentlich höheren arteriellen Sauerstoffdruckes entsteht. Die Netzhautvaskularisation durchläuft unter diesen Bedingungen eine vasotoxische Phase, in der es zu Vasokonstriktion (Flower et al., 1981), Radikalreaktionen (Penn, 1990; Niesman et al., 1997; Bonne et al., 1998; Verdejo et al., 1999) und Störung der Spindelzellmigration (Kretzer et al, 1986) kommt. In der vasotoxischen Phase sistiert die Netzhautvaskularisation, der periphere Fundus bleibt avaskulär. Kehrt der Frühgeborene nach der Beatmung wieder zu atmosphärischen Sauerstoffkonzentrationen zurück, schließt sich die vasoproliferative Phase an (D`Amore,

1994). Durch Hypoxie in den Wachstumszonen der Netzhaut kommt es zu einer Gefäßproliferation. Die Gefäße können in den Glaskörper wuchern und zu Glaskörperblutung, Traktion an der Netzhaut, Netzhautablösung und bindegewebiger Verschwartung des Glaskörpers führen.

Penn (1990) untersuchte in den Retinae von neonatalen Ratten, die direkt nach der Geburt mit 60% igem Sauerstoff beatmet wurden, die Produktion von Lipidperoxiden, den Verlust an mehrfach ungesättigten Fettsäuren und den retinalen Vitamin E- Spiegel. Alle Ergebnisse deuteten auf Peroxidationsreaktionen in den Retinae der sauerstoffbehandelten Ratten hin. Muller et al. (1997) konnten mit einer Elektronen-Spin-Resonanz (ESR)-spin-trapping-Analyse direkt zeigen, dass in der Retina während der ischämischen Phase Hydroxyl-Radikale gebildet werden. Diese OH^\bullet - Produktion ließ sich durch Radikalfänger (Superoxid-Dismutase und Katalase) verhindern, so dass vermutlich Wasserstoffperoxid als Zwischenprodukt der Radikalbildung auftritt.

2.3.2 Bronchopulmonale Dysplasie

Auch bei der bronchopulmonalen Dysplasie, die bei prämaternen Säuglingen vor über 30 Jahren das erste Mal beschrieben wurde (Northway et al., 1967), spielen Sauerstoffradikale in der Pathogenese eine wichtige Rolle. Die unreifen Lungenstrukturen des Frühgeborenen sowie der Mangel an Surfactant und an antioxidativen Abwehrmechanismen erhöhen die Gefahr von oxidativen Lungenschäden nach künstlicher Beatmung und Sauerstofftherapie, die bei zu schwacher Eigenatmung durchgeführt werden müssen. Moison et al. (1993) gingen von den zwei pathogenetischen Faktoren aus, dass die Krankheit durch einen Mangel an Surfactant und durch austretendes Plasma in den Alveolarspalt verursacht wird. In ihrer Studie zeigten sie, dass diese beiden Prozesse zusammenhängen. Nicht protein-gebundenes Eisen im Plasma der Neugeborenen stimulierte die Peroxidation von Surfactant. Kommt es zu einer Frühgeburt, ist das Surfactant-System in der Lunge noch nicht vollständig ausgereift. Durch eine Sauerstofftherapie nach der Geburt kann eisengesättigtes Transferrin durch die radikalgeschädigten unreifen Alveolargefäße in den Alveolarspalt austreten und über eine Peroxidation der ohnehin geringen Mengen an Surfactant die chronische Lungenkrankheit auslösen.

Harnsäure gilt beim Menschen als eines der effektivsten wasserlöslichen Antioxidantien. Bei der Reaktion mit Sauerstoffradikalen wird sie in der Hauptsache zu Allantoin oxidiert. Ogihara et al. (1996) bestimmten bei neugeborenen Säuglingen die Allantoin-

Konzentrationen im Plasma als in vivo-Marker für das Auftreten freier Radikale. Sie verglichen die Werte von Neugeborenen mit und ohne chronische Lungenkrankheit (CLD). Die signifikant erhöhten Plasmawerte für Allantoin und für das Allantoin/Harnsäure-Verhältnis bei den Kindern mit CLD deuten auf eine gesteigerte Produktion freier Radikale im Plasma während der frühen neonatalen Periode hin. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Schrod et al. (1997), die das Verhältnis Malondialdehyd (als Marker für oxidativen Stress) / Harnsäure im Plasma von Neugeborenen untersuchten und bei Kindern mit schwerer CLD signifikant niedrigere Harnsäurespiegel in Bezug auf Malondialdehyd feststellten. Dagegen fanden Winterbourn et al. (2000) keinen Zusammenhang zwischen der Konzentration an Malondialdehyd bzw. Proteincarbonylen im Plasma von Frühgeborenen und dem Auftreten von chronischer Lungenkrankheit oder Retinopathie der Frühgeborenen. Sie erklärten sich dieses Ergebnis mit einem mehr lokalisiert ablaufenden Prozess des oxidativen Stresses, bei dem die erhöhten Protein- und Lipidmarker durch eine Verdünnung im Blut undeutlich werden. Diese Vermutung wird durch die erhöhten Proteincarbonyl- und Malondialdehyd-Werte im Trachealsekret der selben Frühgeborenen bestätigt (Buss et al., 2000).

2.3.3 Neonatale nekrotisierende Enterocolitis

Die nekrotisierende Enterocolitis ist eine multifaktorielle Erkrankung, die vorwiegend bei Neugeborenen auftritt und schwere nekrotisierende Schäden im Darmtrakt verursacht. Obwohl einige prädisponierende Faktoren wie Präamaturität (De Curtis et al., 1987), Asphyxie und Ernährung über Ersatzmilch (Caplan et al., 1994) sowie Infektionen eine Rolle spielen, bleibt die genaue Pathogenese unklar. Das initiale Ereignis stellt möglicherweise eine perinatale Hypoxie oder eine leichte postnatale Infektion dar, die zu geringgradigen Schleimhautschäden im Darm führen (Hsueh et al., 2002). Bakterien können sich aufgrund der bei Frühgeborenen noch unreifen Schleimhautbarriere am geschädigten Darmepithel anheften und die Freisetzung von plättchenaktivierendem Faktor (PAF) und Tumornekrose-Faktor (TNF) fördern. Durch lokale Anhäufung von PAF, der die Permeabilität des Darmepithels erhöht, können Bakterien oder Bakterienprodukte (Lipopolysaccharide, LPS) in die Schleimhaut eindringen. PAF löst zusammen mit TNF und/oder LPS eine Entzündungskaskade aus: Aktivierung polymorphkerniger Neutrophiler, Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Komplementaktivierung, Induktion proinflammatorischer Zytokine und Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies und Entzündungsmediatoren (Hsueh et al., 1986 und 1988; Granger, 1988; Sun und Hsueh, 1991; Huang et al., 1994). Durch Vasokonstriktion kommt es

zu Ischämie und anschließender Reperfusion. Dabei wird die Xanthin-Oxidase aktiviert und massenhaft Superoxid-Radikale gebildet (Granger, 1988). Die zentrale Rolle der Xanthin-Oxidase und der reaktiven Sauerstoffspezies bei der Verursachung der Darmschäden wird durch Vorbehandlung mit Allopurinol, einem Xanthin-Oxidase-Hemmer, der die PAF-induzierte Darmnekrose größtenteils verhindert, deutlich (Qu et al., 1999). Auch eine Infusion mit Superoxid-Dismutase und Katalase linderte die Darmschäden (Cueva und Hsueh, 1988).

2.3.4 ROS - Erkrankungen bei neugeborenen Tieren

In der Tiermedizin wurden bisher nur vereinzelte Untersuchungen über den Zusammenhang von neonatalen Erkrankungen und oxidativem Stress durchgeführt. Doch ist auch bei neugeborenen Tieren aufgrund niedriger Antioxidantienghalte und des verschlechterten antioxidativen Status im Blut (Schweigert et al., 1998; Inanami et al., 1999; Zanker et al., 2000; Stohrer et al., 2001) mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress und mit vermehrten Zellschäden durch freie Radikale zu rechnen.

Die nutritive Muskeldystrophie (Weißmuskelkrankheit) tritt sowohl bei Neugeborenen als auch bei älteren Jungtieren auf und wird durch einen Mangel an Vitamin E und/oder Selen verursacht. Das Krankheitsbild der hyalinscholligen Muskeldegeneration vom Zenkerschen Typ kommt bei Fohlen, Kälbern, Lämmern und jungen Schweinen vor. Zwei Verlaufsformen werden je nach Zeitpunkt des Auftretens unterschieden. Die intrauterin präformierte und unmittelbar post natum klinisch manifest werdende Muskeldystrophie entsteht durch eine präpartale Mangelsituation aufgrund unzureichender Antioxidantienghalte im maternalen Futter oder durch einen verminderten Transfer von Selen und/oder Vitamin E über die Plazenta (Plazentablock). Die sich im Verlauf der frühen Jungtierentwicklung langsam ausbildende zweite Form erklärt sich durch den hohen Bedarf des heranwachsenden Tieres an Vitamin E bei gleichzeitiger nutritiver Unterversorgung. Durch den Mangel an den Antioxidantien Vitamin E und Glutathion-Peroxidase können freie Radikale oxidative Schäden im Muskelgewebe anrichten. Sie oxidieren dabei ungesättigte Fettsäuren der Zellmembranen zu Lipidperoxiden und setzen radikale Kettenreaktionen in Gang. Die myodegenerative Erkrankung tritt am Herz- und Skelettmuskel auf (Lofstedt, 1997; van Winden und Kuiper, 2002).

Perinatale Asphyxien werden beim Fohlen für das Fehlanpassungssyndrom (engl.: neonatal maladjustment syndrome) verantwortlich gemacht. Die neurologische Erkrankung wird mit

der hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie (HIE) neugeborener Menschen gleichgesetzt (MacLeay, 2000; Wilkins, 2003). In der älteren Literatur wurde als alleinige auslösende Noxe die geburtsbedingte Hypoxie angesehen. Diese lässt sich jedoch nicht bei allen betroffenen Fohlen nachweisen, so dass auch präpartale hypoxische Zustände (z.B. durch verminderte Durchblutung der Gebärmutter, verringerte Sauerstoffsättigung des maternalen Blutes, Plazentadysfunktionen) als Ursache in Frage kommen. Zusätzlich werden andere Faktoren wie frühkindliche Epilepsie und stoffwechselbedingte retardierte Gehirnentwicklung diskutiert.

Die ischämisch-nekrotischen Areale und perivaskulären Hämorrhagien, die im Gehirn dieser Fohlen post mortem festgestellt werden können, werden durch reaktive Sauerstoffspezies während Ischämie-Reperfusion-Vorgängen verursacht. Der Sauerstoffmangel führt zu einer verminderten oxidativen Phosphorylierung im Gehirn, die mit einer reduzierten Energieproduktion einhergeht. Die Na^+/K^+ -Pumpe kann den Ionengradienten an den Zellmembranen nicht mehr aufrechterhalten und als Folge strömt Kalzium in die Nervenzellen ein. Über die Aktivierung kalziumabhängiger Proteasen, Lipasen und Endonukleasen kommt es zur Radikalbildung und zum Zelltod. In der Reperusionsphase werden durch die exzessive Bildung und Freisetzung von Sauerstoffradikalen, Stickstoffmonoxid und Neurotransmittern weitere Nervenzellen geschädigt (Wilkins, 2003).

Im Hinblick auf die neonatale nekrotisierende Enterocolitis wurden Ischämie-Reperfusion-Schäden im Darm auch bei neugeborenen Tieren untersucht. Harisch et al. (1989) bestimmten bei Kälbern der Rasse „Schwarzbunte“ nach einer experimentellen Ischämie- und anschließender Reperusionsphase die Aktivität der Xanthin-Oxidase und der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase (als Quelle für Sauerstoffradikale) in der Darmschleimhaut. Die Aktivität der Xanthin-Oxidase stieg während der Reperusionsphase signifikant an, während die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase die ganze Zeit über niedrig blieb. Eine während der Reperfusion lokal intraarteriell oder intraluminal vorgenommene Applikation von Kupfersuccinat, einer leicht resorbierbaren Substanz mit Superoxid-Dismutase-Eigenschaften, verminderte die Produktion von Superoxid-Radikalen durch die Xanthin-Oxidase und damit die Bildung von Malondialdehyd als Lipidperoxidationsprodukt in den intestinalen Mukosazellen.

Bei neugeborenen Schweinen untersuchten Papparella et al. (1997) die Auswirkungen eines vorübergehenden Verschlusses der *A. mesenterica superior* auf die Entwicklung von histopathologischen Darmschäden und bestimmten die Bildung von Arachidonsäure-

Stoffwechsel-Produkten (z.B. Prostanoiden; als Quelle für Sauerstoffradikale) sowie die Fähigkeit von Radikalfängern, die Darmschäden abzuschwächen. Der einstündige arterielle Verschluss und die anschließende Reperfusionphase resultierten in schweren Gewebeschäden mit Schleimhautnekrosen, Zerstörung des Oberflächenepithels sowie Hämorrhagien und Ödemen in der Submukosa. Während der frühen Reperfusionphase kam es zu einem signifikanten Anstieg von Prostanoiden (gemessen als Prostaglandin F1 α). Die Autoren konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit Superoxid-Dismutase und Katalase vorbehandelten Ferkeln und der Placebo-Gruppe feststellen.

Hansbrough et al. (1983) untersuchten bei neugeborenen Hundewelpen, die entweder bei der Mutterhündin saugten oder mit Milchaustauscher gefüttert wurden, den Einfluss von hypoxischem Stress auf die Entwicklung einer nekrotisierenden Enterocolitis. Nach 2-stündiger Beatmung mit einem 10% igen Sauerstoff-Gemisch und anschließender Reoxygenation mit 21% igem Sauerstoff wurden Gewebeproben aus dem Magendarmtrakt entnommen und lichtmikroskopisch untersucht. Von den 12 hypoxiestressierten, künstlich gefütterten Welpen wiesen 10 pathologische Veränderungen auf, während nichthyperoxische Kontrollwelpen und die bei der Mutterhündin saugenden Welpen keine Alterationen zeigten. Die Darmschäden waren vergleichbar mit denen, die in den Anfangsstadien der nekrotisierenden Enterocolitis gefunden werden. Dazu zählen Hyperämie der Mukosa und Submukosa, Ablösung der apikalen Darmzottenepithelien, fokale Hämorrhagien und zelluläre Entzündungsanzeichen.

3 Aufzucht von Hundewelpen ohne Muttermilch

Verschiedene Situationen stellen eine klare Indikation zur mutterlosen Aufzucht von Hundewelpen dar. So ist sie eine lebensrettende Maßnahme bei Tod oder schwerer Erkrankung der Mutterhündin. Schwache und kranke Welpen, die nicht in der Lage sind, selbstständig bei der Mutter zu saufen, können durch Handaufzucht evtl. am Leben erhalten werden. Hier ist im Einzelfall zu prüfen, ob dies vertretbar ist. Bei Fehlverhalten seitens des Muttertieres, z.B. Abstoßen der Welpen, aggressives Verhalten oder übertriebene Brutpflege, sollten die Neugeborenen von der Hündin getrennt werden. Dem Züchter stellt sich hierbei allerdings die Frage nach einer möglichen erblichen Komponente und dem Ausschluss dieser Tiere aus der Zucht. Extrem große Würfe bzw. Milchmangel stellen keine notwendige

Indikation zur mutterlosen Aufzucht dar, jedoch sollten die Welpen mit Ersatzmilch zugefüttert werden (Kienzle und Landes, 1995).

3.1 Muttermilch versus Ersatzmilch

Die intestinale Mikroflora von Kindern, die mit Muttermilch oder mit Ersatzmilch gefüttert werden, unterscheidet sich hinsichtlich ihrer Zusammensetzung aus anaeroben, fakultativ anaeroben und aeroben Bakterienspezies. Bei gestillten Säuglingen dominieren Bifidobakterien, Streptokokken und Staphylokokken, während die Konzentrationen an Clostridien, Enterobakterien und Enterokokken, die bei ersatzmilchgefütterten Kindern die Hauptflora darstellen, geringer ausfallen (Bullen et al., 1976; Stark und Lee, 1982; Balmer und Wharton, 1989). Auch bei Hundewelpen, die mit Muttermilch aufgezogen werden, besteht die Hauptflora aus anaerob und fakultativ anaerob lebenden Arten, die Milchsäure und andere kurzkettige Fettsäuren bilden (Bacteroides, Laktobazillen, Streptokokken, Peptostreptokokken, Bifidobakterien und Eubakterien). Die fakultativ pathogene Begleitflora stellen hauptsächlich E.coli und Enterokokken dar, während Cl. perfringens, Staphylokokken, Proteus und Pseudomonas spp. nur in geringen Konzentrationen vorkommen (Smith, 1965; Mitsuoka et al., 1976).

Decuypere und Van der Heyde (1972) studierten die gastrointestinale Flora von gesäugten sowie von früh abgesetzten, künstlich ernährten Ferkeln. Letztere erhielten verschiedene Futterzusammensetzungen (flüssige und trockene Nahrung) aus unterschiedlichen Fütterungssystemen. In den oberen Teilen des Darmes herrschten bei den Ferkeln, die mit flüssiger Ersatzmilch gefüttert wurden, obligate Anaerobier, Enterobakterien und Enterokokken vor, während Laktobazillen nur in geringer Zahl vorhanden waren. Die mit Trockenfutter ernährten Ferkel (Milch- und Sahnepulver + Vitamin- und Mineralmischung) wiesen eine ähnliche gastrointestinale Flora wie die saugenden Ferkel auf, die hauptsächlich aus Laktobazillen bestand. Aber auch hier war die Zahl der Coliformen erhöht.

Es liegen eine Reihe von Studien vor, die aufzeigen, dass Muttermilch einen besseren Schutz gegen Durchfallerkrankungen, Harnwegsinfektionen, Septikämien, nekrotisierende Enterocolitiden und andere Infektionskrankheiten des Neugeborenen verleiht als Milchaustauscher (Wold und Adlerberth, 2000). So finden sich in der Darmflora von Neugeborenen, die mit Muttermilch ernährt werden, mehr apathogene E. coli-Stämme mit Typ 1- Fimbrien als bei

Ersatzmilchernährten. Dagegen werden *E. coli* mit P-Fimbrien, die als Virulenzfaktor gelten, weniger häufig aus ihren Fäzes isoliert (Slaviková et al., 1995).

Das in der Frauenmilch reichlich vorhandene Lysozym besitzt bakterizide Eigenschaften und schützt den Neugeborenen vor gastrointestinalen Infektionen. Im Stuhl von gestillten Kindern lässt sich das Lysozym nachweisen während es bei künstlich ernährten Säuglingen im Allgemeinen fehlt. Auch die Neuraminsäure und bestimmte Positionsisomere der Linolsäure, die in der Frauenmilch in wesentlich höheren Konzentrationen als in der Kuhmilch vorkommen, besitzen antibakterielle Eigenschaften (Braun, 1976).

Lucas und Cole (1990) fanden in einer prospektiven Studie an 926 frühgeborenen Babys bei den mit Ersatzmilch gefütterten Neugeborenen eine 6-10 mal höhere Inzidenz von nekrotisierender Enterocolitis als bei den mit Muttermilch gestillten. Pitt et al. kamen bereits 1977 zu einem ähnlichen Ergebnis bei neugeborenen Ratten. Sie machten mononukleäre Makrophagen, die die verursachenden pathogenen Darmbakterien phagozytierten, für den Schutzmechanismus in der Milch verantwortlich. Auch bei neugeborenen Hundewelpen konnten über Vorzüge der Muttermilch berichtet werden. So blieben gesäugte Welpen im Gegensatz zu Welpen, die mit Milchaustauschern gefüttert worden waren, vor hypoxiebedingten gastrointestinalen Schäden bewahrt (Hansbrough et al., 1983).

Des Weiteren reduziert Muttermilch bei neugeborenen Ratten Translokationen von Bakterien aus dem Darm und vermindert damit das Auftreten neonataler Septikämien (Steinwender et al., 1996; Yajima et al., 2001). Câmara et al. (1994) schrieben diesen Effekt dem sekretorischen Immunglobulin A (sIgA) aus der Muttermilch zu, das die pathogenen Keime im Darm abfängt und eine Adhäsion an die Schleimhaut verhindert. Selbst bei Vorhandensein der gleichen pathogenen Spezies im Darm zeigten deshalb gestillte Säuglinge weniger Krankheitssymptome als mit Ersatzmilch gefütterte.

Durchfall stellt eine der häufigsten Jungtiererkrankungen dar und tritt bevorzugt bei gestörter intestinaler Mikroflora auf. Drastische Futterwechsel, mangelnde Futterqualität, Stresssituationen sowie zu frühes Absetzen von der Muttermilch begünstigen ein Überhandnehmen von fakultativ pathogenen Keimen im Darm oder ermöglichen pathogenen Bakterien, sich im Darm anzusiedeln. Muttermilch besitzt eine nur geringe Pufferkapazität, die den pH-Wert im Darm während der bakteriellen Fermentation von Laktose abfallen lässt. Bei pH-Werten von 4,8 - 5,6 zeigen milchsäurebildende Bakterien reges Wachstum während *E. coli*-Bakterien gehemmt werden. Die Fäzes von Neugeborenen, die mit Ersatzmilchpräparaten gefüttert wurden, weisen einen alkalischeren pH-Wert auf und enthalten daher weniger Laktobazillen und wesentlich mehr *E. coli* (Bullen et al., 1976).

Auf der Suche nach Abwehrmechanismen und Komponenten in der Muttermilch, die vor neonatalen Infektionen schützen und die Milchaustauschern zur besseren Angleichung an die natürlichen Verhältnisse zugesetzt werden könnten, entdeckten Bullen et al. (1972), dass das eisenbindende Lactoferrin aus der Milch von Meerschweinchen bei den saugenden Ferkeln die Kolonisation von oral verabreichten *E. coli* verhindert. Die Zugabe von Eisen verursachte einen dramatischen Anstieg der *E. coli*-Zahlen im Darm dieser Tiere. Teraguchi et al. (1995) zeigten in einem *in vivo*-Mausmodell, dass oral verabreichtes bovines Lactoferrin einen bakteriostatischen Effekt auf die Proliferation verschiedener Clostridien-Spezies ausübt. Auch de Araujo und Giugliano (2001) machten Lactoferrin für die Hemmung der Adhäsion enteropathogener *E. coli* (EPEC) an die Darmschleimhaut verantwortlich. Daneben fanden die Autoren in Frauenmilch ein weiteres Glykoprotein (free secretory component, fSC) und sekretorisches Immunglobulin A, die wichtige Abwehrfaktoren gegen EPEC-Infektionen bei Neugeborenen darstellen.

3.2 Auswirkungen auf den antioxidativen Status

Muttermilch besitzt einige antioxidative Eigenschaften, die sauerstoffinduzierte Gewebeschäden bei Neugeborenen direkt beeinflussen können. Bereits 1951 vermuteten Sanford et al. einen Zusammenhang zwischen der Fütterung von Muttermilch und einer geringeren Inzidenz von retrolentaler Fibroplasie (Retinopathie der Frühgeborenen). Selbst eine Teilernährung mit Muttermilch halbierte die Auftretenshäufigkeit der Retinopathie im Vergleich zu reiner Ersatzmilchfütterung (Johnson et al., 1985).

Neugeborene Ratten und menschliche Säuglinge erkrankten wesentlich seltener an nekrotisierender Enterocolitis, wenn sie mit Muttermilch anstelle von Milchaustauscher gefüttert wurden (Pitt et al., 1977; Lucas und Cole, 1990). Die Autoren deuteten an, dass bestimmte Faktoren aus der Milch für diesen Effekt verantwortlich sein könnten.

Marshall et al. (1990) untersuchten Frauenmilch und verschiedene Ersatzmilchpräparate auf ihren Gehalt an Lipidperoxiden, die für den Neugeborenen eine exogene Quelle an freien Radikalen darstellen und sein antioxidatives Abwehrsystem zusätzlich belasten können. Dabei stellten sie bei den kommerziellen Ersatzmilchpräparaten eine bereits vor Gebrauch vorhandene Peroxidation fest, deren Grad von der Zusammensetzung der Nahrung abhing. Hohe Konzentrationen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren sowie an Eisen förderten die Peroxidation, während sich hohe Vitamin E- Gehalte schützend auswirkten.

Eine Studie an Rattenwelpen zeigte, dass die Administration von peroxidierten Fetten Wachstumsdepressionen und eine verlangsamte Erholung nach Ganzkörperbestrahlung nach sich ziehen kann (Andrews et al., 1960). Die Verfütterung einer Diät mit oxidierten Fetten an 10-Tage alte Broiler führte zu vermindertem Wachstum und beeinträchtigtem antioxidativen Status. Die Plasmakonzentrationen an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen waren signifikant erhöht und die α -Tocopherol-, β -Carotin- und Retinol- Spiegel in Plasma und Gewebe deutlich erniedrigt (Engberg et al., 1996). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Turek et al. (2003) bei 2-Monate alten Coonhound-Welpen, die nach der Verfütterung von oxidierten Diäten eine reduzierte Gewichtsentwicklung und Knochenbildungsrate sowie erniedrigte Vitamin E- Konzentrationen im Serum aufwiesen. Zusätzlich waren einige Parameter der zellulären Immunantwort, wie die Lymphozytenreifung und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch aktivierte Monozyten und Neutrophile beeinträchtigt. Auch die Ergebnisse von van Zoeren-Grobbe et al. (1993), Almaas et al. (1997), Friel et al. (2002) und Raghuveer et al. (2002), die freie Radikale bzw. Lipidperoxidationsprodukte in Muttermilch und Milchaustauschern bestimmten, deuten auf eine geringere Anfälligkeit der Muttermilch gegenüber oxidativem Stress hin.

Da die antioxidativen Vitamine E, A und C in Ersatzmilchpräparaten i.d.R. stark angereichert werden und in höheren Konzentrationen als in der Milch vorkommen, muss es noch andere protektive Faktoren in der Muttermilch geben. Die antioxidativen Enzyme Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase und Katalase kommen in spezies- und fütterungsabhängig unterschiedlichen Konzentrationen in der Milch vor (Lindmark-Månsson und Åkesson, 2000). Bei Supplementierung zu Milchaustauschern vermitteln sie einen erhöhten Schutz gegen oxidativen Stress und Radikalschäden. Nach Pasteurisierung der Milch und Inaktivierung der Enzyme bleiben die antioxidativen Eigenschaften der Milch jedoch erhalten, so dass die Enzyme nicht für den vollen Schutzmechanismus verantwortlich gemacht werden können (Friel et al., 2002).

Um Eisenmangelanämien bei Neugeborenen vorzubeugen, werden Ersatzmilchpräparate mit Eisen angereichert, dessen Bioverfügbarkeit durch Vitamin C- Zugaben noch erhöht wird. Da freie Eisenionen und Vitamin C in der Lage sind, die Bildung von Hydroxyl-Radikalen zu katalysieren, untersuchten Almaas et al. (1997) die Bildung von freien Radikalen in Humanmilch und in verschiedenen eisenangereicherten Milchaustauschern nach der Zugabe von Ascorbinsäure. Mit steigendem Eisengehalt erhöhte sich die Radikalproduktion, was mit

den Ergebnissen von Marshall und Roberts (1990) im Einklang steht, die eine signifikante Korrelation zwischen der Bildung von Lipidperoxiden und den Eisenkonzentrationen in verschiedenen Ersatzmilchpräparaten feststellten. Zusätzlich senkte die Zugabe von Eisenbindern wie DETAPAC (diethylene-triamine-pentaacetic acid; Friel et al., 2002) oder Katalase und Desferrioxamin (Almaas et al., 1997) zu den Milchaustauschern die Bildung von freien Radikalen. Da Radikalreaktionen in der Muttermilch auch dann in geringerem Maße auftreten, wenn der Eisengehalt auf das Niveau von Milchaustauschern angehoben wird, kann der Eisengehalt an sich keine ausreichende Erklärung für die unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress sein (Almaas et al., 1997).

Das eisenbindende Protein Lactoferrin, das in hohen Konzentrationen in der Milch und in anderen Körperflüssigkeiten gefunden wird, weist neben antimikrobiellen auch antioxidative Eigenschaften auf. Gutteridge et al. (1981b) zeigten, dass Lactoferrin durch die Bindung von Eisen (III)- Ionen Lipidperoxidationen verhindert. Mit dieser Erkenntnis führten Satué-Gracia et al. (2000) und Raghuvier et al. (2002) in vitro-Versuche mit Lactoferrin-Zusätzen zu Humanmilch und Ersatzmilchpräparaten durch und stellten verringerte Lipidperoxidationen fest. Nimmagudda et al. (1999) zeigten in einem experimentellen Ratten-Modell, dass eine orale Vorbehandlung mit Lactoferrin alkoholinduzierte Lipidperoxidationen und DNA-Schäden in der Magendarmschleimhaut der Tiere verhindern kann. Sie führten diesen antioxidativen Effekt aufgrund vergleichbarer Ergebnisse mit dem Eisenchelator Desferrioxamin auf die eisenbindenden Eigenschaften des Lactoferrins zurück.

So trägt Lactoferrin in der Muttermilch zu den antioxidativen Schutzmechanismen mit bei. Ob supplementiertes Lactoferrin in Ersatzmilchpräparaten die intestinale Schleimhaut von Neugeborenen vor eiseninduzierten Oxidationsschäden schützen kann, bleibt noch zu klären.

4 Prophylaktische und therapeutische Beeinflussung des antioxidativen Abwehrsystems

Die endogenen Schutzfaktoren gegen oxidativen Stress können durch dem Körper zugeführte Substanzen in ihrer Wirkung positiv beeinflusst werden. Auch können exogene Wirkstoffe direkt die durch reaktive Sauerstoffspezies entstandenen Schäden reduzieren. Die wichtigsten Ansatzpunkte therapeutischer Stoffe sind eine Verhinderung der Bildung von ROS, ein enzymatisches Abfangen bereits gebildeter Sauerstoffradikale, ein nichtenzymatisches Inaktivieren der Radikale und eine Verminderung der schädlichen Wirkungen von ROS auf

Zellen und Gewebe. Da die Palette der in der Veterinärmedizin verfügbaren Präparate mit antioxidativer Wirkung insbesondere beim Nutztier gering ist und eine Verträglichkeit bei Neugeborenen nicht immer gegeben ist, muss ein größeres Augenmerk auf alternative Therapiemöglichkeiten gelegt werden.

4.1 Antioxidative Pharmaka

Ischämie-/Reperfusionsschäden können durch eine Reihe von Pharmaka beeinflusst werden. Shadid et al. (1999a) stellten einen signifikanten Effekt des Eisenchelators Desferrioxamin auf Reperfusionsschäden am Herzen von neugeborenen Lämmern fest. Die während der Ischämie massenhaft freigesetzten freien Eisenionen werden durch Desferrioxamin gebunden und sind somit nicht mehr in der Lage, die Bildung von Hydroxyl-Radikalen zu katalysieren, die in der Reperfusionsphase die Myokardschäden verursachen. In einer weiteren Studie untersuchten sie die Wirkung des Xanthin-Oxidase-Hemmers Allopurinol und fanden eine verbesserte Pumpleistung des Herzens durch Reduzierung der Nachlast. Allerdings senkte Allopurinol die Harnsäurespiegel und damit die antioxidative Kapazität der neugeborenen Tiere (Shadid et al., 1999b). Shen et al. (2000) entdeckten, dass kardiale Muskelzellen durch Chinonin, einem natürlichen antioxidativen Extrakt aus einer chinesischen Arznei, vor apoptotischem und nekrotischem Zelltod nach Hypoxie-/Reoxygenations-Prozessen bewahrt werden. Die antioxidativen Eigenschaften beziehen sich auf das Abfangen von Stickstoffmonoxid und reaktiven Sauerstoffspezies und verringern damit die Entstehung von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen. Die intrakardiale Infusion von N-2-mercapto-propionylglycine (MPG) nach 90-minütiger Ischämie reduzierte Lipidperoxidationen und Nekrosebereiche im Herz von Hunden und bot damit einen signifikanten kardioprotektiven Schutz gegen oxidativen Stress (Tripathi et al., 2000).

Studien beim Menschen haben gezeigt, dass die Aufnahme von Vitamin-Ergänzungspräparaten oder von Nahrungsmitteln, die reich an Antioxidantien sind, das Risiko von Krebs und Herzerkrankungen deutlich senken kann (Block et al., 1992; Keli et al., 1996). Heaton et al. (2002) untersuchten den Effekt einer oralen Supplementierung von Vitamin C, Vitamin E, Taurin, Lutein, Lycopene und β -Carotin an adulte Hunde. Sie stellten einen signifikanten Anstieg der Vitamin E- und Taurin- Plasmaspiegel sowie der totalen antioxidativen Aktivität (gemessen als ferric-reducing antioxidant power assay, FRAP) fest. Nach 8 Wochen zeigten die supplementierten Hunde im Vergleich zu den Kontrolltieren eine

deutliche Reduzierung von endogenen und exogenen DNA-Schäden. Dies deutet auf einen erhöhten Schutz vor Radikalangriffen und/oder auf gesteigerte Reperaturvorgänge von geschädigter DNA durch die Antioxidantien hin. Zwei, vier und sechs Wochen nach einer Tollwutimpfung waren die vakzinespezifischen virusneutralisierenden Antikörperspiegel bei den behandelten Hunden signifikant höher. Da die Akkumulation von DNA-Schäden einen abträglichen Effekt auf die Wirksamkeit des Immunsystems ausübt, erklärten sich die Autoren die verbesserte Immunantwort der supplementierten Hunde mit der deutlichen Reduzierung der DNA-Schäden.

Bei Kühen bewirkte die Supplementierung mit Vitamin E und Selen eine tendenziell geringere Inzidenz von Nachgeburtsverhalten (Brzezinska-Slebodzinska et al., 1994). Die Verfütterung eines Vitamin-Cocktails bestehend aus α -Tocopherol, β -Carotin und Lutein an Schlittenhunde ließ die Plasmaspiegel der Antioxidantien ansteigen und die DNA-Oxidationen sowie Lipidperoxidationen nach körperlicher Anstrengung signifikant absinken (Baskin et al., 2000). Daneben gibt es jedoch eine Reihe von Studien, die keine Effekte von supplementierten Antioxidantien feststellen konnten. So beeinflusste eine Vitamin C- Gabe an Greyhounds weder die antioxidative Kapazität (TEAC) noch die Oxidationsprodukte (TBARS) im Blut und schien die Hunde bei einem 500-Meter-Rennen eher zu verlangsamen (Marshall et al., 2002).

Seit einigen Jahren ist Melatonin als potenter Radikalfänger bekannt. Es reagiert mit einer Reihe von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies wie dem Hydroxyl-Radikal, Wasserstoffperoxid, einatomigem Sauerstoff, Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit. Alle bekannten Zwischenprodukte, die bei der Reaktion mit freien Radikalen entstehen, besitzen ebenfalls Radikalfängereigenschaften. Dadurch wird Melatonin zu einem sehr effektiven Antioxidans. In vivo zeigt es beim Schutz vor sauerstoffinduzierten Schäden häufig höhere Wirkungen als vergleichbare Dosierungen von Vitamin E und C (Reiter und Tan, 2003). Bei Ischämie-/Reperfusion-Prozessen wirkt sich Melatonin selbst bei einer einmaligen Gabe schützend auf die Herzmuskelzellen aus, in dem es die Superoxid-Radikal-Bildung reduziert und die Einwanderung von Neutrophilen in das reperfundierte Gewebe vermindert (Lee et al., 2002). Amyloid- β -Ablagerungen im Gehirn, die häufig bei der Alzheimer Erkrankung zu finden sind, verursachen durch reaktive Sauerstoffspezies und neuroinflammatorische Mechanismen neuronale Degenerationen und Zelltod. Rosales-Corral et al. (2003) untersuchten die Wirkung von oral verabreichtem Vitamin E, C und Melatonin auf die neurotoxischen Effekte von fibrillärem Amyloid- β , dass sie in die CA1-Region des

Hippocampus von Ratten injizierten. Die Nitrit-Konzentrationen und Lipidperoxidationsprodukte im Gehirn der Ratten wurden durch alle drei Antioxidantien gleichermaßen verringert. Zusätzlich zeigte Melatonin eine hohe Kapazität bei der Reduzierung der proinflammatorischen Zytokin-Antwort (IL-1 β , IL-6 und TNF- α).

Bei Neugeborenen werden Antioxidantien mit unterschiedlichem Erfolg eingesetzt. Frühe klinische Studien von Rosenfeld et al. (1984), die die Wirkung von boviner Superoxid-Dismutase bei bronchopulmonaler Dysplasie untersuchten, wurden wegen der mangelnden Wirksamkeit von ungebundener SOD kritisiert. Das ungebundene Enzym besitzt eine nur geringe Halbwertszeit, wenn es intravenös oder intratracheal verabreicht wird und kann in dieser Form von den Zellen nicht aufgenommen werden. Turrens et al. (1984) supplementierten Ratten dagegen eine in Liposomen eingekapselte Superoxid-Dismutase und Katalase. Sie stellten bei den Tieren eine signifikant längere Überlebenszeit nach oxidativem Stress im Vergleich zu Kontrolltieren, die Kochsalzlösung oder freies Enzym erhielten, fest. Auch die Konjugation mit Polyethylen-Glykol (PEG) verlängerte die Halbwertszeit der SOD und Katalase und verbesserte ihre Aufnahme in Endothelzellen, die dadurch vor schädlichen Einflüssen durch reaktive Sauerstoffspezies bewahrt wurden (Beckman et al., 1988).

Der Einsatz von Vitamin E zur Prophylaxe der bronchopulmonalen Dysplasie war bisher enttäuschend und brachte keine Vorteile (Ehrenkranz et al., 1979; Saldanha et al., 1982). Jenkinson et al. (1991) untersuchten im Hinblick auf das neonatale Atemnotsyndrom den Effekt des Xanthin-Oxidase-Hemmers Allopurinol bei mit 100% Sauerstoff therapierten prämaternen Pavianen. Die mit Allopurinol behandelten Tiere wiesen weniger Entzündungszellen und Flüssigkeit im Lungengewebe auf und zeigten eine vermehrte Induktion der Glutathion-Konzentrationen und der antioxidativen Enzymaktivitäten in der Lunge.

Die pränatale Administration von Kortikosteroiden an trächtige Ratten stimuliert die Surfactantbildung und die Reifung des antioxidativen Enzymsystems in der Lunge der Feten. Diese Effekte können sich insbesondere beim prämaternen Neugeborenen positiv auswirken, der aufgrund seiner Unreife einer Sauerstofftherapie bedarf und dadurch erhöhtem oxidativem Stress ausgesetzt ist (Frank et al., 1985). Bei neugeborenen Ratten, die mit 95% igem Sauerstoff beatmet wurden, stellten Luo et al. (1999) einen signifikanten Effekt von 21-Aminosteroid fest, das sowohl die Lipidperoxidationsprodukte als auch die Hydroxyl-Radikal-Bildung deutlich verminderte. Allerdings war die Überlebensrate der Tiere

unbeeinflusst und die DNA-Synthese in der Lunge reduziert. Dies erklärten sich die Autoren mit der Second messenger- Funktion der reaktiven Sauerstoffspezies bei der Regulation des Lungenwachstums.

Studien über die Prävention der neonatalen nekrotisierenden Enterocolitis befassen sich hauptsächlich mit enzymatischen Abwehrmechanismen der reaktiven Sauerstoffspezies und der Inaktivierung der Xanthin-Oxidase, die während der Reperfusionphase massenhaft freie Radikale bildet.

Die Vorbehandlung mit Superoxid-Dismutase und Katalase sowie Allopurinol reduzierte nekrotische Darmschäden, die durch eine Injektion von plättchenaktivierendem Faktor in die Mesenterialgefäße von Ratten verursacht worden waren (Cueva und Hsueh, 1988). Auch die PAF-induzierte Leukozyteneinwanderung in den Darm, die durch die Xanthin-Oxidase gefördert wird, lässt sich durch Allopurinol verhindern (Qu et al., 1999). Dagegen konnten Papparella et al. (1997) bei neugeborenen Ferkeln keinen Effekt von SOD und Katalase auf die Schleimhautnekrosen nach experimenteller Ischämie/Reperfusion feststellen. Bei neugeborenen Kälbern erwies sich die Administration von Kupfersuccinat während der Reperfusionphase als wirkungsvoll und verhinderte den Xanthin-Oxidase-Anstieg sowie die Bildung von Malondialdehyd (Harisch et al., 1989).

Vor über 50 Jahren wurde zum ersten Mal über einen prophylaktischen Effekt von Vitamin E auf die Frühgeborenen-Retinopathie berichtet (Owens and Owens, 1949). Seitdem wurden eine Reihe von Studien über die Wirksamkeit prophylaktischer Vitamin E- Gaben veröffentlicht, die zu unterschiedlichsten Ergebnissen kamen. Manche fanden sowohl eine Reduzierung der Inzidenz als auch des Schweregrades der Frühgeborenen-Retinopathie, andere fanden nur verminderte Schweregrade bei gleicher Inzidenz und wiederum andere stellten gar keinen Effekt einer Vitamin E- Behandlung fest (Hittner et al, 1981; Finer et al., 1983; Schaffer et al., 1985; Law et al., 1990). Diese Studien sind aufgrund der Variabilitäten bei der Patientenauswahl, den Dosierungen, der Vitamin E- Präparationen und der Administrationswege nur schwer miteinander zu vergleichen. Penn et al. (1997) führten die erfolglosen Ergebnisse auf die Unfähigkeit der immaturren Retina, fettlösliches Vitamin E aufzunehmen, zurück. In ihrem Versuch verwendeten sie das wasserlösliche Vitamin E- Analogon Trolox C. Sie stellten signifikant kleinere avaskuläre Bereiche, weniger undichte Gefäße und eine größere Kapillardichte in den Retinae von behandelten Ratten nach hoher Sauerstoffexposition fest.

Niesman et al. (1997) zeigten, dass sich die intraperitoneale Administration von Superoxid-Dismutase ebenfalls positiv auf das Gefäßwachstum der Retina von neugeborenen Ratten, die mit hohen Sauerstoffkonzentrationen behandelt wurden, auswirkt. Sie verabreichten in Liposomen eingekapselte SOD intraperitoneal und stellten nach 6-tägiger Supplementierung deutlich gesteigerte retinale Superoxid-Dismutase-Aktivitäten sowie erhöhte Gefäßdichten und weniger avaskuläre Bereiche fest.

Um den Neugeborenen widerstandsfähiger gegen oxidativen Stress und radikalbedingte Krankheiten zu machen und seinen antioxidativen Status zum Zeitpunkt der Geburt zu erhöhen, verabreichten Bolisetty et al. (2002) Müttern mit erhöhtem Frühgeburts-Risiko eine tägliche Vitamindosis, bestehend aus Vitamin E, C und β -Carotin. Die Mütter wiesen zur Geburt signifikant niedrigere Malondialdehyd-Konzentrationen im Plasma als die Kontrollmütter auf. Die Vitamin E- Plasmaspiegel waren dabei deutlich erhöht. Bei den Neugeborenen der supplementierten Mütter ergab sich ein Trend hin zu niedrigeren Malondialdehyd- und höheren Vitamin E- Konzentrationen im Plasma. Somit konnte bei den Müttern und vermutlich auch bei den Neugeborenen der oxidative Stress zur Geburt mit einer kurzzeitigen Antioxidantien-Supplementierung reduziert werden. Für eine genauere Beurteilung müssen jedoch größere Studien mit eventuell höheren Dosierungen durchgeführt werden.

4.2 Probiotika

Für den Begriff „Probiotikum“ existieren eine Reihe von Definitionen. Eine häufig verwendete stammt von Fuller (1989), der Probiotika als *lebende mikrobielle Futterzusätze* ansieht, *die sich vorteilhaft auf das Wirtstier auswirken, indem sie sein intestinales mikrobielles Gleichgewicht verbessern*. Salminen et al. (1999) schlagen eine erweiterte Definition vor, die sich zusätzlich auf die Lebensfähigkeit oder Nichtlebensfähigkeit der Kulturen und die wissenschaftlich bewiesenen gesundheitlichen Wirkungen bezieht. Demnach sind Probiotika *mikrobielle Zellzubereitungen oder Bestandteile von mikrobiellen Zellen, die vorteilhafte Auswirkungen auf die Gesundheit und das Wohlergehen des Wirtes haben*. Diese Definition berücksichtigt, dass Probiotika nicht zwingendermaßen lebensfähig sein müssen, da gesundheitliche Effekte auch von nichtlebenden Formen beschrieben wurden (Ouweland und Salminen, 1998). Nicht nur ganze mikrobielle Zellen sondern auch Teile von Zellen

zeigen eine positive Wirkung genauso wie andere Applikationsformen als die über das Futter. Dagegen wurden Stoffwechselprodukte von Mikroben, wie Antibiotika, nicht in die Definition mit einbezogen.

Probiotika müssen einige Selektionskriterien erfüllen und können daneben über zusätzliche Eigenschaften verfügen, die sie für ein bestimmtes Einsatzgebiet nützlich machen. Zu den Selektionskriterien gehört die Säure-, Galle- und Enzymbeständigkeit von oral verabreichten probiotischen Mikroorganismen, die nur so ihr Adhäsionsverhalten und ihre metabolische Aktivität während der Darmpassage beibehalten können. Für immunmodulatorische Eigenschaften sowie die kompetitive Verdrängung von Pathogenen und die Verhinderung der Adhäsion pathogener Mikroorganismen müssen die Probiotika ein Adhäsionsverhalten an die Schleimhautoberfläche zeigen. Die gesundheitlichen Wirkungen sollten in plazebo-kontrollierten, randomisierten Doppelblind-Studien bewiesen und die minimalen Dosierungen für jede einzelne Art dokumentiert werden. Ein wichtiger Aspekt ist die Anwendungssicherheit der Probiotika. Dazu zählen u.a. fehlende Invasioneigenschaften und die Abwesenheit von Antibiotikaresistenz-Plasmiden. Gute technologische Eigenschaften wie Artenstabilität, Phagenresistenz, Überlebensfähigkeit im Produkt (wenn lebende Organismen erwünscht sind), Anzüchtbarkeit in großer Zahl, Sauerstoffresistenz und Geschmacksneutralität im Produkt werden gefordert (Ouwehand et al., 1999).

Als Probiotika kommen beim Mensch und Tier Mikroorganismen aus unterschiedlichen Genera zum Einsatz. Die am häufigsten verwendeten Arten gehören der heterogenen Gruppe der milchsäurebildenden Bakterien an: Laktobazillen, Enterokokken und Bifidobakterien. Aber auch andere Arten wie Propionibakterien, *Bacillus* spp., *E. coli*, Streptokokken und Hefen weisen probiotische Eigenschaften auf und werden erfolgreich zur Prophylaxe und Therapie verschiedener Krankheiten eingesetzt (Ouwehand et al., 2002).

4.2.1 Grundsätzliche Wirkungen von Probiotika

Die Grundidee, die hinter dem Einsatz von probiotischen Mikroorganismen steckt, ist die Veränderung der intestinalen Mikroflora mit potentiell pathogener Zusammensetzung hin zu einer Darmflora mit gesundheitsfördernden Eigenschaften. Dies wird durch hauptsächlich drei Wirkungsmechanismen erreicht: direkte antagonistische Effekte der Probiotika gegenüber spezifischen pathogenen Organismen, Beeinflussung des mikrobiellen Stoffwechsels und Stimulation der Immunabwehr (Fuller, 1989).

Milchsäurebildende Bakterien produzieren durch ihre Stoffwechselaktivität während der Darmpassage antimikrobielle Substanzen, die zur Unterdrückung der pathogenen Keime führen. Zu diesen Substanzen gehören in erster Linie organische Säuren wie Milchsäure und Essigsäure, die den pH-Wert des Darminhalts absenken. Dadurch wird das Wachstum von Coliformen und Clostridien gehemmt und die Kolonisation von Laktobazillen und Bifidobakterien gefördert. Zusätzlich bilden sie Hydrogenperoxide und Carbondioxide sowie Bakteriozine. Als Bakteriozine werden antimikrobielle Peptide bezeichnet, die in den Ribosomen der milchsäurebildenden Bakterien aus 20 - 60 Aminosäuren synthetisiert werden und nach Sekretion in das umgebende Milieu zerstörend auf bestimmte Bakterien wirken können. Der Wirkungsmechanismus beruht dabei auf der Bildung von Membranporen, die den Protonengradienten über der Zellmembran der Bakterien aufheben und zur Erschöpfung der ATP-Vorräte sowie zu einem Verlust an Nährstoffen führen (Eijsink et al., 2002).

Ein weiterer Mechanismus der Keimzahlreduktion durch Probiotika stellt die Nahrungskonkurrenz und die Verdrängung der Pathogenen von Adhäsionsstellen an der Darmschleimhaut dar (Fuller 1989).

Diese Wirkungsmechanismen werden für den erfolgreichen Einsatz von probiotischen Mikroorganismen bei verschiedenen Magendarmerkrankungen verantwortlich gemacht. So konnte die orale Administration von *Saccharomyces boulardii* das Risiko von antibiotika-assoziiertes Diarrhoe deutlich senken (Surawicz et al., 1989). Antibiotika-assoziiertes Diarrhoe resultiert aus einer Abnahme der natürlichen Darmflora und einer verminderten Fermentationskapazität im Kolon sowie aus einem mikrobiellen Ungleichgewicht, das häufig zu einem Überhandnehmen von *Cl. difficile* führt. Auch der Einsatz von *Ec. faecium* SF 68 brachte signifikante Erfolge (Wunderlich et al., 1989).

Gastroenteritis ist die Hauptursache für akute Durchfälle und wird durch bestimmte Viren oder Bakterien, aber auch durch Parasiten hervorgerufen. Bei Kindern und Jungtieren sind Rotavirus-Infektionen eine häufige Ursache. Durch die Verabreichung von *Lb. rhamnosus* GG konnte die Dauer einer akuten Rotavirus-Diarrhoe bei Kindern deutlich verkürzt werden (Majamaa et al., 1995). Der Einsatz von *Enterococcus faecium* erwies sich als wirksam zur Verhütung und Verkürzung der Dauer von Ferkeldurchfällen (Schumm et al., 1990). Viele Autoren berichten über weitere Anwendungsgebiete der Probiotika (z.B. Reisedurchfälle, Verstopfungen, entzündliche Darmerkrankungen und intestinale Besiedelungen mit pathogenen Keimen), für eine eindeutige Aussagekraft der Ergebnisse müssen jedoch noch kontrollierte Studien durchgeführt werden (Marteau et al., 2001).

Goldin und Gorbach (1984) zeigten einen Weg, wie Laktobazillen den mikrobiellen Stoffwechsel beeinflussen können. Einige Fäkalbakterien weisen Enzyme auf, die die Umwandlung von Prokarzinogenen aus der Nahrung zu Karzinogenen katalysieren können. Testpersonen erhielten eine 4-wöchige Supplementierung mit lebenden *Lactobacillus acidophilus* spp. und wurden anschließend auf die Aktivität von Fäkalenzymen hin untersucht. Bei den supplementierten Personen konnte eine signifikante Reduzierung der Aktivitäten von β -Glukuronidase, Nitroreduktase und Azoreduktase in den Fäzes verzeichnet werden. Auch Rowland et al. (1998) stellten bei Ratten eine verminderte β -Glukuronidase-Aktivität nach der Verfütterung von *Bifidobacterium longum* und Inulin fest und fanden bei den Tieren eine signifikant geringere Inzidenz von anomalen Kolonkrypten nach Behandlung mit dem Kolonkarzinogen Azoxymethan. Zusätzlich war die Konzentration an Ammoniak, das durch bakteriellen Abbau von Proteinen und Harnstoff entsteht und als Promoter in der Karzinogenese gilt, im Blinddarminhalt der Ratten reduziert. Weitere Studien mit *Lb. acidophilus* zeigten eine deutliche Verminderung des Anteils an Deoxycholsäure und Lithocholsäure im menschlichen Stuhl, die beim mikrobiellen Abbau von Gallensalzen gebildet werden und eine wichtige Rolle in der Ätiologie von Kolonkrebs spielen (Lidbeck et al., 1992).

Daneben können Probiotika das mikrobielle Ökosystem im Dickdarm derart beeinflussen, dass vermehrt kurzkettige Fettsäuren gebildet werden (Siigur et al., 1996, Sakata et al., 1999). Kurzkettige Fettsäuren wie Essig-, Propion- und Buttersäure sind die Hauptabbauprodukte der mikrobiellen Kohlenhydratverstoffwechslung im Dickdarm. Sie dienen als Energiequelle für die Kolonozyten und stimulieren selbst unter diarrhoeischen Bedingungen die Natrium- und Wasserabsorption im Dickdarm (von Engelhardt et al., 1998). Zusätzlich unterdrücken Propion- und Buttersäure die Kolonmotilität (Cherbut, 2003). Neben dem dosisabhängigen Anstieg von kurzkettigen Fettsäuren sank die Produktionsrate von Ammoniak und Isovalerinsäure nach Zusatz von probiotischen Bakterien zu einer Schweinezäkalflorea in vitro deutlich ab (Sakata et al., 1999). Die Autoren vermuteten, dass Probiotika die Bildung kurzkettiger Fettsäuren durch Stimulation des Kohlenhydratabbaus im Zäkuminhalt erhöhen und dabei den Proteinabbau senken. Durch welchen Mechanismus die probiotischen Bakterien dies erreichen, ist noch unklar. Eventuell verfügen sie über Enzymaktivitäten, die die Kohlenhydrate angreifen, die von der natürlichen Darmflora nicht abgebaut werden können. Alternativ könnten Probiotika Wachstumsfaktoren sezernieren, die die Proliferation einiger bestimmter Darmfloraarten fördern (Macfarlane und Macfarlane, 2003).

Es werden mehrere Wege vermutet, wie Probiotika das Immunsystem beeinflussen können. Die Aufnahme von fermentierten Milchprodukten mit Laktobazillen und Bifidobakterien erhöhte die humorale Immunantwort nach einer experimentellen *Salmonella typhi*-Infektion deutlich. Sowohl die Gesamt-IgA-Konzentrationen im Serum als auch die spezifischen IgA-Spiegel gegen *Salmonella typhi* waren bei den Testpersonen im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Probiotikumaufnahme signifikant erhöht (Link-Amster et al., 1994). Auch bei Kindern, die an akuter Rotavirus-Gastroenteritis erkrankt waren, führte die orale Gabe von *Lactobacillus rhamnosus* GG zu einer Erhöhung der Gesamt-IgA- und spezifischen IgA-Konzentrationen im Serum. Daneben war die Dauer der Durchfallperiode um durchschnittlich einen Tag verkürzt (Majamaa et al., 1995). Die Fütterung von *Enterococcus faecium* SF68 steigerte bei Hundewelpen sowohl die IgA-Konzentrationen im Kot als auch die Tollwut-spezifischen IgA- und IgG-Spiegel im Blut (Benyacoub et al., 2003). Keine Unterschiede konnten beim Verhältnis $CD4^+$ - zu $CD8^+$ - T-Helferzellen festgestellt werden. Dagegen war der Grad der B-Zell-Reifung bei den mit *Ec. faecium* gefütterten Welpen signifikant erhöht und die Monozyten stärker aktiviert.

Matsuzaki et al. (1998) untersuchten die Wirkung einer *Lactobacillus casei* Shirota-Fütterung auf die Immunglobulin E-Bildung bei Mäusen und stellten in der Testgruppe sowohl im Serum als auch in einem in vitro-Versuch mit Milzzellen eine signifikant geringere IgE-Produktion nach intraperitonealer Stimulation mit Ovalbumin fest. Zusätzlich untersuchten sie die Zytokinproduktion in den Milzzellen und fanden bei den mit Laktobazillen gefütterten Mäusen einen Anstieg der Typ 1 T-Helferzell-assoziierten Zytokine (IFN- γ , IL-2, TNF- β) bei gleichzeitiger Verminderung der Typ 2 T-Helferzell-assoziierten Zytokine (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10). Die Typ 1-Zytokine wirken fördernd auf die zellvermittelte Immunität während die Typ 2-Zytokine die humorale Immunantwort verstärken. Eine Ausgewogenheit zwischen diesen beiden Zelltypen ist für das Gleichgewicht der physiologischen Körperfunktionen wichtig. Kommt es zu Verschiebungen, können verschiedene immunologische Krankheiten wie Allergien auftreten. In dieser Studie wirkte sich die *Lb. casei* Shirota-Fütterung immunregulierend auf Mäuse aus, die mit einem Antigen konfrontiert worden waren, indem die Bildung der Typ 1-Zytokine verstärkt und die IgE-Produktion gedrosselt wurde.

Ein Effekt auf die unspezifische Immunabwehr wurde bei Menschen nach der Aufnahme von *Lb. acidophilus* und *B. bifidum* festgestellt (Schiffirin et al., 1995). Die Phagozytoseaktivität im peripheren Blut der Testpersonen war signifikant erhöht, was sich auf die gesteigerte Granulozytenpopulation zurückführen ließ. Dagegen blieb die Zahl der Blutlymphozyten und der Grad der T-Zellaktivierung unbeeinflusst. Verstärkte Phagozytose trat auch bei Mäusen

nach der Administration von *Lactobacillus casei* und *Lb. bulgaricus* auf (Perdigón et al., 1986).

Der genaue Mechanismus, wie Probiotika das systemische Immunsystem beeinflussen können, ist noch unklar. Ein wichtiger Faktor scheint das Adhäsionsverhalten bestimmter Zelloberflächenmoleküle an die Darmschleimhaut zu sein, wodurch die probiotischen Mikroorganismen von den M-Zellen des darmassoziierten lymphatischen Gewebes (GALT) aufgenommen werden und mit den darunterliegenden Immunzellen in Kontakt treten können (Morata de Ambrosini et al., 1998).

4.2.2 Antioxidative Eigenschaften von Probiotika

Neben den antimikrobiellen Wirkungsmechanismen zeigen einige Probiotika zusätzlich antioxidative Aktivitäten, die es ihnen ermöglichen, exo- und endogenen oxidativen Stress im intestinalen Ökosystem zu bewältigen. Kaizu et al. (1993) fanden bei 19 von 570 Gattungen milchsäurebildender Bakterien antioxidative Kapazitäten. Sie konnten jedoch keine Substanzen identifizieren, die für diesen Effekt verantwortlich sind. Ahotupa et al. (1996) untersuchten unterschiedliche antioxidative Parameter bei *Lactobacillus rhamnosus* GG und stellten außerordentlich hohe Superoxid-Radikalfängereigenschaften fest. *Lactobacillus* GG und *Lb. GG*-fermentierte Milch verhinderten zudem wirkungsvoll Lipidperoxidationen in vitro. Diese Effekte waren von der Wirkung her vergleichbar mit denen der Antioxidantien Vitamin C und Butylhydroxytoluene (BHT). Die Inhibition der Lipidperoxidationen war sowohl auf die Superoxid-Radikalfängereigenschaften als auch auf eisenbindende Fähigkeiten von *Lactobacillus* GG zurückzuführen. Als verantwortliches Enzym für die Inaktivierung von Superoxid-Radikalen fanden Kullisaar et al. (2002) bei zwei *Lactobacillus*-Spezies die Expression von Mangan-Superoxid-Dismutase. Daneben enthielten die Bakterien eine beachtliche Menge an Glutathion, das als potenter Fänger für Hydroxyl-Radikale gilt. Antioxidative Enzymaktivitäten wurden auch bei Streptokokken, Bifidobakterien und Propionibakterien festgestellt (Shimamura et al., 1992; Sanders et al., 1995; Vorobjeva, 2000).

Lin und Yen (1999) konnten in ihrer Studie zwar keine Superoxid-Dismutase-Aktivitäten messen, die von ihnen getesteten Spezies von *Lb. acidophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Sc. thermophilus* und *B. longum* zeigten jedoch eisenbindende Eigenschaften, Radikalfängereigenschaften und reduzierende Aktivitäten. Die Autoren bewerteten den Konsum von

milchsäurebildenden Bakterien als gesundheitsfördernd und als natürliche Antioxidantienquelle zur Steigerung der Abwehrkräfte gegen oxidativen Stress.

Bifidobacterium thermophilum kann aus dem Pansen von Rindern isoliert werden und kommt als Probiotikum bei landwirtschaftlichen Nutztieren zum Einsatz. Der probiotische Wirkungsmechanismus ist dabei noch nicht vollständig geklärt. Kot und Bezkorovainy (1999) vermuten, dass die Bindung von Eisenionen aus dem Darminhalt durch Bifidobakterien eine Rolle spielt. Durch diese Sequestration steht weniger Eisen für pathogene Mikroorganismen zur Verfügung, deren Virulenz von den Metallionen abhängt. Zusätzlich wird die Bildung schädlicher Hydroxyl-Radikale in der Fenton-Reaktion verhindert. In ihrem Versuch stellten Kot und Bezkorovainy fest, dass insbesondere bei der Anwesenheit freier Radikale (z.B. bei Darmentzündungen) große Mengen an Eisen an die Zellmembran der Bifidobakterien gebunden werden können. *Bifidobacterium thermophilum* zeigt somit antioxidative Eigenschaften und wirkt probiotisch, in dem es die Eisenverfügbarkeit für pathogene Mikroorganismen verringert und radikalinduzierte Darmgewebsschäden reduziert.

Annik et al. (2003) untersuchten obligat homofermentative (OHOL), fakultativ heterofermentative (FHEL) und obligat heterofermentative (OHEL) intestinale Laktobazillen auf ihre antioxidativen und antimikrobiellen Aktivitäten und beurteilten daraus ihre Eignung als Probiotikum. Die OHOL-Gruppe zeigte die höchste antioxidative Aktivität, gemessen als Inhibition von Linolensäureperoxidationen, und die niedrigsten antagonistischen Effekte gegenüber Testkeimen. Die OHEL-Gruppe wies dagegen die höchsten antimikrobiellen Eigenschaften auf. Die antioxidative Aktivität der OHEL- und FHEL-Gruppen war uneinheitlich und speziesabhängig. Folglich scheinen obligat homofermentative Laktobazillen für die Verwendung als Probiotikum im Magendarmtrakt besser geeignet zu sein, da sie durch ihre antioxidative Kapazität den Wirt vor oxidativem Stress im Darm bewahren können und wegen mangelnder antagonistischer Aktivität gegenüber anderen intestinalen Laktobazillen auch bei Langzeitgebrauch Sicherheit bieten.

Bisher gibt es nur wenige Studien, die die Fähigkeiten dieser antioxidativen Probiotika untersucht haben, Körperzellen vor oxidativen Schäden zu schützen. In einem in vitro-Versuch verwendeten Korpela et al. (1997) Herzendothelzellen von Ratten, die Mediatoren und Modulatoren zur Regulierung des Gefäßtonus bilden können. Die Synthese und der Abbau dieser Substanzen (Prostazyklin, Stickstoffmonoxid und zyklisches GMP) sind vom Redoxzustand der Umgebung abhängig und anfällig für freie Radikal-Reaktionen. Der antioxidative Effekt mehrerer milchsäurebildender Bakterien auf die Bildung der Regulatoren

wurde untersucht. Von den getesteten Bakterien konnte lediglich *Lb. rhamnosus* GG die Produktion von Prostazyklin steigern und zeigte damit einen gewissen antioxidativen Effekt auf die Endothelzellen.

Intestinale Zellen konnten durch *Bifidobacterium longum* und *Lactobacillus acidophilus* vor der Zytotoxizität von 4-Nitroquinoline-N-Oxid, einem potenten Mutagen und Karzinogen, dass oxidative DNA-Schäden verursacht, bewahrt werden (Lin und Chang, 2000). Da nicht alle milchsäurebildenden Bakterien im Darm überleben und ein gewisser Anteil zerstört wird, untersuchten Lin und Chang neben den antioxidativen Wirkungen der intakten Zellen auch die der intrazellulären zellfreien Extrakte, die bei der Zerstörung in den Darm freigesetzt werden. Dabei stellten sie einen inhibitorischen Effekt der intrazellulären Extrakte von *B. longum* und *Lb. acidophilus* auf Lipidperoxidationen im Plasma fest. Inwieweit diese antioxidative Wirkung im Körper zur Geltung kommt, hängt hauptsächlich davon ab, wieviel der intrazellulären Extrakte vom Dünndarm ins Blut absorbiert werden und muss in in-vivo-Experimenten weiter erforscht werden.

Erste Hinweise auf in vivo-Effekte erbrachte die Studie von Kaizu et al. (1993), die Ratten eine Vitamin E- Mangeldiät fütterten und die Auswirkungen von antioxidativen *Lactobacillus*-Spezies auf den Zustand der Ratten untersuchten. Vitamin E- Mangel schwächt das Abwehrsystem der Ratten gegen oxidativen Stress und führt zu Hämolyse und Akkumulation von Peroxiden in der Leber. Die Fütterung von intrazellulären zellfreien Extrakten von *Lactobacillus* sp. SBT 2028 verhinderte die Hämolyse signifikant und reduzierte die Peroxidkonzentrationen in der Leber. Sie verbesserte damit den Vitamin E-Mangelzustand und senkte das Risiko von oxidativem Stress.

4.2.3 Einsatz von Probiotika bei Neugeborenen

Eine Verabreichung von Probiotika an Neugeborene scheint v.a. nach Antibiotikabehandlung, Infektionen oder anderen Zuständen mit gestörter intestinaler Mikroflora nützlich zu sein. Da insbesondere der mit Ersatzmilch künstlich aufgezogene Säugling eine sehr variable intestinale Kolonisation mit Laktobazillen aufweist, könnte mit einer oralen Probiotikagabe eine dauerhafte Besiedelung erreicht werden. Agarwal et al. (2003) stellten nach oraler Administration von *Lactobacillus* GG bei einem Teil der Neugeborenen eine intestinale Ansiedelung fest, die sich auch auf die übrige Mikroflora auswirkte und die Zahl der grampositiven und anaeroben Bakterienspezies signifikant erhöhte. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Millar et al. (1993), die zusätzlich die Auswirkungen des Probiotikums auf

die klinische Entwicklung der Frühgeborenen und auf das Darmreservoir an potentiell pathogenen Keimen untersuchten. Sie konnten in dieser Hinsicht jedoch keine Vorteile einer Lactobacillus GG- Behandlung feststellen. Auch bei Fohlen konnte eine Kolonisation mit Lactobacillus rhamnosus GG nach oraler Administration erreicht werden, die keine nachteiligen Effekte erkennen ließ. Weitere Studien werden benötigt, die die Bedeutung dieses Probiotikums bei der Prävention oder der Therapie von Fohlenkrankheiten evaluieren (Weese et al., 2003). Pasupathy et al. (2001) untersuchten den Effekt einer Lactobacillus acidophilus-Supplementierung auf die Entwicklung von Hundewelpen. In der supplementierten Gruppe kam es zu einem Anstieg der Laktobazillen und Coliformen im Kot, wobei letztere gegen Ende des Versuchs bei steigender Laktobazillenzahl absanken. Bezüglich der Futtermittelveerdauung und der Durchfallinzidenz konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Welpengruppen festgestellt werden. Auch blieb der pH-Wert des Kotes (als Parameter für Milchsäurebildung) unbeeinflusst. Dagegen konnte in der Probiotikumgruppe eine Appetitsteigerung und vermehrte Futteraufnahme verzeichnet werden, die zu höheren täglichen Gewichtszunahmen führte.

Verschiedene Probiotika werden bei neugeborenen Kälbern und Ferkeln eingesetzt, um die Futtermittelveerdauung und Gewichtszunahme zu steigern (Pollmann et al., 1980; Abe et al., 1995). Daneben wird eine verringerte Durchfallhäufigkeit und reduzierte Jungtiersterblichkeit beobachtet. Die Administration von Bifidobakterien und Laktobazillen verhinderte das Auftreten von Diarrhoen genauso effektiv wie eine Antibiotikafütterung (Abe et al., 1995), so dass die Verwendung von Probiotika in der Jungtieraufzucht eine sinnvolle Alternative zur prophylaktischen Antibiotikagabe darstellt. Auch bei Kindern, die mit Probiotikum-supplementierter Ersatzmilch gefüttert wurden, verringerte sich die Durchfallhäufigkeit nach Rotavirus-Infektionen deutlich. Bei akuten Diarrhoen steigerte die Gabe von milchsäurebildenden Bakterien die intestinale Immunantwort und brachte die gestörte Darmflora ins Gleichgewicht, so dass die Durchfalldauer verkürzt wurde (Isolauri et al., 1994; Saavedra et al., 1994; Majamaa et al., 1995; Phuapradit et al., 1999).

Lee et al. (2000) untersuchten im Hinblick auf die neonatale Septikämie den Effekt einer Lactobacillus casei GG- Fütterung auf Bakterientranslokationen aus dem Darm. Die supplementierten neugeborenen Kaninchen wiesen eine signifikant geringere Darmkolonisation mit E.coli K1A auf, die zusammen mit dem Probiotikum gefüttert worden waren. Zusätzlich waren deutlich weniger Bakterientranslokationen in die mesenterialen

Lymphknoten, die Milz und die Leber festzustellen. Die orale Vorbehandlung mit *Enterococcus faecium* J96 konnte 30-Stunden alte Hühnerküken vor einer *Salmonella pulorum*-Infektion schützen, während die nachträgliche therapeutische Gabe des Probiotikums keine Wirkung zeigte und die Küken 4 Tage später starben. Aus ihrer Milz und Leber konnten Salmonellen isoliert werden (Audisio et al., 2000). Dagegen wurde bei prämaturnen Säuglingen die Inzidenz von bakteriellen Septikämien durch eine Behandlung mit *Lactobacillus GG* nicht gesenkt (Dani et al., 2002). Dieses Ergebnis kann mit der geringen Zahl an untersuchten Neugeborenen zusammenhängen oder durch die komplexe Pathogenese der Septikämie bedingt sein, bei der nicht alle Faktoren durch Probiotika beeinflusst werden können.

Studien über die Prävention der neonatalen nekrotisierenden Enterocolitis durch Probiotika kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Butel et al. (1998) isolierten aus dem Darm von frühgeborenen Säuglingen, die an nekrotisierender Enterocolitis litten, Clostridienspezies, die sie keimfreien Wachteln verabreichten. Durch gleichzeitige Gabe von Bifidobakterien konnten die nekrotischen Darmläsionen verhindert werden. Caplan et al. (1999) zeigten an einem Modell mit neonatalen Ratten, dass eine Supplementierung mit *Bifidobacterium infantis* die Inzidenz der nekrotisierenden Enterocolitis signifikant senken kann. Sie führten den Effekt auf verringerte Bakterientranslokationen und auf Modulationen der Entzündungskaskade im Darm zurück. Bei neugeborenen Säuglingen wurde sowohl die Entwicklung der nekrotisierenden Enterocolitis als auch die Todesfälle infolge der Erkrankung durch die Aufnahme von *Lactobacillus acidophilus* und *Bifidobacterium infantis* im Vergleich zu einer früheren Kontrollgruppe signifikant reduziert (Hoyos, 1999). Obwohl Dani et al. (2002) dieses Ergebnis in einer plazebokontrollierten Doppelblind-Studie nicht bestätigen konnten, stellten auch sie nach 1-wöchiger Behandlung mit *Lactobacillus GG* eine tendenziell geringere Inzidenz der NEC fest.

Gezielte Studien über den Einsatz von Probiotika zur Prävention oder Behandlung von sauerstoffradikalinduzierten Neugeborenenenerkrankungen liegen derzeit noch nicht vor. Eine Erhöhung des antioxidativen Status von Neugeborenen durch die Verabreichung von antioxidativ wirksamen Probiotika ist denkbar und wäre insbesondere bei Frühgeborenen und mit Ersatzmilch aufgezogenen Säuglingen wünschenswert.

4.3 Lactoferrin

Lactoferrin ist ein eisenbindendes Glykoprotein der Transferrin-Familie, das zum ersten Mal 1960 aus der Milch von Frauen isoliert wurde (Johanson, 1960). Es wird in den exokrinen Körperdrüsen gebildet und kommt hauptsächlich in der Milch aber auch in der Tränen- und Synovialflüssigkeit sowie im Speichel, Sperma, Pankreassekret und der Galle vor. Daneben kann Lactoferrin im Blut gefunden werden. Hier wird es von neutrophilen Granulozyten während des Entzündungsgeschehens produziert und freigesetzt (Masson et al., 1969).

Lactoferrin besteht aus einer einsträngigen Polypeptidkette, die zu zwei homologen Lappen gefaltet ist. Jeder Lappen ist in zwei Domänen unterteilt, zwischen denen sich die Bindungsstelle für ein dreiwertiges Eisenion (Fe^{3+}) befindet. Somit trägt das gesättigte Lactoferrin-Molekül zwei Fe^{3+} - Ionen. In eisenreichen Lösungen kann es vermutlich auf der Moleküloberfläche zusätzliche Eisenionen binden (Nagasako, 1993). Im Körper ist Lactoferrin in der Regel nur zu 15-20 % mit Eisen gesättigt. Die Eisenbindungskapazität hängt von der Gegenwart von Bicarbonationen ab, während die Eisenabgabe bei ausreichend starkem pH-Abfall oder bei der Reduktion des dreiwertigen Eisenions zum zweiwertigen stattfindet.

4.3.1 Grundsätzliche Wirkungen von Lactoferrin

Zunächst wurde vermutet, dass Lactoferrin als reiner Eisentransporter dient, da es die Fähigkeit besitzt, Metallionen zu binden und freizusetzen. Insbesondere während der Laktationsperiode könnte das Protein den Neugeborenen mit essentiellen Eisenionen versorgen. So stellten Kume und Tanabe (1996) bei neugeborenen Kälbern einen positiven Effekt einer kombinierten Lactoferrin- und Eisenadministration fest. Sowohl der Hämatokrit und das Hämoglobin als auch die Eisenkonzentrationen im Plasma waren im Vergleich zur alleinigen Eisengabe erhöht. Dagegen gibt es eine Reihe von Studien, bei denen Lactoferrin keinen Einfluss auf den Eisenstatus ausübte (Hernell und Lonnerdal, 2002; Ward et al., 2003). Es wird heute davon ausgegangen, dass das eisenbindende Protein andere biologische Funktionen besitzt.

In erster Linie gilt Lactoferrin als wichtige Komponente der unspezifischen Immunantwort. Da es auf der Schleimhautoberfläche lokalisiert ist, kommt ihm eine bedeutende Rolle bei der frühen Verteidigung gegen eindringende Mikroorganismen zu. Hierfür besitzt Lactoferrin

bakteriostatische und bakterizide Eigenschaften, die sowohl gegen grampositive als auch gegen gramnegative Bakterien gerichtet sind (Arnold et al., 1980; Ellison, 1994). Den Hauptmechanismus der antimikrobiellen Aktivität stellt die Bindung von Eisenionen dar, die den Bakterien das Eisen als essentiellen Wachstumsfaktor entzieht. Daneben wurde gezeigt, dass Lactoferrin an gramnegative Bakterien binden kann, die Membranen dabei destabilisiert und die Freisetzung von Lipopolysacchariden fördert (Ellison et al., 1988). Kanyshkova et al. (2003) entdeckten, dass humanes Lactoferrin fünf verschiedene Enzymaktivitäten aufweist: DNase, RNase, ATPase, Phosphatase und Maltooligosaccharid-Hydrolyse. Diese Aktivitäten könnten für den Schutzmechanismus gegen mikrobielle und virale Infektionen mit verantwortlich sein.

In der Nähe des N-Terminus besitzt Lactoferrin eine Sequenz mit antimikrobiellen Eigenschaften, die als Lactoferricin bezeichnet wird. Dieses Peptid wurde nach der Pepsin-Verdauung von humanem und bovinem Lactoferrin isoliert und zeigt inhibitorische Effekte gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien, Hefen, Schimmelpilzen und Protozoen. Zusätzlich stimuliert Lactoferricin das Immunsystem bei bestimmten Infektionen (Bellamy et al., 1992; Tomita et al., 1994; Wakabayashi et al., 2003).

Neben einem breiten antimikrobiellen Spektrum gegen Bakterien und Pilze besitzt Lactoferrin die Fähigkeit, die Replikation einer Vielzahl von Viren zu verhindern. Es wurden über antivirale Effekte gegen DNA- und RNA-Viren wie Rotavirus, Herpesvirus, respiratorisches Synzytialvirus und HIV berichtet. Der Mechanismus basiert dabei in erster Linie auf einer Verhinderung der Infektion von Wirtszellen. Lactoferrin kann direkt an Viruspartikel binden oder Virusrezeptoren auf der Zielzelle blockieren (van der Strate et al., 2001). Auch ein indirekter antiviraler Wirkungsmechanismus wurde beschrieben. So führte die Administration von Lactoferrin an Cytomegalovirus-infizierte Mäuse zu einem signifikanten Anstieg der natürlichen Killerzellen, die eine wichtige Abwehrfunktion in der frühen Phase von Virusinfektionen darstellen (Shimizu et al., 1996).

Auf unterschiedliche Weise kann Lactoferrin den Entzündungsprozess modulieren. Es verhindert durch die Hemmung der C3-Spaltung eine Aktivierung des Komplementsystems, wodurch weitere Schritte der Entzündungskaskade unterdrückt werden (Kievits und Kijlstra, 1985). Durch die Bindung von Eisenionen wird die Produktion von Hydroxylradikalen aus Superoxid-Anion und H_2O_2 in Makrophagen verhindert und die Gewebe vor sauerstoffradikalinduzierten Schäden bewahrt (Britigan et al., 1991). Kurose et al. (1994)

stellten fest, dass Lactoferrin, das aus aktivierten neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird, die Leukozytenadhäsion an Kapillarendothelien steigert und damit den Entzündungsprozess fördert. Die Adhäsion und Emigration der Entzündungszellen führte zu mikrovaskulären Dysfunktionen und dem Austritt von Plasmaproteinen.

Dagegen fanden Crouch et al. (1992) antiinflammatorische Wirkungen. Lactoferrin verhinderte die Freisetzung von Zytokinen, die für die Anlockung und Aktivierung von Immunzellen im Entzündungsgebiet verantwortlich sind. Eine Vorbehandlung mit Lactoferrin verzögerte bei Mäusen, die mit Lipopolysacchariden stimuliert wurden, die Il-6- und TNF- α -Freisetzung (Machnicki et al., 1993; Mattsby-Baltzer et al., 1996). Kürzlich wurde in einem in vitro-Versuch festgestellt, dass Lactoferrin mit dem Lipopolysaccharid-Bindungsprotein um die Bindung von Lipopolysacchariden (LPS) konkurriert und damit eine Präsentation von LPS an CD14-Rezeptoren auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen verhindert (Elass-Rochard et al., 1998). Diese inhibitorischen Effekte erklären die prophylaktische Eigenschaft von Lactoferrin beim septischen Schock von Mäusen, die mit einer letalen *Escherichia coli*-Dosis infiziert worden waren (Zagulski et al., 1989). Auch Lee et al. (1998b) konnten einen schützenden Effekt von Lactoferrin gegen den Endotoxin-Schock bei keimfreien Ferkeln ausmachen. Die Tiere, die vor der intravenösen *E. coli*-Lipopolysaccharid-Injektion mit Lactoferrin gefüttert worden waren, zeigten eine deutlich geringere Mortalität verbunden mit einer Resistenz gegen die durch Endotoxine induzierte Hypothermie. Es wird vermutet, dass Lactoferrin auch in vivo die Bindung von LPS an Monozyten und Makrophagen verhindert und damit eine Induktion der inflammatorischen Zytokine unterdrückt.

Lactoferrin kann nach oraler Administration sowohl das lokale als auch das systemische Immunsystem beeinflussen. Debbabi et al. (1998) stellten bei Mäusen nach wiederholter Fütterung von bovinem Lactoferrin eine Erhöhung der Gesamtimmunglobulin-Konzentration in der Intestinalflüssigkeit sowie eine verstärkte IgA- und IgG-Freisetzung in den Peyerschen Platten und der Milz fest. Die T-Zelldifferenzierung und B-Zellreifung wurde durch die Applikation von Lactoferrin an Mäuse deutlich stimuliert (Zimecki et al., 1991; 1995). Beim Menschen wurden vermehrt unreife Vorstufen von neutrophilen Granulozyten im Blut gefunden und ein signifikanter Rückgang der spontanen Zytokinproduktion durch periphere Blutzellen gemessen (Zimecki et al., 1999). Wang et al. (2000) konnten nach der Behandlung von Mäusen mit bovinem Lactoferrin eine verstärkte Il-18- und Interferon- γ -Bildung feststellen, die in der intestinalen Schleimhaut zu einem Anstieg der CD4⁺- und CD8⁺-T-

Zellen sowie der IgM- und IgA-produzierenden B-Zellen führte. Zusätzlich stimuliert Lactoferrin die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen und Makrophagen und erhöht die Zytotoxizität der natürlichen Killerzellen (Shimizu et al., 1996; Miyauchi et al., 1998; Wakabayashi et al., 2003).

Spezifische Lactoferrinrezeptoren wurden auf den Bürstensaumepithelien des Dünndarms identifiziert, wobei diejenigen auf dem Epithel der Peyerschen Platten die höchste Bindungsaffinität aufwiesen (Hu et al., 1990, Talukder et al., 2003). Über diese Rezeptoren und das GALT-Gewebe beeinflusst Lactoferrin vermutlich die Zytokinproduktion und die Proliferation und Differenzierung der Immunzellen, die auf lymphatischem Wege und über die Portalvene in die systemische Zirkulation gelangen (Kitagawa et al., 2003).

4.3.2 Antioxidative Eigenschaften von Lactoferrin

Neutrophile Granulozyten nehmen während der Phagozytose Sauerstoff aus der Umgebung auf und wandeln ihn zu Superoxid-Radikalen ($O_2^{\bullet -}$) und Wasserstoffperoxid um. In der Gegenwart von Eisen kann daraus in der Fenton-Reaktion das hochreaktive Hydroxyl-Radikal (OH^{\bullet}) entstehen, das zur Zerstörung der phagozytierten Bakterien beiträgt. Die Entdeckung, dass eisenbindendes Lactoferrin in Neutrophilen gebildet wird, führte zu einer Reihe von Studien, die die mögliche katalytische Wirkung von Lactoferrin in der Fenton-Reaktion untersuchten. Ambruso und Johnston (1981) stellten eine gesteigerte OH^{\bullet} - Bildung durch humanes Milch- und Neutrophilen-Lactoferrin fest. Sie schlossen daraus, dass Lactoferrin durch die Bereitstellung von Eisenionen als Regulator der Hydroxyl-Radikal-Bildung dient und damit die mikrobizide Aktivität der Neutrophilen fördert. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Bannister et al. (1982). Dagegen konnten Gutteridge et al. (1981b) keine verstärkte OH^{\bullet} - Bildung finden. In ihrem Versuch zeigten sie, dass teilweise gesättigtes Lactoferrin sogar antioxidative Eigenschaften besitzt, indem es eiseninduzierte Lipidperoxidationen verhindert. Der Effekt war auf die Eisenbindungskapazität des Proteins zurückzuführen, wodurch freie prooxidative Eisenionen unschädlich gemacht wurden. Die Freisetzung von Lactoferrin aus Neutrophilen während der Phagozytose scheint somit ein Schutzmechanismus zu sein, der umliegendes Gewebe vor sauerstoffradikalinduzierten Schäden bewahrt. Baldwin et al. (1984) bestätigten diese Vermutung und erklärten sich die von den anderen Autoren gefundene oxidative Aktivität von Lactoferrin mit Verunreinigungen der Versuchssysteme durch Eisenionen.

Mononukleäre Phagozyten beinhalten kein Lactoferrin wie neutrophile Granulozyten, sie besitzen aber auf ihrer Oberfläche Lactoferrin-spezifische Membranrezeptoren. Britigan et al. (1991) fanden heraus, dass Lactoferrin-beladene Phagozyten deutlich weniger Hydroxyl-Radikale produzieren als Kontrollzellen. Zusätzlich wiesen diese Monozyten nach Stimulation mit katalytischen Eisenionen eine geringere Autooxidation ihrer Membranen auf. So spielt die Bindung von Lactoferrin eine wichtige antioxidative Rolle beim Aufrechterhalten einer optimalen Phagozytenfunktion und beim Schutz des umliegenden Gewebes vor phagozytenassoziiierter Hydroxyl-Radikal-Bildung.

Auch Lactoferricin, das durch enzymatische Hydrolyse aus Lactoferrin gewonnen werden kann, zeigt antioxidative Eigenschaften (Matsue et al., 1995; Wakabayashi et al., 1999). Dabei reduziert es die Bildung von Malondialdehyd zum gleichen Prozentsatz wie das vollständige Lactoferrin. Der genaue Mechanismus, wie Lactoferricin die Lipidperoxidation verhindert, ist noch unklar. Da das Peptid die Eisenbindungsstellen des Lactoferrins nicht beinhaltet, vermuten Wakabayashi et al. (1999), dass es mit den Eisenionen auf eine andere Weise interagiert. Auch wäre die Bindung von Ascorbinsäure eine Möglichkeit, eiseninduzierte Lipidperoxidationen zu verhindern.

Einen weiteren antioxidativen Mechanismus stellt die Interaktion von Lactoferrin mit bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) dar. Lipopolysaccharide können neutrophile Granulozyten stimulieren, so dass sie vermehrt Superoxid-Radikale produzieren. Dieses „priming“ der Neutrophilen ließ sich durch vorhergehende Inkubation der LPS mit Lactoferrin verhindern (Cohen et al., 1992). Dabei war der Effekt unabhängig von der Eisensättigung des Lactoferrins. Baveye et al. (2000) untersuchten die Auswirkungen von Lactoferrin auf die Bindung von LPS an L-Selektin-Rezeptoren der Neutrophilen und fanden eine konzentrationsabhängige Hemmung. Somit konkurriert Lactoferrin mit den Rezeptoren um die Bindung von LPS. Zusätzlich reduzierte es die Bildung von Hydroxyl-Radikalen durch LPS-stimulierte Neutrophile um über 50%. Da Lactoferrin bei Entzündungen aus aktivierten Neutrophilen freigesetzt wird, wirkt es als negativer Feedback-Mechanismus, der die weitere Aktivierung von Granulozyten durch LPS verhindert und somit sauerstoffradikalinduzierte Gewebeschäden im Organismus begrenzt.

Die Verhinderung von Lipidperoxidationen durch Lactoferrin wurde nicht nur in Liposomen-Systemen beschrieben (Gutteridge et al., 1981b), sondern auch in Zellkulturen und Mäusegewebekompositen (Shinmoto et al., 1992). Die Autoren verwendeten Homogenisate aus Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, Dünndarm und Gehirn von Mäusen und inkubierten sie mit Eisen, Ascorbinsäure und Apo-Lactoferrin. Die eiseninduzierte

Lipidperoxidation in den Geweben wurde durch die Zugabe von 12,5 μ M Apo-Lactoferrin vollständig unterdrückt.

Nimmagudda et al. (1999) bewiesen die antioxidative Wirkung von Lactoferrin in vivo. Die orale Verabreichung von 80% igem Alkohol verursachte bei Ratten oxidative gastrointestinale Schleimhautschäden. Ein Teil der Ratten war zuvor 7 Tage lang mit Lactoferrin gefüttert worden, ein anderer Teil erhielt Lactoferrin erst zusammen mit dem Alkohol. Die Vorbehandlung mit Lactoferrin konnte Lipidperoxidationen, DNA-Strangbrüche und veränderte Membranviskositäten in der Magen- und Dünndarmschleimhaut deutlich reduzieren. Keine protektive Wirkung wurde bei der gleichzeitigen Gabe von Lactoferrin und Alkohol gefunden. Zum Vergleich war ein Teil der Ratten vor der Alkoholverabreichung 7 Tage lang intraperitoneal mit dem Eisenchelator Desferrioxamin behandelt worden. Die Ratten zeigten einen besseren Schutz gegen den oxidativen Stress als die mit Lactoferrin gefütterten Tiere. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass Lactoferrin eine wesentlich geringere Toxizität aufweist und als Futterzusatzstoff zur Reduzierung eiseninduzierter oxidativer Schäden in Frage kommen kann.

4.3.3 Einsatz von Lactoferrin bei Neugeborenen

Lactoferrin wurde bei neugeborenen Tieren eingesetzt, um die Gesundheit und das Wachstum zu steigern. Burrin et al. (1996) fütterten neonatalen Ferkeln einen Lactoferrin-enthaltenden Milchaustauscher und untersuchten die Auswirkungen auf das Wachstum und die Proteinsynthese der viszerale Organe. Dabei stellten sie eine gesteigerte Proteinsynthese in der Leber fest und vermuteten, dass Lactoferrin bei Neugeborenen eine anabolische Funktion besitzt. Bereits 1987 entdeckten Nichols et al., dass Lactoferrin aus dem Kolostrum den Einbau von Thymidin in die DNA von Enterozyten fördert. Zhang et al. (2001) untersuchten den Effekt von Lactoferrin auf das Darmwachstum weiter und fanden bei neugeborenen Mäusen, die von transgenen Muttertieren mit hoher Lactoferrinsekretion in der Milch gesäugt wurden, einen positiven Effekt auf das Wachstum und den Reifegrad der Dünndarmschleimhaut. So könnte Lactoferrin therapeutisch bei Frühgeborenen zur Reifung der intestinalen Schleimhaut und bei Patienten mit Darmschäden eingesetzt werden.

Bei neugeborenen Kälbern konnte supplementiertes Lactoferrin die Leistung verbessern, indem es die Futteraufnahme der Tiere steigerte und zu höheren täglichen Gewichtszunahmen führte. Dagegen zeigte Lactoferrin keine Wirkung auf die Eisenkonzentration im Serum und

den Hämatokrit (Joslin et al., 2002). Robblee et al. (2003) bestätigten diese Ergebnisse und stellten zudem eine deutlich verringerte Morbidität der mit Lactoferrin gefütterten Kälber fest.

Neonatale Septikämien können durch eine orale Vorbehandlung mit Lactoferrin limitiert werden. Bei neugeborenen Ferkeln, die Lactoferrin über einen Milchaustauscher erhielten, stellten Lee et al. (1998b) eine deutliche Verminderung der Mortalität nach intravenöser Endotoxin-Injektion fest. In dem Versuchsmodell wird deutlich, dass Lactoferrin aus dem Darm absorbiert worden sein muss, da es die Bindung von E. coli- Lipopolysacchariden an Entzündungszellen im Blut verhinderte und damit einer Interleukin-Freisetzung vorbeugte. Auch Edde et al. (2001) zeigten, dass oral verabreichtes Lactoferrin neonatale Ratten nach massiver intestinaler Infektion mit Escherichia coli vor systemischer Bakteriämie, Erkrankung und Tod schützen kann. Still et al. (1990) berichten über eine erfolgreiche Behandlung der enterotoxischen Colidiarrhoe der Kälber mit Lactoferrin. Nach experimenteller Infektion mit E. coli trat bei den supplementierten Kälbern deutlich seltener Durchfall auf als bei den unbehandelten Tieren. Zudem war die Dauer der Durchfallperiode verkürzt und die Mortalität verringert.

Gezielte Studien über den Einsatz von Lactoferrin zur Steigerung des antioxidativen Status von Neugeborenen und zur Prävention sauerstoffradikalinduzierter Neugeborenen-erkrankungen liegen derzeit noch nicht vor. Sullivan vermutete 1988, dass Neugeborene, die mit Muttermilch ernährt werden, genügend Lactoferrin aus dem Darm absorbieren können, um den antioxidativen Status im Blut zu steigern. Der Zusatz von Lactoferrin zu Ersatzmilchpräparaten reduzierte die Bildung von freien Radikalen und Lipidperoxidationsprodukten in vitro deutlich (Satué-Gracia et al., 2000; Raghuveer et al., 2002), über in vivo- Effekte wurden jedoch noch keine Angaben gemacht.

C Material und Methoden

1 Versuchsaufbau

Die vorliegenden Untersuchungen dienten der erstmaligen Bestimmung des antioxidativen Status von neugeborenen Hundewelpen und ermittelten, ob dieser durch die Zufütterung von probiotischen Substanzen beeinflusst werden kann. Die Tiere wurden an einem Modell der mutterlosen Aufzucht zur Wirksamkeitsprüfung probiotischer Substanzen aufgezogen, wie es in der Dissertation von Unsöld (2003) dargestellt wird.

Die Bestimmungen konnten an zwei getrennten Versuchen durchgeführt werden. Im „Lactoferrin-Versuch“ wurde bei 30 Welpen die Wirkung von Lactoferrin und im „Ec. faecium-Versuch“ bei 12 Welpen die Wirkung des Probiotikums *Enterococcus faecium* auf den antioxidativen Status, den Gesundheitszustand und die Entwicklung der Tiere untersucht. Zusätzlich wurden die Blutwerte von 11 Welpen, die bei der Mutterhündin aufwuchsen, zum Vergleich herangezogen („Mutteraufzucht“).

Die Versuchsdauer betrug jeweils 14 Wochen. Um eine ausreichende Versorgung mit Kolostrum zu gewährleisten, blieben die neugeborenen Welpen bis Tag 3 bei der Mutterhündin. Anschließend wurden sie von dieser getrennt und randomisiert nach Gewicht und Geschlecht den einzelnen Versuchsgruppen zugeordnet. Ein bis zwei Welpen blieben zur Mastitisprophylaxe bei der Mutter.

An Tag 3 begann die mutterlose Aufzucht, wobei ein selbsthergestellter Milchaustauscher mit zugesetztem Lactoferrin bzw. Probiotikum gefüttert wurde. Im Alter von 4 Wochen erhielten die Welpen zusätzlich Trockenfutter (Lactoferrin-Versuch) bzw. Feuchtfutter (Ec. faecium-Versuch). Ab der 8. Woche wurde nur noch Festfutter verabreicht, das außer bei den Kontrolltieren mit Lactoferrin bzw. Probiotikum versetzt worden war.

Zur Beurteilung des Gesundheitszustandes der Welpen wurde täglich eine Allgemeinuntersuchung durchgeführt. Zusätzlich wurden allgemeine Aufzuchtparameter wie Körpergewicht, Futteraufnahme pro Fütterung und Häufigkeit, Menge und Konsistenz des Kotabsatzes gemessen.

An Tag 0 (nur Welpen aus der Mutteraufzucht), Tag 3, Tag 7, Tag 14, Tag 28, Tag 56, Tag 70, Tag 84 und Tag 98 wurde den Welpen Blut zur Bestimmung des antioxidativen Status, der latenten Eisenbindungskapazität, des Gesamteisens, freien Eisens und der Vitamine E und C sowie von Gesamt-IgG und -IgA abgenommen.

Ab Entnahmetag 56 wurde zusätzlich Blut zur Bestimmung eines roten und weißen Blutbildes gewonnen.

In der 8. und 12. Woche wurde den Tieren zur Bestimmung einer spezifischen Immunantwort humanes Serumalbumin subkutan injiziert, die Bestimmung der Antikörper gegen hSa erfolgte im Serum von Tag 70, 84 und 98.

In den folgenden 4 Zeiträumen wurden je eine Kotprobe für die Bestimmung des Laktat- und Ammoniakgehaltes im Kot und für die mikrobiologische Kotuntersuchung gewonnen:

Tag 3-8 (Versuchsbeginn), Tag 20-28 (Milchaustauscherperiode), Tag 48-56 (Fütterung von Milchaustauscher und Beifutter), Tag 90-98 (Festfutterperiode).

Zur Messung der Kottrockensubstanz wurden Kotproben von den einzelnen Versuchsgruppen in wöchentlichen Abständen gesammelt.

In der 14. Woche wurden von den Welpen des Lactoferrin-Versuchs Darmgewebsproben mittels endoskopischer Biopsie zur Untersuchung der Darmwand und des intestinalen Immunsystems entnommen.

Versuchsgenehmigung:

Die Genehmigung des Tierversuchs (§8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) i.d.F. vom 25.05.1998 (BGBl I S.1105)) wurde auf Antrag von der Regierung von Oberbayern erteilt.

2 Tiere und Tierhaltung

2.1 Tiere

Die Welpen des Lactoferrin-Versuchs stammten von Beagle-Hündinnen des Instituts für Tierernährung der LMU München, der Gynäkologischen Tierklinik der LMU München und der GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg).

Die Welpen für den *Ec. faecium*-Versuch stammten aus der Versuchshundehaltung der Abteilung Vergleichende Medizin der GSF. Aus dieser Versuchshundehaltung wurden auch die als Vergleich dienenden Welpen der Mutteraufzucht herangezogen.

2.2 Versuchsgruppen

Die Welpen wurden nach Gruppen getrennt und separat gehalten, so dass es weder direkt noch indirekt über Futter, Wasser, Kot oder Spielzeug zu einem Kontakt kommen konnte. Ebenso wurden die verschiedenen Würfe getrennt gehalten, um eine gegenseitige Beeinflussung der altersbedingt unterschiedlichen Mikrofloren zu verhindern. Aus Tierschutzgründen wurden die Welpen mindestens zu zweit gehalten.

2.2.1 Lactoferrin-Versuch

Es wurden 30 Welpen aus 6 Würfen verwendet. Die Versuchsgruppen gliederten sich wie folgt (mg Lactoferrin pro kg MAT- bzw. Festfutter- TS):

Gruppe 1: 0 mg Lactoferrin / kg TS, Kontrolle

Gruppe 2: 30 mg Lactoferrin / kg TS

Gruppe 3: 60 mg Lactoferrin / kg TS im Milchaustauscher, 95 mg Lf / kg TS im Festfutter

Gruppe 4: 60 mg Lactoferrin / kg TS

Gruppe 5: 95 mg Lactoferrin / kg TS

Die Einteilung der Welpen in die verschiedenen Versuchsgruppen erfolgte randomisiert nach Gewicht und Geschlecht (siehe Tab. 1).

Wurf / Hund	Geschlecht	Gruppe	Körpergewicht an Tag 3 (in g)
1 / 1	männlich	Kontrolle (1)	417
1 / 2	männlich	Kontrolle (1)	366
1 / 3	weiblich	Kontrolle (1)	389
1 / 4	männlich	120 mg/kg (5)	454
1 / 5	weiblich	120 mg/kg (5)	371
2 / 6	männlich	Kontrolle (1)	382
2 / 7	weiblich	Kontrolle (1)	336
2 / 8	männlich	120 mg/kg (5)	364
2 / 9	weiblich	120 mg/kg (5)	388
3 / 10	männlich	30 mg/kg (2)	431
3 / 11	weiblich	30 mg/kg (2)	410
3 / 12	weiblich	30 mg/kg (2)	387
3 / 13	männlich	60/95 mg/kg (3)	393
3 / 14	weiblich	60/95 mg/kg (3)	426
3 / 15	weiblich	60/95 mg/kg (3)	353
3 / 16	weiblich	60/95 mg/kg (3)	456
4 / 17	männlich	60 mg/kg (4)	529 *
4 / 18	weiblich	60 mg/kg (4)	526 *
5 / 19	männlich	30 mg/kg (2)	473
5 / 20	weiblich	30 mg/kg (2)	437
5 / 21	weiblich	60 mg/kg (4)	575
5 / 22	weiblich	60 mg/kg (4)	513
5 / 23	weiblich	60 mg/kg (4)	524
6 / 24	männlich	Kontrolle (1)	376
6 / 25	männlich	Kontrolle (1)	358
6 / 26	weiblich	Kontrolle (1)	404
6 / 27	männlich	60 mg/kg (4)	314
6 / 28	männlich	60 mg/kg (4)	338
6 / 29	männlich	120 mg/kg (5)	367
6 / 30	weiblich	120 mg/kg (5)	343

* = aus technischen Gründen ging Wurf 4 erst an Tag 4 in den Versuch ein.

Tabelle 1: Einteilung der Welpen in die Versuchsgruppen des Lactoferrin-Versuchs

2.2.2 Ec. faecium-Versuch

12 Hundewelpen aus 4 Würfen wurden den 2 Versuchsgruppen zugeordnet:

Gruppe 1: Kontrolle, ohne orale Applikation von Ec. faecium.

Gruppe 2: Probiotikum, orale Applikation von Ec. faecium (Konzentration: 10^8 KbE pro 100 g Futter-TS).

Die genaue Einteilung der Tiere und die Geschlechterverteilung zeigt Tab.2.

Wurf / Hund	Geschlecht	Gruppe	Körpergewicht an Tag 3 (in g)
1 / Alina	weiblich	Kontrolle	594
1 / Blizzi	weiblich	Kontrolle	626
2 / Chiaro	männlich	Kontrolle	544
2 / Dingo	männlich	Kontrolle	538
2 / Ruffy	männlich	Probiotikum	503
2 / Snoopy	männlich	Probiotikum	545
3 / Tinka	weiblich	Probiotikum	526
3 / Ulyssa	weiblich	Probiotikum	525
4 / Merlin	männlich	Kontrolle	528
4 / Carmen	weiblich	Kontrolle	471
4 / Hannibal	männlich	Probiotikum	526
4 / Larissa	weiblich	Probiotikum	476

Tabelle 2: Einteilung der Welpen in die Versuchsgruppen des *Ec. faecium*-Versuchs

2.2.3 Mutteraufzucht

Es wurden 11 Welpen aus 2 Würfen (4 + 7 Welpen) herangezogen, die bei ihren Muttertieren aufwuchsen und von ihnen gesäugt wurden. An den Tieren wurde lediglich eine Blutentnahme an den Tagen 0, 3, 7 und 14 für die Bestimmung des antioxidativen Status, der Vitamine E und C sowie von freiem Eisen, latenter Eisenbindungskapazität und Gesamteisen vorgenommen.

2.3 Tierhaltung

Die Welpen des Lactoferrin-Versuchs wurden in Abferkelbuchten bzw. Pferdeboxen im Schweine- und Pferdestall des Instituts für Tierhygiene, Außenstelle Oberwiesenfeld gehalten. Im Winter wurden die Welpen aus Temperaturgründen in den ersten vier Wochen in einem Raum des Instituts für Tierernährung, München aufgezogen und anschließend in die Außenstelle Oberwiesenfeld umgestallt.

Der Boden in den Abferkel- bzw. Pferdeboxen wurde mit Heu eingestreut und einzelne Bereiche für die unterschiedlichen Versuchsgruppen mit Heuballen abgetrennt. Ein Liegebereich unter Wärmelampen wurde mit Hundedecken und Handtüchern eingerichtet.

Die Temperatur unter den Wärmelampen betrug ca. 30°C. Als Hundespielzeug dienten Bälle, Stofftiere, Spieltaus, Pappschachteln u.ä..

Der Ec. faecium-Versuch wurde in einem separaten Hundestall der Versuchshundehaltung der Abteilung Vergleichende Medizin der GSF, Neuherberg durchgeführt. Die ersten 14 Tage wurden die Welpen in Wurfkisten unter Wärmelampen gehalten, in denen eine konstante Umgebungstemperatur von 30°C gewährleistet werden konnte. Anschließend kamen sie in verschiedene nebeneinandergelegene Hundeställe, die keinen Kontakt zwischen den beiden Versuchsgruppen zuließen. Die angeschlossenen Ausläufe waren ab der 4. Woche für die Welpen durch Klapptüren zu erreichen. Der Stall war ebenfalls mit Liegedecken unter Wärmelampen und Spielzeug ausgestattet.

Die Welpen der Mutteraufzucht waren im Hundehaus 1 der Abteilung Vergleichende Medizin der GSF mit ihren Muttertieren in Hundeställen mit geschlossenem Auslauf untergebracht.

Durch regelmäßige Reinigung und Desinfektion der Ställe und aller Gegenstände, die mit den Welpen in Berührung kamen sowie durch Händedesinfektion und Tragen von Schutzkleidung wurde ein Übertragen von Keimen (insbesondere des Probiotikums) durch das Pflegepersonal auf die einzelnen Versuchsgruppen weitestgehend verhindert.

3 Fütterung

3.1 Futtermittel und ihre Zusammensetzung

3.1.1 Milchaustauscher

Zutaten:	- Milch 1,5 % Fett:	43 %
	(H-Milch „Smartprice“ mit 1,5% Fett, Wal-Mart Germany GmbH & Co.KG, 42209 Wuppertal)	
	- Speisequark Magerstufe:	40 %
	(„Milchland“, Milch-Handel und Transport Elbe-Weser GmbH, 27404 Zeven)	
	- Eigelb:	10 %
	(Eier von Eierhof Hennes GmbH, 53881 Euskirchen)	
	- Öl:	6 %
	(Reines Sonnenblumenöl „Smartprice“, Wal-Mart Germany GmbH & Co.KG, Wuppertal)	
	- Mineral- und Vitaminmischung:	1 %
	(ohne bzw. mit Lactoferrin / Probiotikum; Zusammensetzung siehe Tab. 3)	

Mineralstoffzusätze	Menge in g pro 100 g	entspricht
CaCO ₃	34,000	13,6 g Ca
Viehsalz	16,200	6,2 g Na
K-Citrat	11,800	4,5 g K
Mono-Ca(H ₂ PO ₄) ₂ +H ₂ O	9,000	2,04 g P und 1,4 g Ca
Mg-oxid	0,500	0,30 g Mg
Fe-II-fumarat	0,061	20,13 mg Fe
KJ	0,015	11,40 mg J
Cu-acetat	0,115	40,25 mg Cu
MnSO ₄ +H ₂ O	0,006	2,11 mg Mn
Zn-acetat	0,195	70,20 mg Zn
Vitaminzusätze	Menge in g pro 100 g	entspricht
Vit.A, 500 Tsd. IE/g	0,060	30.000 IE Vit.A
Vit.B ₂ , 80 %	0,065	52,0 mg Vit.B ₂
Vit.B ₆ , 99 %	0,085	69,7 mg Vit.B ₆
Biotin, 2 %	0,025	500,0 µg Biotin
Nicotinsäure, 100 %	0,100	100,0 mg Nicotinsäure
Ca-Panθοthenat	0,005	5,0 mg Panθοthensäure
Stärke	27,768	

Tabelle 3: Zusammensetzung der Mineral- und Vitaminmischung

Nährstoffgehalt des Milchaustauschers pro 100g uS (berechnet anhand von Futterwerttabellen für Hunde und Katzen, Meyer und Heckötter 1986):

Rohnährstoffe in g pro 100g uS	pro 100g uS
TS: 24,193	BE: 0,665 MJ
Ra: 1,024	vRp: 8,876 g
Rp: 9,863	vE: 0,632 MJ
Rfe: 9,443	vRp / vE: 14,044 g /MJ
NfE: 3,486	Linolsäure: 3,85 g
Rfa: 0,000	

Tabelle 4: Nährstoffgehalt des Milchaustauschers

3.1.2 Lactoferrin

Qualitative und quantitative Zusammensetzung nach Herstellerangaben:

Wirkstoff:	bovines Lactoferrin:	25%
	Eisensättigung des Lactoferrins:	22%
Sonstige Bestandteile:	Füllstoff:	75%

3.1.3 Probiotikum

Qualitative und quantitative Zusammensetzung nach Herstellerangaben:

Wirkstoff:	<i>Enterococcus faecium</i> DSM 7134:	30%
	entsprechend einer minimalen Aktivität von 1×10^{10} KbE/g.	
Sonstige Bestandteile:	Süßmolkenpulver:	35%
	Lactose:	35%

Bezeichnung und taxonomische Einordnung des Wirkstoffes:

Enterococcus faecium DSM 7134: Familie Streptococcaceae, Genus Enterococcus, Spezies *Enterococcus faecium*.

3.1.4 Festfutter

Die Welpen des Lactoferrin-Versuchs erhielten ab der 4. Woche ein Trockenfutter für Hundewelpen, das die jeweilige Lactoferrinkonzentration für die verschiedenen Versuchsgruppen bereits enthält. (Zusammensetzung des Trockenfutters: Tab.5).

Den Welpen des Ec. faecium-Versuchs wurde Feuchtfutter (Pedigree[®], mit 5 Sorten Geflügel, Masterfoods GmbH, 27281 Verden) gefüttert.

Herstellerangaben:

Zusammensetzung: Fleisch und tierische Nebenerzeugnisse vom Geflügel und Schwein (5 Sorten Geflügel à jeweils: mind. 4%), Getreide, Öle und Fette, Mineralstoffe, pflanzliche Nebenerzeugnisse, pflanzliche Eiweißextrakte, Zucker.

Inhaltsstoffe (%): Rohprotein: 8,0; Rohfett: 6,0; Rohasche: 3,0; Rohfaser 0,4; Feuchtigkeit: 80,0.

Zusatzstoffe: Vitamin D: 150 IE/kg; Vitamin E: 100 mg/kg; Kupfer: 2,5 mg/kg; Biotin: 450 µg/kg.

Die in einer Weender Analyse ermittelte Zusammensetzung von Pedigree® mit 5 Sorten Geflügel (Weiß, 2003) zeigt Tab.6.

Rohnährstoffe in % der uS	Lactoferrin in mg pro kg TS				
	0	30	60	95	120
TS (lyophilisiert)	94,43	94,43	92,70	94,79	94,69
TS (gemahlen)	95,11	94,93	93,50	94,58	94,26
Ra	6,38	6,87	6,70	6,84	6,39
Rp	27,30	26,72	25,60	26,06	26,42
Rfe	9,93	10,53	8,60	10,62	10,05
Rfa	2,60	2,63	2,20	2,79	2,90
NfE	48,22	47,68	47,00	48,48	48,94
Mineralstoffe in g pro kg uS					
Ca	11,15	12,88	12,34	11,83	12,22
P	3,82	4,04	4,06	3,74	3,63
K	3,96	4,59	4,54	4,13	3,65
Na	2,44	2,50	2,70	2,53	2,33
Zn (in mg pro kg uS)	90,53	95,87	94,97	81,33	105,43
Cu (in mg pro kg uS)	9,66	10,93	11,59	12,67	9,31
Mg (in mg pro kg uS)	501,90	520,27	471,50	441,53	488,40
Fe (in mg pro kg uS)	130,27	148,00	153,80	136,87	116,00

Tabelle 5: Zusammensetzung des Trockenfutters für Hundewelpen

Rohnährstoffe in % der uS		Mineralstoffe pro kg TS	
TS (lyophilisiert):	21,0	Ca (g):	21,59
TS (gemahlen):	20,0	P (g):	15,24
		K (g):	9,63
Rp:	7,6	Na (g):	11,38
Rfe:	5,8	Zn (mg):	182,72
Ra:	2,8	Cu (mg):	15,30
Rfa:	0,24	Mg (mg):	945,18
		Fe (mg):	125,19
		Mn (mg):	30,42

Tabelle 6: Zusammensetzung des Feuchtfutters

3.2 Fütterungstechnik

Die Welpen wurden ab Tag 3 mit täglich frisch zubereitetem Milchaustauscher gefüttert. Dazu wurden die einzelnen Zutaten auf einer Waage (Mettler PK 30) abgewogen und in einem Mixer (Bender & Hobein, Zürich) homogen gemischt. Der im Kühlschrank gelagerte Milch-austauscher wurde kurz vor der Fütterung in Saugflaschen für Kleintiere (Karlie[®] Heimtierbedarf GmbH, Haaren) umgefüllt und in einem Babykostwärmer (petra[®]-electric, Typ BF1) auf ca. 37°C erwärmt.

In den ersten Tagen erhielten die Welpen alle 3 Stunden über eine Saugflasche Milchaustauscher ad libitum. Nach jeder Fütterung wurde mit einem feuchten Tuch der Harn- und Kotabsatz durch Massieren der Anogenitalregion stimuliert. Ab der dritten Woche waren die Welpen i.d.R. selbst in der Lage, spontan Kot und Harn abzusetzen.

Die Fütterungsfrequenz wurde ab Tag 14 je nach Entwicklungszustand der Welpen langsam reduziert, so dass am Ende der vierten Woche noch viermal täglich gefüttert wurde. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch mit der Beifütterung des Trocken- bzw. Feuchtfutters begonnen. Das Festfutter wurde in zunehmender Menge unter den Milchaustauscher gemischt und in Futternäpfen angeboten.

Ab Tag 56 wurde der Milchaustauscher ganz abgesetzt und nur noch Festfutter dreimal täglich gefüttert.

4 Entwurmung

Die Welpen wurden ab Tag 14 mit Pyrantel (Banminth[®] Paste zum Eingeben, Pfizer GmbH, Karlsruhe) in einer Dosierung von 5 mg Pyrantel-Base je kg Körpergewicht entwurmt.

Die Behandlung wurde zunächst wöchentlich und ab der 10. Woche in 14-tägigen Abständen wiederholt.

5 Kennzeichnung

Die vorgeschriebene Kennzeichnung von Versuchstieren (Tierversuchs-Verordnung BGBl. II Nr. 198/2000) wurde bei den Welpen durch Tätowierung beider Ohren im Alter von acht Wochen durchgeführt.

6 Impfung

Die Welpen wurden an Tag 56 und 84 mit einem Staupe-Hepatitis-Parvovirose-Lebendimpfstoff (gefriergetrocknet) für Hunde (virbagen[®] canis SHA₂P, Virbac Tierarzneimittel, Bad Oldesloe) geimpft.

Die Trockensubstanz wurde nach Auflösen in 1ml Wasser für Injektionszwecke an der linken Brustwand subcutan appliziert.

Zusätzlich wurden die Tiere zur Bestimmung einer spezifischen humoralen Immunantwort an Tag 56 und 84 mit humanem Serumalbumin (hSa 97-99%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) immunisiert.

Für eine Impfdosis wurden 10 µg gefriergetrocknetes hSa in 250 µl Adjuvans PCSL (Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄ x 3HCl, EMC microcollections; 0,1%ige Lösung in PBS pH 7,4) mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers gelöst und 750 µl PBS pH 7,4 zugegeben.

Die Applikation erfolgte an der rechten Brustwand subcutan.

7 Allgemeine Untersuchungsparameter

7.1 Allgemeine klinische Untersuchung

Die Welpen wurden täglich zur gleichen Tageszeit klinisch untersucht:

Das Allgemeinbefinden der neugeborenen Welpen wurde anhand des Saugreflexes, des Muskeltonus und der Bewegungsaktivität beurteilt. Es wurde als „gut“, „mäßig“ bzw. „schlecht“ notiert.

Die Körpertemperatur wurde rektal mit einem Digital Classic Thermometer (Hartmann) gemessen.

Die Farbe der Schleimhäute wurde am Zahnfleisch beurteilt und dabei die kapilläre Füllungszeit bestimmt. An der A. femoralis wurde der Puls und der Füllungszustand des Gefäßes überprüft.

Die Lnn. mandibulares wurden palpatorisch auf ihre Größe, Form, Verschieblichkeit und Druckempfindlichkeit hin untersucht.

Die Lunge wurde mit einem LittmannTM Stethoskop (Laboratoire 3M Santé) auskultiert, um eine eventuelle Aspiration von Milchaustauscher rechtzeitig festzustellen. Dies kann bei Flaschenfütterung durch zu hastiges Trinken und Abschlucken selten vorkommen.

Haut und Fell wurden adspektorisch untersucht und auf sonstige Auffälligkeiten geachtet.

7.2 Futteraufnahme und Gewichtsentwicklung

Die Welpen wurden vor und nach jeder Flaschenfütterung auf einer Waage (Mettler PK 30) gewogen. Die Differenz der Werte entsprach der Futteraufnahme pro Mahlzeit. Ab der vierten Woche wurde der Milchaustauscher mit dem Festfutter in einen Fressnapf eingewogen und bei der Fütterung darauf geachtet, dass die Welpen das gesamte Futter aufnahmen.

Das Körpergewicht der Tiere wurde jeden Morgen vor der ersten Fütterung gemessen und die Gewichtszunahme im Vergleich zum Vortag berechnet.

Die Futterverwertung ergibt sich aus dem Quotienten von Futteraufnahme und Gewichtszunahme (in g Futter / g Zunahme).

7.3 Kotabsatz und Kotkonsistenz

Die Menge und Häufigkeit des Kotabsatzes wurde von jedem einzelnen Tier festgehalten. Die Menge wurde in g gemessen. Zu dem Zeitpunkt, an dem die Welpen zunehmend umherliefen und sich auch im Auslauf aufhielten, wurde der Kot nur noch gruppenweise gemessen, da die Zuordnung zum einzelnen Tier nicht mehr möglich war.

Die Kotkonsistenz wurde beurteilt und einer der vier Kategorien zugeteilt:

1= geformt; 2= dickbreiig; 3= dünnbreiig; 4= suppig/wässrig.

8 Spezifische Wirksamkeitsparameter für probiotische Substanzen

Im Folgenden werden einige Parameter aufgeführt, die im Sinne eines Wirkungsnachweises der probiotischen Substanzen untersucht wurden. Dabei sind Messgrößen zur Charakterisierung intestinaler Effekte von solchen zur Darstellung systemischer Wirkungen zu unterscheiden (Lahrssen und Zentek, 2002):

Es wurden sowohl im Lactoferrin- als auch im *Ec. faecium*- Versuch verschiedene Kotuntersuchungen (bakteriologische Verfahren und Verfahren zur Charakterisierung der metabolischen Aktivität von Mikroorganismen) durchgeführt. Bei den Lactoferrin-Welpen wurde zusätzlich eine Untersuchung der Darmwand vorgenommen.

Zum Nachweis systemischer Effekte wurde ein rotes und weißes Blutbild angefertigt und die Wirkung auf das Immunsystem untersucht.

Diese Parameter werden in den Vet.med.-Dissertationen von Laur (München, 2003), Unsöld (München, 2003) und Weiss (München, 2003) veröffentlicht und sollen hier nur kurz aufgeführt werden.

Zum Nachweis einer Beeinflussung des antioxidativen Status wurden die unter Punkt 9 ausführlich beschriebenen Parameter untersucht.

8.1 Kotuntersuchungen

In frisch abgesetztem Kot wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Trockensubstanz-Bestimmung im Kot
- pH-Wert-Messung im Kot

- Bestimmung des Ammoniakgehaltes im Kot
- Bestimmung des L-Laktatgehaltes im Kot
- Mikrobiologische Kotuntersuchung:
 - Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl
 - Qualitative und quantitative Bestimmung von Escherichia coli
 - Qualitative und quantitative Bestimmung von Clostridien
 - Qualitative und quantitative Bestimmung von Enterokokken
 - Qualitative und quantitative Bestimmung von Laktobazillen

8.2 Untersuchungen der Darmwand

In der 14. Woche wurden den Lactoferrin-Welpen zur Untersuchung der Darmwand und des intestinalen Immunsystems endoskopisch Schleimhautbiopate aus dem Duodenum und Colon/Rektum entnommen.

Die Biopotentnahme wurde an der I. Medizinischen Tierklinik der LMU München durch Frau U. Buscher unter Leitung von Herrn Prof. Zentek (Wien) durchgeführt. Die immunhistochemische und histologische Probenuntersuchung (Zentek et al, 2002) erfolgte durch Herrn Prof. Zentek.

Für die Immunhistochemie wurden Gefrierschnitte angefertigt, in denen quantitativ CD4⁺- und CD8⁺- T-Zellen, Plasmazellen sowie IgA, IgG und IgM bestimmt wurden.

Die histologischen Befunde der Untersuchung der Gewebemorphologie wurden je nach Schweregrad der Veränderungen in vier Klassen (0 = normal; 1 = leicht; 2 = mäßig; 3 = schwer) eingestuft.

8.3 Blutbild

Die EDTA-Blutproben wurden in einem Cell-Dyn[®] 3500R -Automaten der I. Medizinischen Tierklinik der LMU München ausgewertet.

Folgende Blutparameter wurden gemessen:

Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin (MCH), mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDW), Thrombozyten, Leukozyten, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten.

8.4 Untersuchungen des Immunsystems

Die Blutproben aller Entnahmezeitpunkte (siehe Punkt 1 Versuchsaufbau) wurden auf ihren Gehalt an IgG und IgA mittels Sandwich-ELISA untersucht. Dazu wurde die von Erhard et al. (1995) beschriebene Methode zur Konzentrationsbestimmung von bovinem IgG für Hunde modifiziert angewandt.

In den Blutproben der Woche 10, 12 und 14 wurde außerdem der spezifische Antikörpergehalt gegen humanes Serumalbumin (hSa) gemessen. Da zur Zeit kein genormter Standard für die Bestimmung der Antikörper gegen hSa beim Hund verfügbar ist, wurden lediglich die im ELISA-Reader gemessenen Extinktionen miteinander verglichen.

9 Untersuchung des antioxidativen Status

9.1 Blutentnahme

Die erste Blutentnahme bei den Lactoferrin- und *Ec. faecium*-Welpen wurde an Tag 3 nach dem Absetzen vom Muttertier vor der ersten Flaschenfütterung vorgenommen. Von den Welpen der Mutteraufzucht wurde bereits an Tag 1 Blut gewonnen, es ließen sich jedoch nur wenige Mikroliter abnehmen.

Die weiteren Blutentnahmen erfolgten zu den unter Punkt 1 beschriebenen Zeitpunkten.

Bis Tag 14 konnte aufgrund der kleinen Venengröße und des langsamen Blutflusses sowie des geringen Gesamtblutvolumens der Welpen höchstens 200 µl Blut gewonnen werden, so dass nicht immer genügend Plasma bzw. Serum zur Bestimmung aller Parameter vorhanden war.

Als Entnahmeort wurde die *V. cephalica antebrachii* (Lactoferrin- und *Ec. faecium*-Welpen) bzw. die *V. jugularis* (Welpen der Mutteraufzucht) gewählt. Die Punktionsstelle wurde mit einer Schermaschine (Golden A5[®], Oster) geschoren und die Haut mit einem handelsüblichen Hautdesinfektionsmittel (2-Propanol 70%, Heiland) desinfiziert. Nach Stauung der Vene am Unterarm mittels Stauschlauch bzw. durch Fingerdruck auf die *V. jugularis* im unteren Halsdrittel erfolgte die Venenpunktion mit einer sterilen Einmalinjektionskanüle (Sterican[®] 0,70 x 30 mm, steril, B.Braun Melsungen AG). Das austretende Blut wurde mit einem Kapillarblutentnahmesystem (Multivette[®] 200 LH bzw. Multivette[®] 600 Z-Gel (Welpen der Mutteraufzucht) von Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) aufgefangen.

Ab Tag 56 wurden hierzu Lithium-Heparin-Röhrchen (Röhre 4 ml, Sarstedt AG &Co., Nümbrecht) verwendet und zusätzlich EDTA-Blut zur Erstellung eines Blutbildes gewonnen (Röhre 2 ml, Kalium-EDTA, 1,6 mg EDTA /ml Blut, Sarstedt AG &Co., Nümbrecht).

9.2 Behandlung und Lagerung der Blutproben

Das heparinisierte Blut der Lactoferrin- und Ec. faecium-Welpen wurde 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert (Heraeus Sepatech® Zentrifuge) und das Plasma anschließend in die vorbereiteten und beschrifteten Eppendorf-Cups pipettiert:

- TEAC-Bestimmung: 180 µl PBS-Puffer (pH 7,4) + 20 µl Plasma
- Immunglobulin- Bestimmung: 990 µl PBS-Puffer (pH 7,4) + 10 µl Plasma
- Vitamin E- Bestimmung: restliches Plasma in ein Cup, unverdünnt

Das gewonnene Blut der Welpen der Mutteraufzucht wurde 15 min bei Raumtemperatur stehengelassen und danach 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Das Serum wurde in die vorbereiteten und beschrifteten Eppendorf-Cups pipettiert:

- TEAC-Bestimmung: 50 µl Serum
- Freies Eisen, LEBK, Gesamteisen: 100 µl Serum
- Vitamin E- Bestimmung: 50 µl Serum
- Vitamin C- Bestimmung: 50 µl Serum + 50 µl meta-Phosphorsäure 5%-ig

Die Serum- und Plasmaproben wurden gekühlt transportiert und bis zur Analyse bei –80°C eingefroren. Das EDTA-Blut wurde in der I.Medizinische Tierklinik der LMU München sofort ausgewertet.

9.3 Bestimmung des antioxidativen Status im Blut

Der antioxidative Status wurde nach der von Miller et al. (1996) beschriebenen Methode bestimmt. Die Einheit der Messergebnisse ist die TEAC – Trolox equivalent antioxidant capacity. Sie ist definiert als die Konzentration von Trolox in mmol/l, die eine gleichwertige antioxidative Kapazität wie eine 1,0 mmol/l Lösung der zu untersuchenden Substanz (hier Plasma bzw. Serum) besitzt.

9.3.1 Testprinzip

Bei der Reaktion von Manganese-Dioxide mit 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) entsteht ein relativ langlebiges Radikal-Kation, das $ABTS^{*+}$, mit einem Absorptionsmaximum bei 734 nm.

In der Gegenwart von Antioxidantien wird die Bildung dieses Radikals vermindert. Im Plasma kommen als Antioxidantien hauptsächlich Ascorbinsäure, α -Tocopherol, Bilirubin, Albumin und Harnsäure vor. Ihre antioxidative Kapazität lässt sich durch Reaktion mit dem $ABTS^{*+}$ -Radikal bestimmen, indem nach Zugabe von Plasma die Abnahme der Farbtintensität der $ABTS^{*+}$ -Lösung am Photometer bei 734 nm gemessen wird.

9.3.2 Reagenzien

- **5 mM PBS-Puffer-Lösung pH 7,4:**

$Na_2HPO_4 \times 12H_2O$ (1,7907 g/l) wurde mit $NaH_2PO_4 \times H_2O$ (0,655 g/l) zu einem pH von 7,40 gemischt und 9,0 g/l NaCl zugesetzt

- **$ABTS^{*+}$ -Radikal-Kation:**

Eine 5mM ABTS-Stammlösung wurde hergestellt: 0,1372 g ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt; Sigma[®], Deisenhofen) wurden abgewogen (Sartorius Waage) und in 50 ml PBS-Puffer gelöst.

Diese hellgrüne ABTS-Lösung wurde über Mangan-Dioxid (MnO_2 , activated; Sigma[®], Deisenhofen) durch ein Whatman No.5 -Filtrierpapier gegossen. Dabei entstand das $ABTS^{*+}$ -Radikal-Kation und die Lösung färbte sich dunkelgrün. Überschüssiges MnO_2 wurde durch Filtration durch einen 0,2 μ M Whatman PVDF syringe filter entfernt.

Die $ABTS^{*+}$ -Lösung ist einige Tage im Dunkeln bei Kühlschranktemperatur haltbar. Kurz vor der Messung wurde sie mit PBS-Puffer auf eine Extinktion von 0,700 (+/- 0,002) bei 734 nm verdünnt. Als Nullwert diente PBS-Puffer (siehe Punkt 9.3.3).

- **Trolox:**

Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid; Sigma[®], Deisenhofen) wurde als antioxidativer Standard verwendet.

Für eine 2,5 mM Troloxlösung wurden 62,57mg Trolox abgewogen (Sartorius Waage) und mit 100 ml PBS-Puffer versetzt. Da bei diesem pH und dieser Konzentration die Löslichkeitsgrenze für Trolox erreicht ist, müssen die Kristalle mit Ultraschall in Lösung gebracht werden.

Diese Stammlösung kann eingefroren werden, sie ist bei -20°C mindestens 6 Monate haltbar.

Täglich frisch wurden daraus die Verdünnungen für eine Kalibrierkurve hergestellt:

- 2,5 mM Trolox – unverdünnt
- 2,0 mM Trolox – 100 μl 2,5 mM Trolox + 25 μl PBS
- 1,5 mM Trolox – 100 μl 2,5 mM Trolox + 65 μl PBS
- 1,0 mM Trolox – 100 μl 2,5 mM Trolox + 150 μl PBS
- 0,5 mM Trolox – 100 μl 2,5 mM Trolox + 400 μl PBS
- 0,0 mM Trolox – nur PBS

Da die Plasmaproben der Lactoferrin- und Ec. faecium-Welpen aufgrund des geringen Probenvolumens zur besseren Handhabung 1:10 mit PBS-Puffer verdünnt worden waren (siehe Punkt 9.2), erfolgte für die Auswertung dieser Proben auch bei den 0,5 bis 2,5 mM Troloxstandards eine 1:10 -Verdünnung, um eine gleichwertige Kalibrierkurve zu erhalten.

Für die unverdünnten Serumproben der Mutteraufzucht-Welpen wurden die obengenannten Troloxstandards verwendet.

9.3.3 Methode

Vor Messung der Proben wurde der Nullwert am Photometer (Spectronic 601, MILTON ROY) bei 734 nm mit PBS-Puffer eingestellt.

Die ABTS^{•+}- Stammlösung wurde mit PBS-Puffer auf eine Extinktion von 0,700 (+/- 0,002) verdünnt.

Eine Kalibrierkurve wurde täglich erstellt, da die Reaktion temperaturabhängig ist. Die Messungen fanden bei Raumtemperatur statt.

Kalibrierung für die Bestimmung der TEAC in den Plasmaproben:

50 μl von jeder 1:10 verdünnten Standardlösung (s.o.) wurden in eine PMMA-halbmikro-Küvette (Plastibrand[®], BRAND) pipettiert und 950 μl ABTS^{•+}-Lösung (Ext. = 0,700) hinzugegeben. Nach kurzem Schütteln wurde die Extinktion bei 734 nm nach exakt 1 Minute abgelesen. Es wurden Doppelmessungen durchgeführt.

Kalibrierung für die Bestimmung der TEAC in den Serumproben: Der Vorgang war der gleiche, jedoch wurden 10 μl von jeder Standardlösung (s.o.) in eine Küvette pipettiert und 990 μl ABTS^{•+}-Lösung (Ext. = 0,700) hinzugegeben.

Analog wurde mit den Proben verfahren:

Nach Auftauen der Proben wurden 50 µl 1:10 verdünntes Plasma bzw. 10 µl Serum in eine Küvette pipettiert und mit 950 µl bzw. 990 µl ABTS^{•+}-Lösung (Ext. = 0,700) gemischt. Nach exakt 1 Minute wurde der Wert am Photometer abgelesen. Es wurden Doppelwerte bestimmt.

9.3.4 Berechnung

9.3.4.1 Kalibrierkurve

Von den Doppelmessungen der Standardlösungen wurden die Extinktionsmittelwerte berechnet.

Aus diesen Mittelwerten und folgender Formel ergibt sich für die verschiedenen Standardkonzentrationen die sog. „TAA“ (Total Antioxidant Activity):

$$TAA_{\text{Standard}} = \frac{\text{Extinktion}_{\text{Nullwert (0 mmol/l Trolox)}} - \text{Extinktion}_{\text{Standard (x mmol/l Trolox)}}}{\text{Extinktion}_{\text{Nullwert (0 mmol/l Trolox)}}}$$

Mit diesen Werten wurde die Kalibrierkurve erstellt:

Auf der X-Achse wurde die Troloxkonzentration in mmol/l aufgetragen, auf der Y-Achse die dazugehörige TAA.

Mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogrammes (Microsoft[®] Excel 97) wurde eine Trendlinie in dieses Diagramm gezeichnet und ihre Formel berechnet.

9.3.4.2 TEAC

Aus den Doppelwerten der Probenmessungen wurden ebenfalls die Extinktionsmittelwerte berechnet und die TAA der einzelnen Proben bestimmt:

$$TAA_{\text{Probe}} = \frac{\text{Extinktion}_{\text{Nullwert (0 mmol/l Trolox)}} - \text{Extinktion}_{\text{Probe (x mmol/l Trolox)}}}{\text{Extinktion}_{\text{Nullwert (0 mmol/l Trolox)}}}$$

Die Formel der Kalibrierkurve wurde nach x umgestellt und durch Einsetzen des Wertes TAA_{Probe} die $TEAC_{\text{Probe}}$ (trolox equivalent antioxidant capacity) in mmol/l berechnet.

Beispiel:

Formel der Kalibrierkurve: $y = 0,3709 x - 0,006$

$x = (y + 0,006) / 0,3709$

$\text{TEAC}_{\text{Probe}} \text{ (mmol/l)} = (\text{TAA}_{\text{Probe}} + 0,006) / 0,3709$

9.4 Bestimmung von freiem Eisen und der latenten Eisenbindungskapazität im Serum

Die Bestimmungen wurden mit Hilfe eines Testkits zur Bestimmung von Eisen und latenter Eisenbindungskapazität (Sigma Diagnostics® Methode-Nr. 565) durchgeführt. Die Methode basiert auf der von Persijn et al (1971) beschriebenen Bestimmung von Serumeisen mit Ferrozin. Die Durchführung des Tests zur Bestimmung der latenten Eisenbindungskapazität wurde modifiziert, um zusätzlich eventuell vorhandenes freies Eisen im Serum nachzuweisen.

9.4.1 Testprinzip

Ferrozin, ein sulfoniertes Derivat von Diphenyltriazin, bildet mit Eisen einen wasserlöslichen magentaroten Komplex mit einem Absorptionsmaximum nahe 560 nm.

Durch Zugabe von Ferrozin zum Serum lässt sich so freies Eisen photometrisch bestimmen.

Zur Bestimmung der latenten Eisenbindungskapazität (LEBK) werden der Serumprobe bei einem alkalischen pH-Wert Eisenionen zugesetzt. Diese lagern sich spezifisch an freie Eisenbindungsstellen des Transferrins an. Die nicht gebundenen Eisenionen werden mit Hilfe der Ferrozin-Reaktion bestimmt. Die Differenz zwischen ungebundenem Eisen und der zum Serum zugegebenen Gesamtmenge an Eisen entspricht dem transferringebundenen Eisen. Sie wird als LEBK bezeichnet.

Die Summe aus Gesamteisen (siehe Punkt 9.5) und LEBK entspricht der totalen Serumeisenbindungskapazität.

9.4.2 Reagenzien

Alle Reagenzien stammten aus dem Testkit von Sigma Diagnostics® zur Bestimmung von Eisen und totaler Eisenbindungskapazität (Sigma®, Deisenhofen).

- **EBK-latent-Puffer**, Katalog-Nr. 565-2
0,5 mol/l TRIZMA[®], pH 8,1 , mit oberflächenaktivem Stoff und 0,05 % Natriumazid als Konservierungsmittel.
- **Eisenfarbreagenz**, Katalog-Nr. 565-3
0,85 % Ferrozin (w/v) in Hydroxylamin-Hydrochloridlösung mit zugesetztem Stabilisator.
- **Eisenstandard**, Katalog-Nr. 565-5
500 µg/dl (89 µmol/l) Eisen in Hydroxylamin-Hydrochloridlösung.

9.4.3 Testdurchführung

Die Serumproben der Welpen aus der Mutteraufzucht wurden aufgetaut.

In die für LEERWERT, STANDARD und PROBE beschrifteten PMMA-halbmikro-Küvetten wurden folgende Reagenzien pipettiert:

LEERWERT	STANDARD	PROBE
400 µl EBK-latent-Puffer	400 µl EBK-latent-Puffer	400 µl EBK-latent-Puffer
100 µl Aqua dest.	100 µl Eisenstandard	50 µl Serum + 50 µl Aqua dest.

Jede Küvette wurde sorgfältig gemischt und die Absorption von STANDARD und PROBE gegen den LEERWERT als Referenz bei 560 nm am Photometer (Spectronic 601, MILTON ROY) registriert. Dieser Wert wurde als INITIAL bezeichnet.

Anschließend wurden in jede Küvette 10µl Eisenfarbreagenz pipettiert, die Ansätze sorgfältig gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur abgedeckt stehen gelassen.

Nach dieser Inkubationszeit wurde die Absorption von STANDARD und PROBE gegen den LEERWERT bei 560 nm gemessen und der Wert als FINAL_{freies Eisen} bezeichnet.

Zur Bestimmung der latenten Eisenbindungskapazität wurden anschließend zum LEERWERT und STANDARD jeweils 100 µl Aqua dest. und zur PROBE 100 µl Eisenstandard hinzupipettiert. Die Küvetten wurden sorgfältig gemischt und weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur abgedeckt stehen gelassen.

Die Absorption von STANDARD und PROBE gegen den LEERWERT bei 560 nm wurde als FINAL_{LEBK} bezeichnet.

9.4.4 Berechnung

9.4.4.1 Freies Eisen

Die Differenz von FINAL_{freies Eisen} und INITIAL wurde für STANDARD und PROBE berechnet:

$$\Delta \text{ STANDARD} = \text{FINAL}_{\text{freies Eisen STANDARD}} - \text{INITIAL}_{\text{STANDARD}}$$

$$\Delta \text{ PROBE} = \text{FINAL}_{\text{freies Eisen PROBE}} - \text{INITIAL}_{\text{PROBE}}$$

Ist $\Delta \text{ PROBE} > 0,000$, so ist freies Eisen in der Probe vorhanden. Die Konzentration lässt sich mit folgender Gleichung berechnen:

$$\text{Freies Eisen im Serum } (\mu\text{g /dl}) = \frac{\Delta \text{ PROBE}}{\Delta \text{ STANDARD}} \times 500^* \times 2^{**}$$

* Konzentration ($\mu\text{g/dl}$) des Eisenstandards

** Verdünnung des Serums mit gleicher Menge Aqua dest.

Um die Ergebnisse in SI-Einheiten ($\mu\text{mol/l}$) anzugeben, wird der Wert ($\mu\text{g /dl}$) mit 0,179 multipliziert.

9.4.4.2 Latente Eisenbindungskapazität

Die Differenz von FINAL_{LEBK} und INITIAL wurde für STANDARD und PROBE berechnet:

$$\Delta \text{ STANDARD} = \text{FINAL}_{\text{LEBK STANDARD}} - \text{INITIAL}_{\text{STANDARD}}$$

$$\Delta \text{ PROBE} = \text{FINAL}_{\text{LEBK PROBE}} - \text{INITIAL}_{\text{PROBE}}$$

Die Werte wurden in die folgende Gleichung eingesetzt:

$$\text{LEBK im Serum } (\mu\text{g /dl}) = (500^* - \frac{\Delta \text{ PROBE}}{\Delta \text{ STANDARD}} \times 500^*) \times 2^{**}$$

* Konzentration ($\mu\text{g/dl}$) des Eisenstandards

** Verdünnung des Serums mit gleicher Menge Aqua dest.

Um die Ergebnisse in SI-Einheiten ($\mu\text{mol/l}$) anzugeben, wurde der LEBK-Wert ($\mu\text{g /dl}$) mit 0,179 multipliziert.

9.5 Bestimmung der Gesamteisenkonzentration im Serum

9.5.1 Testprinzip

Zur Bestimmung des Gesamteisens im Serum wurde der Ferrozin-Test nach Ceriotty und Ceriotty (1980) modifiziert angewandt.

Bei einem sauren pH-Wert und in Gegenwart eines geeigneten Reduktionsmittels wird das im Serum an Transferrin gebundene Eisen abgespalten und bildet Eisenionen. Diese reagieren mit Ferrozin unter Bildung eines magentaroten Komplexes mit einem Absorptionsmaximum nahe 560 nm. Die bei dieser Wellenlänge vor und nach der Zugabe von Ferrozin zu beobachtende Differenz in der Farbintensität ist der Serumeisenkonzentration proportional.

9.5.2 Reagenzien

- **Ascorbinsäure / Thioharnstoff:**

1,0 g L(+)-Ascorbinsäure, p.a. (Merck KGaA, Darmstadt) und 0,25 g Thioharnstoff (Sigma[®], Deisenhofen) wurden in einen 200 ml -Messkolben eingewogen, mit etwas Aqua dest. gelöst, 10 ml 1M HCl zugegeben und anschließend mit Aqua dest. auf 200 ml aufgefüllt.

Diese Lösung wurde täglich frisch zubereitet.

- **Glycinpuffer pH 4,15:**

Dazu wurden 1,5014 g Glycin (Sigma[®], Deisenhofen) in 100 ml 5mM HCl gelöst (0,2M Glycin in 5mM HCl). Der Puffer wurde im Kühlschrank gelagert.

- **Ferrozine:**

20 mg Ferrozine (3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(4-Phenyl-Sulfonic-Acid)-1,2,4-Triazine; Sigma[®], Deisenhofen) wurden in 1 ml Aqua dest. gelöst. Das Eisenfarbreagenz wurde täglich frisch hergestellt.

- **SDS:**

Für eine 10 % ige Lösung wurden 20 g SDS (Sodium dodecyl sulfate; Sigma[®], Deisenhofen) in 180 ml Aqua dest. gelöst.

- **Eisenstandard:**

500 µg/dl (89 µmol/l) Eisen in Hydroxylamin-Hydrochloridlösung (Sigma[®], Deisenhofen)

9.5.3 Methode

Die Serumproben der Welpen aus der Mutteraufzucht wurden aufgetaut.

In die für LEERWERT, STANDARD und PROBE beschrifteten PMMA-halbmikro-Küvetten wurden folgende Reagenzien pipettiert:

LEERWERT	STANDARD	PROBE
1000 µl Asc. / Thioharn.	1000 µl Asc. / Thioharn.	1000 µl Asc. / Thioharn.
250 µl Glycin-Puffer	250 µl Glycin-Puffer	250 µl Glycin-Puffer
100 µl SDS	100 µl SDS	100 µl SDS
100 µl Aqua dest.	100 µl Eisenstandard	50 µl Serum + 50 µl Aqua dest.

Die Ansätze wurden mit Hilfe eines Rührstäbchens sorgfältig gemischt und die Absorption von STANDARD und PROBE gegen den LEERWERT als Referenz bei 562 nm am Photometer gemessen. Dieser Wert wurde als INITIAL bezeichnet.

Nach Zugabe von je 10 µl Ferrozin wurden die Küvetten sorgfältig gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur abgedeckt stehen gelassen.

Die anschließend gemessene Absorption von STANDARD und PROBE gegen den LEERWERT bei 562 nm wurde als FINAL bezeichnet.

9.5.4 Berechnung

9.5.4.1 Gesamteisenkonzentration im Serum

Zunächst wurde für STANDARD und PROBE die Differenz von FINAL und INITIAL berechnet:

$$\Delta \text{ STANDARD} = \text{FINAL}_{\text{STANDARD}} - \text{INITIAL}_{\text{STANDARD}}$$

$$\Delta \text{ PROBE} = \text{FINAL}_{\text{PROBE}} - \text{INITIAL}_{\text{PROBE}}$$

Durch Einsetzen dieser Werte in die folgende Gleichung ergab sich die Gesamteisenkonzentration im Serum:

$$\text{Gesamteisen im Serum } (\mu\text{g /dl}) = \frac{\Delta \text{ PROBE}}{\Delta \text{ STANDARD}} \times 500^* \times 2^{**}$$

* Konzentration ($\mu\text{g/dl}$) des Eisenstandards

** Verdünnung des Serums mit gleicher Menge Aqua dest.

Um die Ergebnisse in SI-Einheiten ($\mu\text{mol/l}$) anzugeben, wurde der Wert ($\mu\text{g /dl}$) mit 0,179 multipliziert.

9.5.4.2 Totale Eisenbindungskapazität und Transferrin-Sättigung

Die Summe aus Gesamteisen im Serum plus latenter Eisenbindungskapazität ergab die totale Eisenbindungskapazität im Serum (TEBK, $\mu\text{g/dl}$).

Mit diesem Wert ließ sich die Transferrin-Sättigung im Blut berechnen:

$$\text{Transferrin-Sättigung in \%} = \frac{\text{Gesamteisen im Serum } (\mu\text{g/dl})}{\text{TEBK } (\mu\text{g/dl})} \times 100$$

9.6 Bestimmung der Vitamin E - Konzentration im Plasma

9.6.1 Prinzip

Die Vitamin E- Konzentration im Plasma wurde mittels high performance liquid chromatography (HPLC) mit Fluoreszenzdetektor gemessen. Nach Präzipitation der Plasmaproteine mit Ethanol wurde das Vitamin E mit Hexan extrahiert. Die Hexanphase wurde unter Stickstoffgas verdampft und das trockene Vitamin E in ein Methanol-Ethanol-Gemisch für die HPLC-Analytik aufgenommen.

9.6.2 Reagenzien

- **α -Tocopherol:** (Art.Nr. T-3251, Sigma[®], Deisenhofen)
- **n-Hexan:** p.a., ACS (Merck KGaA, Darmstadt)

- **Methanol:**
LiChrosolv[®], gradient grade für Flüssigkeitschromatographie (Merck KGaA, Darmstadt)
- **Ethanol:**
LiChrosolv[®], gradient grade für Flüssigkeitschromatographie (Merck KGaA, Darmstadt)
- **BHT – Butylated Hydroxytoluene:** (Art.Nr. B-1378, Sigma[®], Deisenhofen)
BHT dient als Radikalfänger und schützt das Vitamin E in der Probe vor Oxidation. Es wurde eine 0,04 %ige Lösung in Ethanol hergestellt (40 mg BHT / 100 ml Ethanol).
- **Lösungsmittel:** Methanol (80 Volumenteile) : Ethanol (20 Volumenteile)
- **Elutionsmittel:** Methanol mit 3 % Millipore-Wasser.

9.6.3 Methode

9.6.3.1 Herstellung eines Vitamin E- Standards

Ein Tropfen α -Tocopherol wurde in 100 ml Ethanol gelöst und die Extinktion in einer UV-halbmikro-Küvette (Plastibrand[®], BRAND) bei 295 nm photometrisch gemessen. Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von α -Tocopherol (75,8) und des Molekulargewichts (430,69 g/mol) ließ sich die molare Konzentration der Standardlösung bestimmen:

$$\text{Extinktion}_{295\text{nm}} : 75,8 = x_1 \text{ g}/100 \text{ ml} (= x_2 \text{ g/l})$$

$$x_2 \text{ g/l} : 430,69 \text{ g/mol} = y_1 \text{ mol/l} (= y_2 \mu\text{mol/l}).$$

Diese Standardlösung wurde mit Ethanol weiter in einen Bereich verdünnt, der dem Vitamin E- Gehalt von Hundeplasma entspricht (~ 50 $\mu\text{mol/l}$).

9.6.3.2 Vitamin E- Extraktion

Zur Extraktion des Vitamin E aus der Plasmaprobe bzw. der Standardlösung wurden in 2 ml-Eppendorf-Cups folgende Reagenzien pipettiert:

- 100 μl Millipore-Wasser
- 700 μl Ethanol mit 0,04 % BHT
- 100 μl Millipore-Wasser (LEERWERT) bzw.
100 μl Vitamin E- Standard (STANDARD) bzw.
50 μl Plasma /Serum + 50 μl Millipore-Wasser (PROBE).

Nach kurzem Vermischen wurden je 800 µl Hexan hinzupipettiert und die Ansätze bei + 4°C 15 Minuten lang in einem Eppendorf-Schüttelgerät geschüttelt. Anschließend wurden sie 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus).

Die Hexanphase wurde abpipettiert, in ein 2 ml-Eppendorf-Cup überführt und dieses zwischen-zeitlich dunkel gestellt.

Auf die wässrige Phase wurden erneut 800 µl Hexan gegeben und die Ausschüttelprozedur wiederholt. Nach Zentrifugation wurde die Hexanphase abpipettiert und mit der ersten vereinigt.

Das Extraktionsmittel wurde unter Stickstoffgas bis zur Trockenheit verdampft. Zur Beschleunigung dieses Vorgangs wurden die Cups in warmes Wasser gestellt.

Das trockene Vitamin E wurde durch Zugabe von 1,5 ml Methanol-Ethanol- Gemisch (80 : 20) gelöst und anschließend bis zur Analytik bei – 20°C gelagert.

9.6.3.3 HPLC- Analytik

Die tiefgekühlten Standard-/Probenauszüge wurden auf Raumtemperatur gebracht und für den Messvorgang in HPLC-Vials mit Glaseinsatz pipettiert.

HPLC-Bedingungen:

- **Elutionsmittel:** Methanol mit 3 % Millipore-Wasser
- **Pumpe:** Jasco BIP 1, Flußrate: 1 ml/min, Druck ca. 0,9 x 100 kg/cm²
- **Probengeber:** Spectra SYSTEM AS 3000, Spectra-Physics Analytical, Injektions-Volumen: 50 µl, Analysezeit: 10 Minuten
- **Säule:** Lichrosorb RP18, 5 µm, 125 x 4 mm, Fa. Grom
- **Detektor:** Jasco 821 FP Fluoreszenzdetektor (Exzitation 290 nm, Emission 330 nm)

Zunächst wurden der Leerwert und ein Standard gemessen, um den Zeitpunkt zu ermitteln, an dem der Vitamin E- Peak erscheint. Anschließend wurden die Proben analysiert. Nach ca. 10 Proben wurde erneut ein Standard mitgemessen.

9.6.4 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Chromatographie-Software (Microsoft® Borwin). Die Vitamin E- Peaks von Standard und Probe wurden integriert und die Flächen berechnet.

Da die Peakfläche der Vitamin E- Konzentration proportional ist, wurden über die Fläche des Standards und seiner bekannten molaren Konzentration die Vitamin E- Konzentrationen der Proben berechnet. Das Ergebnis wurde mit 2 multipliziert, da die Plasmaproben mit gleicher Menge Millipore-Wasser verdünnt worden waren.

9.7 Bestimmung der Vitamin C - Konzentration im Serum

9.7.1 Prinzip

Es wurde die von Schüep et al. (1984) beschriebene Methode zur Bestimmung von Ascorbinsäure in Körperflüssigkeiten, Geweben und Nahrungsmitteln modifiziert angewandt. L-Ascorbinsäure wird durch Zusatz von Jodlösung oxidiert, wobei L-Dehydro-Ascorbinsäure (DHA) entsteht. Diese bildet mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin das 2,4-Phenylhydrazon. Durch Extraktion mit Ethylacetat kann dieses Derivat quantitativ mittels high performance liquid chromatography (HPLC) bestimmt werden.

9.7.2 Reagenzien

- **meta-Phosphorsäure:**

p.a., (Merck KGaA, Darmstadt)

5 % ig in Aqua dest.; die Kristallstücke wurden mit Hilfe eines Magnetrührstabes in Lösung gebracht.

- **Thioharnstoff:**

1 g ad 200 ml Aqua dest. (Thiourea; Sigma[®], Deisenhofen).

- **Jodlösung:**

0,05 N Jod Titrisol, (Merck KGaA, Darmstadt)

- **Schwefelsäure:**

Konzentrierte Schwefelsäure 1:4 mit Aqua dest. verdünnt. Dazu wurde ein Becherglas mit 300 ml Aqua dest. in einem Eisbehälter gekühlt und 100 ml konzentrierte Schwefelsäure unter Rühren hinzugegeben.

- **Dinitrophenylhydrazin:**

200 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazin (Sigma[®], Deisenhofen) wurden in 10ml 1:4 verdünnter Schwefelsäure gelöst.

- **Extraktionsreagenz:**

Ethylacetat (p.a., Merck KGaA, Darmstadt) mit 2% Eisessig (100% ige Essigsäure, p.a., ACS, ISO, Merck KGaA, Darmstadt)

- **Elutionsmittel:**

Ethylacetat (p.a., Merck KGaA, Darmstadt) + Diisopropylether (p.a., Merck KGaA, Darmstadt) im Verhältnis 2 : 3, + 1% Eisessig (Merck KGaA, Darmstadt)

- **Vitamin C:**

L(+)-Ascorbinsäure, p.a., (Merck KGaA, Darmstadt)

9.7.3 Methode

9.7.3.1 Herstellung eines Vitamin C- Standards

100 mg Vitamin C wurden exakt abgewogen (Sartorius-Waage) und mit 1 ml meta-Phosphorsäure versetzt. Diese Stammlösung wurde mit meta-Phosphorsäure auf Konzentrationen von 0,005 mg/ml (STANDARD I), 0,01 mg/ml (STANDARD II), 0,02 mg/ml (STANDARD III) und 0,05 mg/ml (STANDARD IV) verdünnt. Die Vitamin C- Standards wurden täglich frisch hergestellt.

9.7.3.2 Probenvorbereitung

Die sofort nach der Blutentnahme 1:1 mit meta-Phosphorsäure versetzten Serumproben wurden aufgetaut.

In Eppendorf-Cups mit Schraubverschluss wurden folgende Reagenzien pipettiert:

- 100 µl meta-Phosphorsäure (LEERWERT) bzw.
- 100 µl Standard I, II, III, IV (STANDARD) bzw.
- 100 µl Serum/meta-Phosphorsäure-Gemisch (PROBE)
- + 100 µl meta-Phosphorsäure – Ansätze schütteln
- + 30 µl Thioharnstoff – Ansätze schütteln
- + 50 µl Jodlösung – schütteln bis zur Entfärbung
- + 50 µl Dinitrophenylhydrazin – 20 Sekunden vortexen

Die Ansätze wurden 5 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus) und anschließend 3 Stunden bei 50°C im Trockenschrank (FUNCTION line, Heraeus) inkubiert. Alternativ konnten sie über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur stehen gelassen werden.

9.7.3.3 HPLC-Analytik

Das während der Inkubation gebildete Derivat wurde mit 250 µl Ethylacetat + 2 % Eisessig extrahiert, in dem die Ansätze 2 Minuten kräftig geschüttelt (Vortex-Schüttler, cenco instrumenten b.v.) und anschließend 5 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert wurden. Der gelbe organische Überstand wurde in ein 500 µl-Eppendorf-Cup pipettiert, sofort verschlossen und im HPLC- Gerät gemessen.

Da die Proben nach Ethylacetatextraktion nur ca. 1 Stunde haltbar sind, wurden lediglich 5 Proben auf einmal ausgeschüttelt und analysiert (HPLC-Analysezeit beträgt 12 Minuten je Probe).

HPLC-Bedingungen:

- **Elutionsmittel:** Ethylacetat : Diisopropylether im Verhältnis 2 : 3, + 1% Eisessig
- **Pumpe:** Gynkotek High Precision Pump Model 300 C, Flußrate: 1,5 ml/min, Druck: ca. 60 bar auf der Anzeige
- **Probengeber:** Kontron HPLC Autosampler 460, Injektionsvolumen: 20 µl, Analysezeit: 12 Minuten
- **Säule:** Lichrosorb Si 60, 5µm, 250 x 4,6 mm, + Vorsäule
- **Detektor:** UVIKON 735 LC, Fa. KONTRON INSTRUMENTS, Wellenlänge 520 nm.

9.7.4 Auswertung

Die Proben wurden mit Hilfe einer Chromatographie-Software (Microsoft® Borwin) ausgewertet. Nach Integration der Peaks und Berechnung der Flächeninhalte wurden die Flächen der Serumproben mit denen der bekannten Standards verglichen und die Vitamin C-Konzentration der Proben ausgerechnet.

10 Statistische Methoden

Es wurden Mittelwerte und Standardabweichungen von den Daten der einzelnen Welpengruppen berechnet. Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms GraphPad InStat®. Zur Erfassung signifikanter Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen wurden der *U*-Test nach Mann und Whitney sowie der *H*-Test nach

Kruskal und Wallis angewandt. Der TEAC-Verlauf in der Neugeborenenphase wurde beurteilt, indem die Werte von Tag 3, 7 und 14 auf statistisch signifikante Unterschiede zum Mittelwert der Tage 56 und 70 geprüft wurden (*H*-Test nach Kruskal und Wallis). Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde dabei als signifikant, von $p < 0,01$ als hochsignifikant und von $p < 0,001$ als sehr hoch signifikant angesehen.

D Ergebnisse

1 Allgemeine Untersuchungsparameter

Da die Fütterung einen Einfluss auf den antioxidativen Status im Blut ausübt, wurde die Futteraufnahme, Gewichtsentwicklung und Futtermittelverwertung der einzelnen Versuchsgruppen bestimmt. Die genauen Werte und Standardabweichungen sowie die weiteren Ergebnisse der untersuchten Aufzuchtparameter (allg. klinische Untersuchung, Kotabsatz) wurden in den Dissertationen von Laur (2003), Unsöld (2003) und Weiss (2003) beschrieben.

1.1 Futteraufnahme und Gewichtsentwicklung

In den ersten beiden Lebenswochen erhielten die Welpen Milchaustauscher ad libitum, danach erfolgte die Fütterung rationiert und der individuellen Gewichtsentwicklung angepasst.

Die Futteraufnahme der Welpen wurde durch die Zufütterung von Lactoferrin bzw. *Ec. faecium* in keinem nennenswerten Umfang beeinflusst. Auch hinsichtlich der Gewichtsentwicklung unterschieden sich die Versuchsgruppen nur undeutlich von den Kontrollgruppen. Dagegen zeigten sowohl die Probiotikum- als auch die Kontrollwelpen des *Ec. faecium*-Versuchs in den ersten 4 Lebenswochen eine höhere relative Gewichtszunahme als die Welpen des Lactoferrin-Versuchs. Dies lässt sich durch die anfänglich höheren Milchaustauscheraufnahmen der *Ec. faecium*-Welpen erklären.

Die durchschnittliche tägliche Futteraufnahme stieg mit zunehmendem Alter an. Die Welpen des Lactoferrin-Versuchs nahmen in der ersten Woche ca. 70 g Milchaustauscher/Tag und zu Versuchsende täglich ca. 250 g Trockenfutter auf. Die Gruppe 3 (60/95 mg Lf / kg TS) nahm über die gesamte Versuchsdauer gesehen am wenigsten Futter auf, während die Gruppe 4 (60 mg Lf / kg TS) die höchste Futteraufnahme zu verzeichnen hatte. Die Unterschiede in der Futteraufnahme zwischen der Kontrollgruppe und den einzelnen Lactoferrin-Gruppen waren zu keinem Zeitpunkt signifikant.

Die Kontrollwelpen des *Ec. faecium*-Versuchs nahmen durchschnittlich 115 g Milchaustauscher/Tag in Woche 1 und 950 g Feuchtfutter/Tag in Woche 14 auf. Damit unterschieden sie sich nur unwesentlich von der Probiotikumgruppe, die ihre tägliche Futteraufnahme von

anfangs durchschnittlich 113 g auf 985 g zu Versuchsende steigerte. Bei der Betrachtung der verschiedenen Fütterungsperioden nahm die Kontrollgruppe in der Milchaustauscherperiode und die Probiotikumgruppe in der Festfutterperiode mehr Futter auf. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Beim Vergleich der Milchaustauscheraufnahme in den ersten vier Wochen konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den Welpen des Lactoferrin- und des *Ec. faecium*-Versuchs festgestellt werden. Während die Lactoferrin-Welpen in der ersten Woche im Durchschnitt 500 g Milchaustauscher aufnahmen, waren es bei den Welpen des *Ec. faecium*-Versuchs durchschnittlich 800 g. Auch in den folgenden Wochen blieb der Unterschied signifikant. In der 4. Woche glichen sich die aufgenommenen Milchaustauschermengen allmählich an.

Die Geburtsgewichte der Welpen aus dem Lactoferrin-Versuch lagen zwischen 265 und 314 g. Die Welpen der Kontrollgruppe waren im Durchschnitt am leichtesten, gefolgt von denen der Gruppe 5 (120 mg Lf / kg TS). Die höchsten Geburtsgewichte wies die Gruppe 4 (60 mg Lf / kg TS) auf. Die Verdoppelung des Geburtsgewichts war bei der Kontrollgruppe und der Gruppe 5 an Tag 9 erreicht, bei den Gruppen 2, 3 und 4 dagegen bereits an Tag 6. Die signifikanten Gewichtsunterschiede zu Versuchsbeginn blieben bis zur 4. Woche bestehen. Danach wiesen die Welpen der Gruppe 4 (60 mg Lf / kg TS) die höchsten Körpergewichte auf, während sich die anderen Gruppen kaum unterschieden. In der 8. Woche lag die Gruppe 3 (60/95 mg Lf / kg TS) mit ca. 3385 g unter dem Durchschnittsgewicht der anderen Gruppen (3563 g) und holte dieses Defizit bis zum Versuchsende nicht mehr auf. Mit durchschnittlich 6,3 kg waren die Welpen der Gruppe 3 in der 14. Woche somit deutlich leichter als die der anderen Versuchsgruppen, die zwischen 6,7 und 6,8 kg wogen. Dieser Verlauf der Gewichtsentwicklung lässt keinen einheitlichen Effekt der Lactoferrinsupplementierung erkennen. Die absoluten Zunahmen der Welpen lagen anfangs bei ungefähr 200 g / Woche und gegen Versuchsende bei 600 g / Woche. In Relation zum Körpergewicht entspricht dies einer Zunahme von 32 % in der 1. Woche und 9 % in der 14. Woche. Mit Beginn des Absetzens (8. Woche) war ein leichter Rückgang der Zunahmen zu verzeichnen.

Die Geburtsgewichte der Welpen aus dem *Ec. faecium*-Versuch lagen zwischen 319 g und 455 g. Die Verdoppelung des Geburtsgewichts war in beiden Gruppen an Tag 7 erreicht. Zu Versuchsbeginn waren die Probiotikum-Welpen im Schnitt 35 g leichter, holten die Kontrollgruppe jedoch bis zur 7. Woche ein und wiesen ab der 12. Woche etwas höhere durchschnittliche Körpergewichte auf. Die prozentuale Gewichtszunahme im Vergleich zur Vorwoche sank bei beiden Gruppen mit zunehmendem Alter ab. In der 1. Woche betrug sie

48 % (Kontrollgruppe) und 50 % (Probiotikumgruppe), in der 14. Woche noch 6,6 % bzw. 6,4 %. Die Unterschiede in der Gewichtsentwicklung zwischen der Kontroll- und der Probiotikumgruppe waren zu keinem Zeitpunkt signifikant.

1.2 Futtermittelnutzung

Aus dem Quotienten von Futtermittelnahme und Gewichtszunahme (g / g) errechnete sich die Futtermittelnutzung. Sie wurde weder durch die Lactoferrin- noch durch die *Ec. faecium*-Supplementierung merklich beeinflusst.

Im Lactoferrin-Versuch lag die Futtermittelnutzung während der Milchaustauscherfütterung bei durchschnittlich 3,4 und während der Trockenfütterperiode bei 2,8. Die Lactoferrin-Gruppen wiesen über die gesamte Versuchsdauer hinweg eine etwas schlechtere Futtermittelnutzung (\emptyset 2,99) als die Kontrollgruppe (2,90) auf. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. In Abhängigkeit von den verschiedenen Lactoferrin-Dosierungen konnte kein einheitlicher Effekt erzielt werden.

Im *Ec. faecium*-Versuch traten zu allen untersuchten Zeitabschnitten geringe, nicht signifikante Unterschiede auf. In der Milchaustauscherperiode wies die Kontrollgruppe eine bessere Futtermittelnutzung auf, während sie in der Beifütterperiode bei der Probiotikumgruppe höher war. Die Futtermittelnutzung des Feuchtfutters, das ab Tag 56 nach dem Absetzen des Milchaustauschers verabreicht wurde, erwies sich in beiden Gruppen als sehr gering. Sie sank von 3,7 bzw. 3,8 (Kontrolle / Probiotikum) während der Milchaustauscherfütterung auf 12,4 bzw. 12,5 in der 9.-14. Woche ab. Der Wert war damit über 4 mal höher als bei den Welpen des Lactoferrin-Versuchs, die in diesem Zeitraum mit Trockenfütter gefüttert wurden.

2 Antioxidativer Status

2.1 Antioxidativer Status der Hundewelpen

Der antioxidative Status (TEAC) im Blut der Mutteraufzucht-Welpen sank vom Zeitpunkt der Geburt bis zum Tag 14 deutlich ab. Die TEAC der mutterlos aufgezogenen Welpen des Lactoferrin- und *Ec. faecium*-Versuchs konnte erst zu Versuchsbeginn an Tag 3 gemessen werden. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die Welpen sehr geringe Werte auf, die auch deutlich niedriger als die der Mutteraufzucht-Welpen waren. Bis zum Tag 14 glichen sich die TEAC-

Werte der mutterlos aufgezogenen Welpen allmählich an die der gesäugten Welpen an, waren jedoch noch deutlich niedriger als die direkt nach der Geburt der Mutteraufzucht-Welpen gemessenen Werte. So verschlechterte sich der antioxidative Status der Hundewelpen nach der Geburt und erreichte insbesondere bei den mutterlosen Tieren in den ersten Lebenstagen niedrige Werte (Abb.1). Über den gesamten Versuchszeitraum von 14 Wochen blieb die TEAC niedriger als die bei erwachsenen Beagle-Hunden gemessenen Werte ($0,31 \pm 0,03$ mmol/l, n =11).

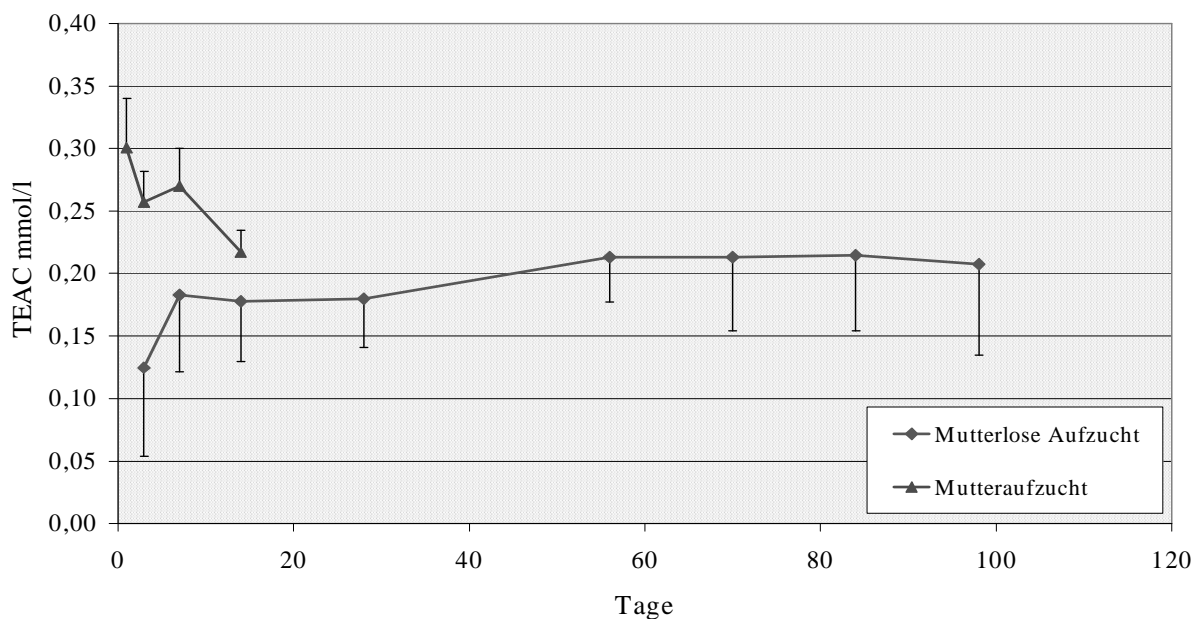


Abbildung 1: Antioxidativer Status der Hundewelpen

Bei Zusammenfassung aller Welpen des Lactoferrin-Versuchs ergibt sich für Tag 3 ein TEAC-Wert von $0,14 \pm 0,07$ mmol/l, der sich bis Tag 7 deutlich erhöhte ($0,20 \pm 0,05$ mmol/l), anschließend geringgradig absank und ab Tag 28 bis Versuchsende kontinuierlich auf einen Wert von $0,26 \pm 0,06$ mmol/l anstieg. Bei den Welpen des *Ec. faecium*-Versuchs stieg die TEAC von anfangs $0,10 \pm 0,06$ mmol/l auf $0,22 \pm 0,03$ mmol/l an Tag 56 an und fiel bis Woche 14 auf einen Wert von $0,15 \pm 0,05$ mmol/l ab (Tab. 7). Zur Beurteilung des TEAC-Verlaufs in der Neugeborenenphase wurden die Daten von Tag 3, 7 und 14 auf statistisch signifikante Unterschiede zum Mittelwert der Tage 56 und 70 geprüft, der in dieser Studie als „Normalwert“ für Hundewelpen definiert wurde. Dabei ergaben sich für die Welpen des *Ec. faecium*-Versuchs signifikant niedrigere TEAC-Werte an Tag 3 und Tag 7. Die TEAC der

Lactoferrin-Welpen war an Tag 3, 14 und 28 signifikant niedriger als der spätere Vergleichswert.

Der durchschnittliche TEAC-Wert der Welpen aus der Mutteraufzucht lag direkt nach der Geburt bei $0,30 \pm 0,04$ mmol/l, verringerte sich bis Tag 3 deutlich und erreichte an Tag 14 einen Wert von $0,22 \pm 0,02$ mmol/l. Der Abfall der TEAC war sowohl zwischen Tag 1 und Tag 3 als auch zwischen Tag 3 und Tag 14 signifikant (Tab.7).

Tabelle 7:

Antioxidativer Status von Lactoferrin-, Probiotikum- und Mutteraufzuchtswelpen

Tag	TEAC mmol/l Lactoferrin	TEAC mmol/l Probiotikum	TEAC mmol/l Mutteraufzucht
1			$0,30 \pm 0,04$
3	$0,14 \pm 0,07$	$0,10 \pm 0,06$	$0,26 \pm 0,02$
7	$0,20 \pm 0,05$	$0,10 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,03$
14	$0,18 \pm 0,05$	$0,18 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,02$
28	$0,18 \pm 0,04$	$0,18 \pm 0,03$	
56	$0,21 \pm 0,04$	$0,22 \pm 0,03$	
70	$0,22 \pm 0,07$	$0,20 \pm 0,04$	
84	$0,24 \pm 0,06$	$0,18 \pm 0,05$	
98	$0,26 \pm 0,06$	$0,15 \pm 0,05$	

2.2 Einfluss von Lactoferrin

Um den Effekt von Lactoferrin auf den antioxidativen Status der Hundewelpen zu beurteilen, wurde die TEAC der Kontrollgruppe mit der der einzelnen Lactoferringruppen verglichen (Tab.8). Dabei konnten in den ersten 8 Lebenswochen keine deutlichen Unterschiede festgestellt werden. Ab Tag 70 ließ sich in jeder Lactoferringruppe ein Trend zu höheren TEAC-Werten als in der Kontrollgruppe erkennen, der bei Gruppe 2 (30 mg Lf/kg TS) und 4 (60 mg Lf/kg TS) signifikant war.

An Tag 3 wies die Kontrollgruppe im Durchschnitt deutlich niedrigere TEAC-Werte ($0,07 \pm 0,04$ mmol/l) als die Versuchsgruppen auf. Dieser Unterschied blieb bis Tag 14 zur Gruppe 3 (60/95 mg Lf/kg TS) signifikant, während er zu den anderen Gruppen bereits an Tag 7 undeutlich wurde. An Tag 28 war der TEAC-Wert der Kontrollgruppe im Vergleich zum Versuchsbeginn deutlich gestiegen und pendelte sich anschließend auf Werte um die 0,20 mmol/l ein. Von den Versuchsgruppen wiesen die Gruppe 3 (60/95 mg Lf/kg TS) und die Gruppe 5 (120 mg Lf/kg TS) an Tag 3 ebenfalls niedrige TEAC-Werte ($0,11 \pm 0,02$ mmol/l und $0,13 \pm 0,03$ mmol/l) auf, die sich bei der Gruppe 5 bis Tag 7 und bei der Gruppe 3 bis Tag 14 signifikant erhöhten. An Tag 28 sank die TEAC etwas ab, um anschließend bis Versuchsende auf Werte von $0,25 \pm 0,01$ mmol/l (Gruppe 5) und $0,27 \pm 0,07$ mmol/l (Gruppe 3) anzusteigen. Dabei lagen die durchschnittlichen Werte beider Gruppen ab Tag 70 durchgehend höher als bei der Kontrollgruppe. Signifikanzniveau wurde jedoch nur bei Gruppe 3 an Tag 70 erreicht.

In der Gruppe 2 (30 mg Lf/kg TS) und der Gruppe 4 (60 mg Lf/kg TS) dagegen war die TEAC an Tag 3 höher und sank bis Tag 14 (Gruppe 4) bzw. Tag 28 (Gruppe 2) auf Werte von $0,16 \pm 0,06$ mmol/l ab. Zu Versuchsende stieg die TEAC in beiden Gruppen auf durchschnittlich 0,30 mmol/l an. Sie war damit in der Gruppe 2 an Tag 70 und 98 und in der Gruppe 4 an Tag 84 und 98 signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

Tabelle 8:
Einfluss von Lactoferrin auf den antioxidativen Status von Hundewelpen

Tag	TEAC mmol /l Kontrolle	TEAC mmol/l 30 ppm Lf	TEAC mmol/l 60/95 ppm Lf	TEAC mmol/l 60 ppm Lf	TEAC mmol/l 120 ppm Lf
3	$0,07 \pm 0,04$	$0,20 \pm 0,05$	$0,11 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,07$	$0,13 \pm 0,03$
7	$0,18 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,07$	$0,23 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,07$
14	$0,15 \pm 0,04$	$0,18 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,06$	$0,16 \pm 0,06$	$0,19 \pm 0,04$
28	$0,19 \pm 0,03$	$0,16 \pm 0,05$	$0,18 \pm 0,05$	$0,21 \pm 0,04$	$0,17 \pm 0,04$
56	$0,20 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,05$	$0,19 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,02$
70	$0,15 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,06$	$0,28 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,02$
84	$0,19 \pm 0,07$	$0,30 \pm 0,04$	$0,27 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,04$
98	$0,21 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,07$	$0,29 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,01$

2.3 Einfluss von *Enterococcus faecium*

Im *Ec. faecium*-Versuch unterschied sich der antioxidative Status der Probiotikumgruppe zu keinem Zeitpunkt signifikant von dem der Kontrollgruppe (Tab.9).

Zu Versuchsbeginn an Tag 3 wies die Kontrollgruppe einen durchschnittlich niedrigeren TEAC-Wert ($0,07 \pm 0,04$ mmol/l) als die Probiotikumgruppe ($0,12 \pm 0,07$ mmol/l) auf. In den folgenden Wochen stieg die TEAC der Kontrollgruppe kontinuierlich an und erreichte an Tag 56 einen durchschnittlichen Wert von $0,20 \pm 0,03$ mmol/l. Danach sank sie bis zum Versuchsende auf $0,16 \pm 0,06$ mmol/l ab. In der Probiotikumgruppe konnte an Tag 7 ein leichter Abfall des TEAC-Wertes beobachtet werden. Anschließend kam es auch hier bis Tag 56 zu einem deutlichen Anstieg der Werte ($0,23 \pm 0,03$ mmol/l) und nachfolgend bis Tag 98 zu einem signifikanten Abfall ($0,15 \pm 0,04$ mmol/l).

Der antioxidative Status an Tag 3 war sowohl bei der Probiotikum- als auch bei der Kontrollgruppe signifikant niedriger als zum späteren Vergleichszeitpunkt (Mittelwert der TEAC aus Tag 56 und 70). Während der Unterschied bei der Probiotikumgruppe auch an Tag 7 noch signifikant war, stieg die TEAC der Kontrollgruppe bereits an. Bis Tag 14 hatte die Probiotikumgruppe diesen schnelleren Anstieg jedoch aufgeholt.

Tabelle 9:
Einfluss von *Ec. faecium* auf den antioxidativen Status von Hundewelpen

Tag	TEAC mmol/l Kontrolle	TEAC mmol/l Probiotikum
3	$0,07 \pm 0,04$	$0,12 \pm 0,07$
7	$0,11 \pm 0,04$	$0,10 \pm 0,03$
14	$0,18 \pm 0,04$	$0,18 \pm 0,03$
28	$0,18 \pm 0,03$	$0,17 \pm 0,04$
56	$0,20 \pm 0,03$	$0,23 \pm 0,03$
70	$0,20 \pm 0,06$	$0,20 \pm 0,03$
84	$0,16 \pm 0,05$	$0,21 \pm 0,01$
98	$0,16 \pm 0,06$	$0,15 \pm 0,04$

2.4 Vergleich mutterlose Aufzucht – Mutteraufzucht

Um den Verlauf des antioxidativen Status von handaufgezogenen Hundewelpen mit dem von gesäugten Welpen zu vergleichen, wurden die TEAC-Werte aller Tiere des Lactoferrin- und Ec. faecium-Versuchs zusammengefasst und auf statistisch signifikante Unterschiede zur TEAC der Mutteraufzucht-Welpen überprüft.

Die Welpen der Mutteraufzucht wiesen direkt nach der Geburt im Blut einen TEAC-Wert von $0,30 \pm 0,04$ mmol/l auf. Dieser sank bis Tag 3 auf $0,26 \pm 0,02$ mmol/l ab. Damit war er zu diesem Zeitpunkt mehr als doppelt so hoch wie der TEAC-Wert der mutterlos aufgezogenen Welpen ($0,12 \pm 0,07$ mmol/l an Tag 3). Bis Tag 14 sank der antioxidative Status der gesäugten Welpen auf einen Wert von $0,22 \pm 0,02$ mmol/l ab, wobei er immer noch signifikant höher als der antioxidative Status der mutterlos aufgezogenen Welpen war ($0,18 \pm 0,05$ mmol/l an Tag 14). (Abb.1)

3 Vitamin E - Konzentrationen im Plasma

3.1 Vitamin E - Konzentrationen der Welpen des Lactoferrin-Versuchs

Trotz hoher Streuung der Einzelwerte konnte über den gesamten Versuchszeitraum hinweg bei allen Welpen des Lactoferrin-Versuchs ein deutliches Absinken der Vitamin E-Konzentrationen im Plasma beobachtet werden. Ein einheitlicher Effekt der Lactoferrin-Supplementierung ließ sich dabei nicht erkennen (Tab.10).

Zu Versuchsbeginn an Tag 3 wiesen die Welpen des Lactoferrin-Versuchs einen durchschnittlichen Vitamin E- Gehalt im Plasma von 57 ± 12 $\mu\text{mol/l}$ auf. Dieser Wert sank innerhalb der nächsten vier Tage signifikant ab und blieb bis Tag 14 erniedrigt (38 ± 19 $\mu\text{mol/l}$). An Tag 28 betrug die durchschnittliche Vitamin E- Konzentration 48 ± 14 $\mu\text{mol/l}$, von wo an sie sich in den folgenden Wochen erneut deutlich verringerte. Bis Versuchsende lagen die Werte bei ca. 30 $\mu\text{mol/l}$.

Bei der Betrachtung der einzelnen Lactoferrin-Gruppen ergab sich ein uneinheitliches Bild. In der Gruppe 2 (30 mg Lf/kg TS) und der Gruppe 3 (60/95 mg Lf/kg TS) sanken die Vitamin E-Konzentrationen ab Versuchsbeginn signifikant ab und betrugen an Tag 14 noch 31 ± 18 $\mu\text{mol/l}$ (Gruppe 2) bzw. 28 ± 11 $\mu\text{mol/l}$ (Gruppe 3). Anschließend verdoppelten sich die

Werte in beiden Gruppen bis Tag 28. In der Kontrollgruppe, der Gruppe 4 (60 mg Lf/kg TS) und der Gruppe 5 (120 mg Lf/kg TS) kam es nach Versuchsbeginn ebenfalls zu einem Abfall der Vitamin E- Gehalte im Plasma, die jedoch ab Tag 7 bereits wieder anstiegen. Sie erreichten bei der Kontrollgruppe und der Gruppe 5 an Tag 14 einen Höhepunkt ($51 \pm 21 \mu\text{mol/l}$ bzw. $46 \pm 17 \mu\text{mol/l}$), bei der Gruppe 4 erst an Tag 28 ($55 \pm 5 \mu\text{mol/l}$). Danach sanken die Vitamin E- Konzentrationen in allen Gruppen bis Tag 70 deutlich ab, wobei die Gruppe 4 durchgehend die höchsten Werte aufwies. Ab Tag 84 lagen die Vitamin E- Gehalte aller Versuchsgruppen höher als die der Kontrollgruppe, Signifikanzniveau wurde jedoch nur bei der Gruppe 4 an Tag 84 erreicht.

Tabelle 10:

Vitamin E - Konzentrationen im Pasma der Welpen des Lactoferrin-Versuchs

Tag	Vitamin E $\mu\text{mol/l}$ Mittelwert	Vitamin E $\mu\text{mol/l}$ Kontrolle	Vitamin E $\mu\text{mol/l}$ 30 ppm Lf	Vitamin E $\mu\text{mol/l}$ 60/95 ppm Lf	Vitamin E $\mu\text{mol/l}$ 60 ppm Lf	Vitamin E $\mu\text{mol/l}$ 120 ppm Lf
3	57 ± 12	56 ± 09	56 ± 03	73 ± 24	59 ± 19	49 ± 02
7	38 ± 11	36 ± 03	31 ± 19	40 ± 09	44 ± 14	39 ± 08
14	38 ± 19	51 ± 21	31 ± 18	28 ± 11	46 ± 11	46 ± 17
28	48 ± 14	41 ± 09	61 ± 13	53 ± 12	55 ± 05	41 ± 17
56	34 ± 09	38 ± 06	21 ± 01	30 ± 08	40 ± 08	39 ± 06
70	27 ± 09	28 ± 06	19 ± 03	19 ± 04	41 ± 04	28 ± 06
84	27 ± 06	22 ± 03	25 ± 04	27 ± 06	38 ± 04	28 ± 01
98	30 ± 10	25 ± 08	30 ± 09	32 ± 07	38 ± 07	29 ± 17

3.2 Vitamin E - Konzentrationen der Welpen des *Ec. faecium*-Versuchs

Im Gegensatz zu den Lactoferrin-Welpen stiegen die Vitamin E- Konzentrationen im Plasma der *Ec. faecium*-Welpen bis Tag 56 deutlich an. Danach konnte ein leichter Rückgang verzeichnet werden. Die Probiotikumgruppe unterschied sich im Hinblick auf die Vitamin E- Spiegel nur undeutlich von der Kontrollgruppe (Tab.11).

Zu Versuchsbeginn an Tag 3 betrug der durchschnittliche Vitamin E- Gehalt im Plasma der Welpen des *Ec. faecium*-Versuchs $43 \pm 17 \mu\text{mol/l}$. Bis Tag 7 sank er geringgradig ab, um zwischen der 4. und 8. Lebenswoche Werte über $80 \mu\text{mol/l}$ zu erreichen. Dieser Anstieg war signifikant. Nach Tag 56 sanken die Vitamin E- Konzentrationen auf einen durchschnittlichen Wert von $57 \pm 11 \mu\text{mol/l}$ ab und erhöhten sich ab Tag 70 bis Versuchsende wieder leicht. Beim Vergleich der Probiotikumgruppe mit der Kontrollgruppe waren lediglich an Tag 7 signifikante Unterschiede festzustellen. Während die Vitamin E- Konzentrationen im Plasma der Kontrollwelpen von $39 \pm 10 \mu\text{mol/l}$ an Tag 3 auf $93 \pm 23 \mu\text{mol/l}$ an Tag 28 mehr oder weniger kontinuierlich anstiegen, sanken die Werte bei den Probiotikumwelpen von anfangs $47 \pm 23 \mu\text{mol/l}$ auf $30 \pm 11 \mu\text{mol/l}$ an Tag 7 ab. Danach war auch hier ein signifikanter Anstieg bis Tag 28 zu erkennen ($81 \pm 7 \mu\text{mol/l}$). Bis zum Versuchsende unterschieden sich die beiden Gruppen nur noch undeutlich.

Tabelle 11:

Vitamin E - Konzentrationen im Plasma der Welpen des *Ec. faecium*-Versuchs

Tag	Vitamin E $\mu\text{mol/l}$ Mittelwert	Vitamin E $\mu\text{mol/l}$ Kontrolle	Vitamin E $\mu\text{mol/l}$ Probiotikum
3	43 ± 17	39 ± 10	47 ± 23
7	40 ± 13	46 ± 11	30 ± 11
14	52 ± 18	45 ± 14	57 ± 21
28	87 ± 18	93 ± 23	81 ± 07
56	80 ± 26	77 ± 22	84 ± 31
70	57 ± 11	60 ± 13	54 ± 08
84	63 ± 22	58 ± 26	72 ± 14
98	72 ± 20	69 ± 26	76 ± 14

3.3 Vergleich der Vitamin E - Konzentrationen von Lactoferrin-, Probiotikum- und Mutteraufzuchtswelpen

Die von der Mutterhündin gesäugten Welpen wiesen direkt nach der Geburt eine Vitamin E-Konzentration im Serum von $29 \pm 13 \mu\text{mol/l}$ auf. Dieser Wert erhöhte sich bis Tag 3 auf mehr als das Doppelte ($75 \pm 15 \mu\text{mol/l}$). Bis Tag 14 stieg er weiter leicht an ($93 \pm 29 \mu\text{mol/l}$).

Die mutterlos aufgezogenen Welpen wiesen bereits an Tag 3 niedrigere Vitamin E-Konzentrationen auf, die sich bis Tag 7 weiter verringerten. Anschließend kam es bei den Welpen des Ec. faecium-Versuchs zu einem ähnlich signifikanten Anstieg wie bei der Mutteraufzucht. Sie erreichten an Tag 28 Plasma-Vitamin E- Spiegel von $87 \pm 18 \mu\text{mol/l}$. Dagegen stiegen die Werte der Lactoferrin-Welpen bis Tag 28 nur undeutlich an und fielen daraufhin wieder ab. Die Welpen des Ec. faecium-Versuchs wiesen ab Tag 7 bis Versuchsende durchgehend höhere Vitamin E- Konzentrationen als die Welpen des Lactoferrin-Versuchs auf, wobei an Tag 28, 56, 70, 84 und 98 Signifikanzniveau erreicht wurde.

3.4 Korrelation : Antioxidativer Status – Vitamin E - Konzentrationen

Um Veränderungen des antioxidativen Status (TEAC) im Blut der Welpen genauer erklären zu können, wurde der Verlauf der TEAC-Werte mit dem Verlauf der Plasmakonzentrationen an Vitamin E verglichen. Es konnten keine deutlichen Zusammenhänge festgestellt werden, da das antioxidativ wirksame Vitamin E nur einen geringen Anteil am antioxidativen Status der Welpen ausmachte. Für die Veränderungen der TEAC müssen somit weitere Antioxidantien verantwortlich gemacht werden.

Während die TEAC bei den Welpen des Lactoferrin-Versuchs von Tag 3 bis Tag 7 deutlich anstieg, fielen die Vitamin E- Konzentrationen im Plasma signifikant ab. Auch von Tag 28 bis Versuchsende erhöhte sich die antioxidative Kapazität im Blut bei tendenziell sinkenden Vitamin E- Gehalten. Ein ähnliches Bild wurde bei den Welpen der Mutteraufzucht gefunden. Während die TEAC von Tag 1 bis Tag 14 abfiel, erhöhten sich die Vitamin E- Konzentrationen im Serum deutlich.

Bei den Welpen des Ec. faecium-Versuchs konnte von Tag 3 bis Tag 56 ein signifikanter Anstieg der TEAC verzeichnet werden. Auch die Plasma-Vitamin E- Konzentrationen erhöhten sich in den ersten Lebenswochen, sanken jedoch ab Tag 28 wieder ab.

4 Vitamin C – Konzentrationen im Serum

Im Serum der Hundewelpen aus der Mutteraufzucht wurden direkt nach der Geburt durchschnittliche Vitamin C- Konzentrationen von $63 \pm 6 \mu\text{mol/l}$ gemessen. Bis Tag 3 sanken sie signifikant ab ($43 \pm 3 \mu\text{mol/l}$). Anschließend erhöhten sie sich wieder und erreichten an Tag 7 einen Wert von $57 \pm 11 \mu\text{mol/l}$. Bei der Bestimmung an Tag 14 konnten ähnliche Vitamin C- Konzentration gemessen werden ($60 \pm 7 \mu\text{mol/l}$).

5 Freies Eisen

5.1 Freies Eisen und latente Eisenbindungskapazität

Zu keinem Zeitpunkt konnte freies Eisen im Serum der Hundewelpen aus der Mutteraufzucht nachgewiesen werden.

Die Bestimmung der latenten Eisenbindungskapazität (LEBK) im Serum ergab direkt nach der Geburt der Welpen einen durchschnittlichen Wert von $84 \pm 39 \mu\text{g/dl}$. In den ersten Lebenstagen verringerte sich die LEBK und erreichte an Tag 14 einen signifikant niedrigeren Wert ($47 \pm 14 \mu\text{g/dl}$) als an Tag 1 (Tab.12).

Bei einem Welpen wurde an Tag 1 eine negative latente Eisenbindungskapazität gemessen. Dieser Wert wurde nicht weiter berücksichtigt, da im Serum dieses Neugeborenen kein freies Eisen festzustellen war und es sich somit aller Wahrscheinlichkeit nach um einen Messfehler handelte. Zwei Welpen wiesen dagegen an Tag 3 und Tag 7 eine sehr geringe latente Eisenbindungskapazität von $< 10 \mu\text{g/dl}$ auf.

5.2 Gesamteisen, totale Eisenbindungskapazität und Transferrinsättigung

Die Gesamteisenkonzentration im Serum der Mutteraufzucht-Welpen betrug direkt nach der Geburt durchschnittlich $138 \pm 73 \mu\text{g/dl}$. Ab Tag 3 verringerte sie sich und wies an Tag 14 einen signifikant niedrigeren Wert von $80 \pm 33 \mu\text{g/dl}$ auf. (Tab.12).

Aus der Summe von latenter Eisenbindungskapazität und Gesamteisenkonzentration im Serum errechnete sich die totale Eisenbindungskapazität. Sie betrug an Tag 1 $207 \pm 47 \mu\text{g/dl}$ und sank bis Tag 14 kontinuierlich ab ($127 \pm 36 \mu\text{g/dl}$). (Tab.12).

Die Transferrinsättigung gibt das prozentuale Verhältnis von Gesamteisenkonzentration zu totaler Eisenbindungskapazität im Serum an. Die durchschnittlichen Werte ließen keinen einheitlichen Verlauf erkennen und schwankten in den ersten zwei Lebenswochen der Welpen zwischen 47 und 73 % (Tab.12). Bei zwei Welpen wurden jedoch auch Werte über 90% gefunden.

Tabelle 12:

Latente Eisenbindungskapazität, Gesamteisenkonzentration, totale Eisenbindungskapazität und Transferrin-Sättigung im Serum der Mutteraufzucht-Welpen

Tag	LEBK $\mu\text{g/dl}$	Gesamteisen $\mu\text{g/dl}$	TEBK $\mu\text{g/dl}$	Transferrin-Sättigung %
1	84 \pm 39	138 \pm 73	207 \pm 47	47 \pm 08
3	63 \pm 39	144 \pm 30	202 \pm 53	73 \pm 13
7	44 \pm 18	099 \pm 35	143 \pm 33	68 \pm 14
14	47 \pm 14	080 \pm 33	127 \pm 36	61 \pm 13

E Diskussion

1 Diskussion des Versuchsaufbaus

Der zugrundeliegende Versuchsaufbau orientierte sich an den „Leitlinien zur Prüfung der Wirksamkeit von Mikroorganismen bei den Tierkategorien Hund, Katze und Pferd“, die von der Europäischen Kommission im Jahr 2000 mit dem Ziel erarbeitet worden waren, die Anwendungsbereiche von probiotischen Mikroorganismen bei Hunden, Katzen und Pferden zu definieren und Anforderungen an das Zulassungsverfahren dieser Substanzen festzulegen (Lahrssen und Zentek 2002). Dabei wird neben der Produktsicherheit ein Nachweis der Effizienz und des Wirkungsspektrums gefordert.

Über ein geeignetes Versuchsdesign wurde versucht, die eingeschränkte Welpenzahl in den jeweiligen Versuchsgruppen zu kompensieren. So wurden Saugwelpen direkt nach der Kolostrumaufnahme an Tag 3 von den Muttertieren getrennt und von Hand aufgezogen, um Variabilitäten wie Wurfgröße, Milchleistung des Muttertieres oder ungleichmäßige Milchaufnahme der Welpen auszuschließen. Eine ausreichend lang gewählte Versuchsdauer von 14 Wochen ermöglichte es, den Verlauf des antioxidativen Status über die Neugeborenenphase hinweg zu beurteilen und die Wirkungen der probiotischen Substanzen sowohl bei Saug- als auch bei Absatzwelpen zu bestimmen.

Neben der Untersuchung allgemeiner und unterstützender Parameter, die Grundinformationen über den allgemeinen Gesundheitszustand der Tiere und ergänzende Informationen zur Wirksamkeit des Mikroorganismus liefern, wird in den Leitlinien die Bestimmung spezifischer Parameter vorgeschlagen, „die eine direkte Beziehung zur probiotischen Wirkung aufweisen“. Zu diesem Zweck wurde der antioxidative Status (TEAC) und die Vitamin E-Konzentration im Plasma von Hundewelpen gemessen, denen ein Probiotikum (*Ec. faecium*) bzw. bovines Lactoferrin über das Futter verabreicht worden war.

1.1 Eigenschaften der verwendeten probiotischen Substanzen

Ec. faecium gehört zu den milchsäurebildenden Bakterien und besitzt inhibitorische Effekte gegenüber bedeutsamen Enteropathogenen, wie enterotoxische *E.coli*, Salmonellen, Shigellen und Clostridien (Lewenstein et al., 1979). Als Probiotikum kommt es u.a. zur Prävention und Behandlung akuter und antibiotika-assoziiertes Diarrhöen zum Einsatz. Antioxidative Eigenschaften wurden von *Ec. faecium* bisher noch nie untersucht. Bei einigen anderen

milchsäurebildenden Bakterien (Laktobazillen, Streptokokken und Bifidobakterien) konnten jedoch antioxidative Enzymaktivitäten, eisenbindende Eigenschaften, Radikalfängereigenschaften und reduzierende Aktivitäten nachgewiesen werden (Lin und Yen, 1999; Kullisaar et al., 2002). *Ec. faecium* kommt als natürlicher Bewohner im Darm der meisten Säugetiere vor und wurde schon mehrfach als Probiotikum bei Jungtieren erfolgreich und ohne Nebenwirkungen eingesetzt (Schumm et al., 1990; Molitor, 1996; Benyacoub et al., 2003). Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte jedoch, dass probiotisch wirksame Enterokokken in der Lage sind, die Adhäsion und Kolonisation von *Campylobacter jejuni* im Darm von Hunden zu fördern (Rinkinen et al., 2003). Damit können die Tiere zu potentiellen Trägern von *C. jejuni* werden und als Quelle für die Campylobakteriose des Menschen dienen. Dieser neuentdeckte Risikofaktor des Probiotikums bedarf weiterer Untersuchungen.

Lactoferrin kommt in Ersatzmilchpräparaten für neugeborene Tiere zum Einsatz, um die Leistung und das Wachstum zu verbessern und um vor neonatalen Septikämien und *E. coli*-Durchfällen zu schützen. Antioxidative Eigenschaften beruhen vorwiegend auf der Eisenbindungskapazität von teilweise gesättigtem Lactoferrin, das dadurch eiseninduzierte Lipidperoxidationen verhindert. Bei adulten Ratten wurde dieser Effekt *in vivo* bereits nachgewiesen (Nimmagudda et al., 1999). Auch in Ersatzmilchpräparaten konnten durch Zusätze von Lactoferrin Lipidperoxidationen vermindert werden (Raghuveer et al., 2002). So war in der vorliegenden Arbeit von großem Interesse, ob ein Lactoferrin-Zusatz zum Milchaustauscher der Welpen den antioxidativen Status der Tiere verbessern kann.

Mit zunehmender Eisensättigung des Lactoferrins stellten Matsue et al. (1994) in ihrem Testsystem steigende Lipidperoxidationsprodukte fest. Bei Anwesenheit von Ascorbinsäure förderte zu 100% gesättigtes Lactoferrin die Malondialdehyd-Bildung sogar. Dagegen konnten Aruoma und Halliwell (1987) durch eisengesättigtes Lactoferrin keine Förderung der Radikalbildung induzieren, allerdings sahen sie auch keine schützenden Effekte mehr. In unserem Versuch verwendeten wir bovines Lactoferrin mit einer Eisensättigung von 22 %. Dieses nur teilweise gesättigte Lactoferrin kann katalytisch wirksame freie Eisenionen binden und somit antioxidativ wirksam werden.

1.2 Dosierung der probiotischen Substanzen

Die gewählten Dosierungen von 30, 60 und 120 mg Lactoferrin je kg Futter-TS waren im Vergleich zu anderen Studien relativ niedrig. So verabreichten Joslin et al. (2002) an Kälber eine tägliche Lactoferrin-Dosis von 0, 1 oder 10 g, was in einer anfänglichen Milchaustauschermenge von 4 Litern einer Konzentration von 0, 250 bzw. 2.500 mg/l Milch entsprach. Sie konnten damit bei den Lactoferrin-Tieren eine höhere Futteraufnahme und gesteigerte tägliche Gewichtszunahmen erreichen. Satué-Gracia et al. (2000) setzten Ersatzmilchpräparaten für Babys, die unterschiedliche Eisenkonzentrationen enthielten, Lactoferrinmengen von 1.000, 2.000, 3.000, 4.700, 6.800 und 8.600 mg/l zu. Sie beobachteten eine mit steigender Lactoferrinkonzentration zunehmende Hemmung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, die in allen Proben bei einem Lactoferrin / Eisen- Verhältnis von 1: 2 am stärksten war (> 90%). So bleibt zu prüfen, ob mit einer höheren Dosierung im Lactoferrin-Versuch eine größere Wirkung erzielt worden wäre.

Die Dosierung von *Ec. faecium* war mit 2×10^8 KbE / 100 g Futter-TS vergleichbar mit einer bei Ferkeln eingesetzten Menge (10^8 KbE / 100 g Futter, Roth und Kirchgessner, 1986). Pasupathy et al. (2001) verabreichten 10-Wochen alten Hundewelpen eine tägliche Dosis von 2×10^7 KbE *Lactobacillus acidophilus*. Dies entspricht bei einer täglichen Futteraufnahme von ca. 450 g einer Konzentration von 4×10^6 KbE / 100 g Trockenfutter. Damit konnte eine kompetitive Ansiedelung des Probiotikums im Magendarmtrakt erreicht werden und die täglichen Gewichtszunahmen der Welpen gesteigert werden. Bei Untersuchungen an adulten Hunden wurden mit 10^9 KbE / 100 g Trockenfutter höhere Zulagen eingesetzt (Zentek et al., 1998).

1.3 Bestimmung des antioxidativen Status und verwendetes Probenmaterial

Über den Verlauf des antioxidativen Status von neugeborenen Tieren direkt nach der Geburt liegen unterschiedliche Ergebnisse vor. Inanami et al. (1999) fanden bei Kälbern direkt nach der Geburt im Vergleich zu den Muttertieren hohe Konzentrationen an Lipidperoxidationsprodukten, die in den darauffolgenden Tagen absanken. Zudem waren die antioxidativen Aktivitäten im neonatalen Serum, gemessen als Ferroxidase-Aktivität, Superoxid-Radikalfänger-Aktivität und bilirubin-assoziiertes Albumin, 3 Stunden nach der Geburt deutlich niedriger als im maternalen Serum. Dagegen stellten Stohrer et al. (2001) bei

Fohlen und Kälbern direkt nach der Geburt einen gleich hohen antioxidativen Status (TEAC) wie bei den Muttertieren fest, der innerhalb der ersten Lebenswoche signifikant absank. Über den antioxidativen Status von neugeborenen Hundewelpen wurden bisher noch keine Untersuchungen angestellt. Um den Verlauf in der Neugeborenenphase richtig beurteilen zu können, sollten ab dem Zeitpunkt der Geburt Messungen durchgeführt werden. Da die Welpen in unseren Versuchen zur ausreichenden Kolostrumaufnahme bis Tag 3 bei der Mutterhündin belassen wurden und es technisch nicht möglich war, Blutproben direkt nach der Geburt an Tag 1 zu entnehmen, wurden 11 weitere neugeborene Welpen an Tag 1, 3, 7 und 14 untersucht. Diese blieben auch nach Tag 3 bei der Mutterhündin und dienten somit zusätzlich als Vergleich zwischen Mutteraufzucht und mutterloser Aufzucht.

Die Blutproben für die Bestimmung des antioxidativen Status wurden bei den Welpen des Lactoferrin- und Ec. faecium- Versuchs aus der *V. cephalica antebrachii* entnommen. Aufgrund der kleinen Venengröße, des langsamen Blutflusses sowie des geringen Gesamtblutvolumens der Welpen konnten in den ersten Tagen nur wenige Mikroliter Blut gewonnen werden, die jedoch ausreichten, um den antioxidativen Status (TEAC) und die Vitamin E- Konzentration zu messen. Bei den Welpen der Mutteraufzucht wurde versucht, aus der *V. jugularis* etwas mehr Blut abzunehmen, um zusätzlich freies Eisen, Gesamteisen und die latente Eisenbindungskapazität bestimmen zu können. Diese Blutentnahmetechnik war traumatischer und mit wesentlich größerem Stress für die Neugeborenen verbunden als die Blutentnahme an der Vordergliedmaße, so dass sie für die ohnehin gestressten Welpen der mutterlosen Aufzucht nicht in Frage kam.

Aus dem Blut der Lactoferrin- und Ec. faecium- Welpen wurde Plasma gewonnen, um zusätzlich immunologische Untersuchungen durchführen zu können. Dagegen fanden die Messungen im Blut der Mutteraufzucht-Welpen in Serum statt, weil die Bestimmung der latenten Eisenbindungskapazität in Plasma nicht möglich war. Rice-Evans und Miller (1994) zeigten, dass sich die antioxidative Aktivität (TEAC) im Plasma nicht von der im Serum unterscheidet. Auch bei der Vitamin E- Bestimmung konnten in den eigenen Untersuchungen keine Unterschiede zwischen Plasma und Serum festgestellt werden.

1.4 Zusammensetzung des Milchaustauschers

Die Zusammensetzung des verwendeten Milchaustauschers (siehe C 3.1.1) orientierte sich an den Nähr- und Mineralstoffgehalten von Hundemilch.

Der Protein- und Fettgehalt lag nur geringgradig über dem der Hundemilch. Der hohe Bedarf der Welpen an Linolsäure (300 mg/kg KGW, Meyer und Heckötter, 1986) wurde durch die Verwendung von Pflanzenöl gedeckt. Das Aminosäuremuster der Proteine wies im Milchaustauscher höhere Gehalte an Methionin und Cystein auf. Auch Arginin kam durch den Zusatz von Eigelb in ausreichendem Maße vor, so dass ein Mangel an essentiellen Aminosäuren nicht zu befürchten war. Da die Proteine von roher Kuhmilch im Magen von Welpen zu einem soliden Klumpen gerinnen können, wurde im Milchaustauscher Magerquark eingesetzt, in dem das Kasein bereits geronnen ist und somit eine bessere Verdaulichkeit aufweist.

Der Laktosegehalt des Milchaustauschers war mit dem der Hundemilch zu vergleichen, so dass einerseits eine ausreichende Menge an Zucker für den Energiestoffwechsel zur Verfügung stand und andererseits die geringe Verdauungskapazität für Laktose nicht überschritten wurde.

Von den Mineralstoffen lagen Kalzium und Phosphor in gleichen Mengen wie in Hundemilch vor, das Ca / P- Verhältnis betrug 1,2 : 1. Die Eisen- und Kupfergehalte waren dagegen etwas höher (1,0 mg Fe und 0,4 mg Cu /100g Milchaustauscher im Vergleich zu 0,7 mg Fe und 0,3 mg Cu /100g Hundemilch). Diese verstärkte Eisensupplementierung diente der Prophylaxe von Eisenmangelanämien, die bei Jungtieren häufig auftreten. Sie ist jedoch kritisch im Hinblick auf die katalytische Rolle von freien Eisenionen bei der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zu beurteilen. Marshall und Roberts (1990) fanden eine signifikante Korrelation zwischen der Bildung von Lipidperoxiden und den Eisenkonzentrationen in verschiedenen Ersatzmilchpräparaten für Babys. In den eigenen Untersuchungen wurden Lipidperoxidationsprodukte im Milchaustauscher der Welpen nicht bestimmt. Es wäre denkbar, dass das antioxidative Abwehrsystem der von Hand aufgezogenen Welpen durch hohe Sauerstoffradikalkonzentrationen in der Nahrung verstärkt beansprucht wurde. Dies würde den niedrigeren antioxidativen Status in den ersten zwei Lebenswochen im Vergleich zu den mit Muttermilch ernährten Welpen erklären.

Über den Vitamin E- Gehalt von Hundemilch liegen keine Angaben vor. Die in den eigenen Untersuchungen in der Milch von laktierenden Beagle-Hündinnen gemessenen Werte lagen am zweiten Laktationstag bei durchschnittlich 35,9 µg/ml, am 5.Tag bei 24,5 µg/ml und in der 4. Woche bei 20,9 µg/ml. Mit 11,5 µg/g enthielt der Milchaustauscher somit deutlich weniger Vitamin E, was sich auch im Verlauf der Plasma-Vitamin E- Konzentrationen der Welpen widerspiegelte (siehe Abb. 3).

2 Diskussion der Ergebnisse

2.1 Futteraufnahme, Gewichtsentwicklung und Futterverwertung

Durch die Verabreichung von Probiotika und Lactoferrin konnte bei Jungtieren eine Appetitsteigerung und vermehrte Futteraufnahme erreicht werden, die zu höheren täglichen Gewichtszunahmen führte (Pasupathy et al., 2001; Joslin et al., 2002). Derartige Effekte waren in unseren Versuchen bei neugeborenen Beagle-Welpen durch die Zufütterung von *Ec. faecium* bzw. Lactoferrin nicht zu erkennen. Die Probiotikum-Gruppe des *Ec. faecium*-Versuchs zeichnete sich in der Anfangsphase eher durch Saugunlust und verminderten Appetit aus. Eine gesteigerte Gewichtsentwicklung, wie sie bei landwirtschaftlichen Nutztieren wünschenswert ist, war jedoch auch nicht Ziel der Versuche. Bei den Hundewelpen wurde eine restriktive Fütterung durchgeführt, um Skelettschäden durch forciertes Wachstum zu vermeiden.

Auffällig war die anfänglich höhere Futteraufnahme der Welpen des *Ec. faecium*-Versuchs im Vergleich zu denen des Lactoferrin-Versuchs, die zu einer schnelleren Entwicklung der Tiere führte (frühere Augenöffnung, höhere Gewichtszunahmen). Eine mögliche Erklärung könnten die durchschnittlich höheren Geburtsgewichte der *Ec. faecium*-Welpen sein, die damit in einem reiferen Entwicklungszustand waren und sowohl absolut als auch relativ mehr Milchaustauscher aufnahmen. Kienzle et al. (1985) zeigten dagegen, dass Welpen mit niedrigen Geburtsgewichten gleich hohe relative Zunahmen aufweisen können.

Aufgrund der uneinheitlichen Futteraufnahme wurde als zusätzlicher Vergleichsparameter die Futterverwertung bestimmt. Die Zulage von *Ec. faecium* bzw. Lactoferrin brachte in dieser Hinsicht keine Vorteile gegenüber den Kontrollgruppen. Robblee et al. (2003) supplementierten neugeborenen Kälbern Lactoferrin über den Milchaustauscher und stellten eine konzentrationsabhängige Verbesserung der Futterverwertung fest. Mit 250, 500 und 750 mg Lf / l verwendeten sie allerdings auch deutlich höhere Lactoferrin-Dosierungen.

Beim Vergleich der Welpen des *Ec. faecium*-Versuchs mit denen des Lactoferrin-Versuchs wurde eine ähnliche Futterverwertung während der Milchaustauscherperiode festgestellt. Diese unterschied sich auch nicht merklich von der Futterverwertung von Hundemilch (Mundt et al., 1981). Ab dem Zeitpunkt der Beifütterung sank die Futterverwertung bei den Welpen des *Ec. faecium*-Versuchs deutlich ab, was mit dem höheren Wasser- und niedrigeren Energiegehalt des Feuchtfutters im Vergleich zum Trockenfutter der Lactoferrinwelpen erklärt werden kann.

2.2 Der antioxidative Status neugeborener Hundewelpen ist verschlechtert

Der direkt nach der Geburt im Plasma gemessene antioxidative Status stellt einen wichtigen prognostischen Faktor für das Mortalitätsrisiko von frühgeborenen Säuglingen dar (Silvers et al., 1994). In den vorliegenden Untersuchungen sollte erstmals der antioxidative Status von neugeborenen Hundewelpen bestimmt werden. Die Welpen der Mutteraufzucht wiesen am ersten Lebenstag einen hohen TEAC-Wert auf, der bis Tag 3 deutlich abfiel und sich bis Tag 14 weiter verringerte (Abb.2). Dieser Verlauf deutet auf oxidativen Stress in der Neugeborenenphase hin. Der antioxidative Status der Welpen des Ec. faecium- und des Lactoferrin-Versuchs wurde erstmals an Tag 3 nach der Kolostrumaufnahme bestimmt. Die TEAC war zu diesem Zeitpunkt niedrig und stieg in den folgenden Wochen mehr oder weniger kontinuierlich an. Im Vergleich zu Tag 56 und 70 waren die gemessenen Anfangswerte deutlich niedriger. Geht man bei den mutterlosen Welpen an Tag 1 von einem ähnlich hohen TEAC-Wert wie bei den Mutteraufzucht-Welpen aus, so ergibt sich bis Tag 3 ein signifikanter Abfall.

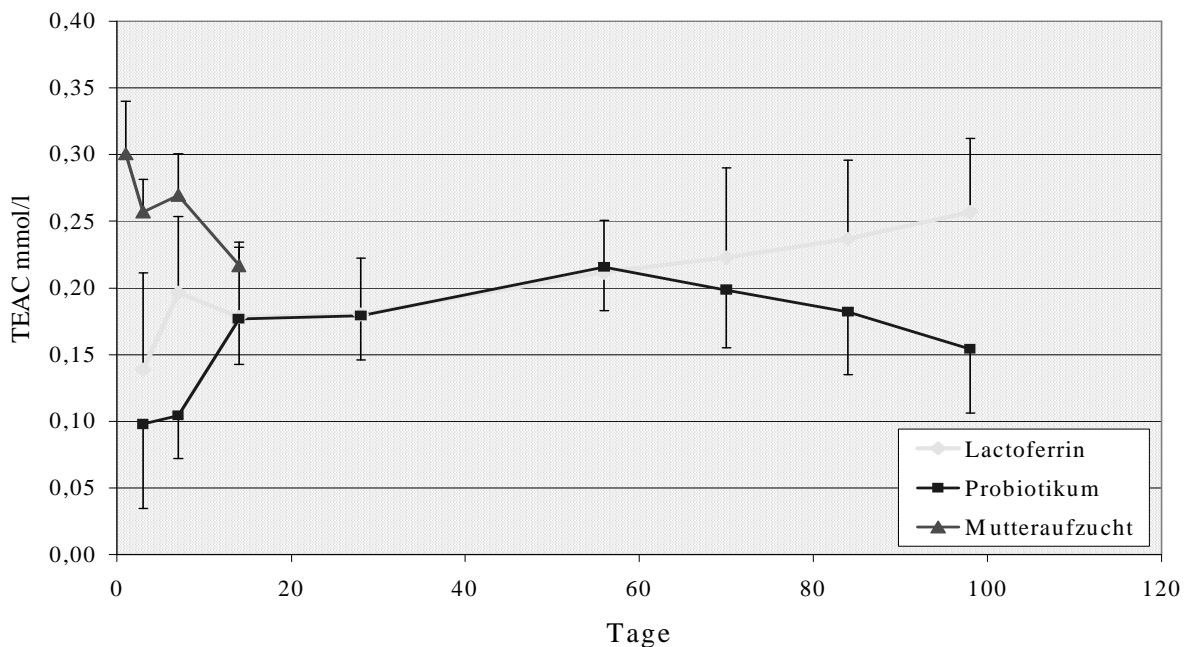


Abbildung 2: Antioxidativer Status von Lactoferrin-, Probiotikum- und Mutteraufzucht-Welpen

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Stohrer et al. (2001), die bei Kälbern und Fohlen direkt nach der Geburt gleichhohe TEAC-Werte wie bei den Muttertieren messen konnten und in der darauffolgenden Woche einen signifikanten Abfall des antioxidativen Status beobachteten. Eigene TEAC-Bestimmungen an erwachsenen Beagle-Hunden zeigten, dass diese einen ähnlich hohen TEAC-Wert wie die Mutteraufzucht-Welpen an Tag 1 aufweisen. Dies bekräftigt die Vermutung, dass die antioxidativen Aktivitäten im Blut von Hundewelpen zum Zeitpunkt der Geburt mit denen der Muttertiere vergleichbar sind, in den ersten Lebenstagen durch erhöhten oxidativen Stress jedoch signifikant absinken.

Auffallend war ein deutlicher Unterschied zwischen der TEAC der Mutteraufzucht-Welpen und der Versuchswelpen an Tag 3. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden alle Welpen bei den Muttertieren gehalten und von ihnen gesäugt. Die Blutentnahme wurde sowohl im Ec. faecium- als auch im Lactoferrin-Versuch vor der ersten Flaschenfütterung vorgenommen, so dass das Probiotikum bzw. Lactoferrin noch keine Wirkung zeigen konnte. Eine mögliche Erklärung für den verschlechterten antioxidativen Status der Versuchswelpen stellt der relativ hohe Stress dar, dem die Welpen durch das Absetzen und Trennen vom Muttertier ausgesetzt waren. Durch die Freisetzung von Stresshormonen wie Kortisol, Adrenokortikotropin (ACTH) und Adrenalin werden vermehrt Leukozyten aus dem Marginalpool des Blutes sowie aus der Milz und dem Knochenmark mobilisiert (Rossdale et al., 1982; Iversen et al., 1994). So fanden Kawamura et al. (1997) bei neugeborenen Menschen und Mäusen eine postpartale Granulozytose, die durch verschiedenartigen Stress verursacht wurde. Diese aktivierten Leukozyten produzieren im Rahmen des sog. „respiratory burst“ reaktive Sauerstoffspezies, die zur Beeinträchtigung des antioxidativen Status im Blut der Welpen geführt haben könnten. Auch Korhonen et al. (2000) stellten bei Rennpferden nach körperlicher Anstrengung eine stressinduzierte Leukozytose fest, die mit einer erhöhten Sauerstoffradikalbildungs-Kapazität im peripheren Blut verbunden war.

Zusätzlich vergingen nach dem Absetzen von den Muttertieren bis zur Blutentnahme 1-2 Stunden, in denen die neugeborenen Welpen keine Milch aufnehmen konnten. Diese Faktoren könnten zur Reduzierung der Antioxidantien im Blut geführt haben.

2.3 Einfluss von Lactoferrin auf den antioxidativen Status

Das Auftreten von freien Eisenionen im Plasma neugeborener Säuglinge wurde schon mehrfach beobachtet (Evans et al., 1992; Moison et al., 1993; Dorrepaal et al., 1996). Dabei ist die Herkunft des Eisens noch nicht vollständig geklärt. Beim Abbau der fetalen Erythrozyten in den ersten Lebensmonaten werden vermehrt Eisenionen frei, die die Bindungskapazität des beim Neugeborenen nur in geringen Konzentrationen vorhandenen Transferrins möglicherweise überschreiten. Bei Hypoxie können im Gewebe durch Absinken des pH-Werts Eisenionen von den Bindungsstellen des Ferritins freigesetzt werden und nach oxidativer Schädigung der Zellen ins Plasma gelangen. So fanden Dorrepaal et al. (1996) bei 80% der untersuchten asphyktischen Kindern nicht protein-gebundenes Eisen im Plasma. Diese katalytischen Eisenionen können in der Fenton-Reaktion zur vermehrten Bildung von hochreaktiven Hydroxyl-Radikalen führen.

Durch die Zugabe von Lactoferrin zu Ersatzmilchpräparaten mit unterschiedlichen Eisengehalten erreichten Raghuvver et al. (2002) ein Absinken der Konzentrationen an freien Radikalen und Lipidperoxidationsprodukten. Im vorliegenden Versuch sollte getestet werden, ob die Fütterung von eisenbindendem Lactoferrin einen Einfluss auf den antioxidativen Status im Blut der Welpen ausübt. Neugeborene können während der ersten 36 Lebensstunden eine Vielzahl von Makromolekülen wie Immunglobuline und Lactoferrin aus dem Darm absorbieren. Auch nach dem Schluss der Darmschranke wurde bei 6-Wochen alten Absatzferkeln ein Transfer von Lactoferrin aus dem Darm ins Blut beobachtet (Harada et al., 1999). Kitagawa et al. (2003) stellten selbst bei 10- bis 12-Wochen alten Schweinen eine Transzytose von Lactoferrin in die Epithelzellen der apikalen Dünndarmzotten fest. Von dort aus wurde nahezu das gesamte absorbierte Lactoferrin über Lymphwege und die Portalvene in die systemische Zirkulation transportiert. Lactoferrin kann über spezifische Oberflächenrezeptoren an periphere Lymphozyten binden und ihre Proliferation und Differenzierung beeinflussen. In dem Versuch von Kitagawa et al. konnten Lactoferrin-positive Lymphozyten im Darmepithel und im Blut gefunden werden. Daraus lässt sich schließen, dass oral verabreichtes Lactoferrin auch noch längere Zeit nach dem Absetzen der Tiere absorbiert werden kann und einen Einfluss auf die systemische Immunabwehr und den antioxidativen Status ausübt. In unserem Versuch konnten jedoch keine nennenswerten Unterschiede zwischen den TEAC-Werten der einzelnen Lactoferrin-Gruppen und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Die durchgehend höheren Werte der Lactoferrin-Gruppen ab Tag 70 waren vermutlich auf die höhere Futteraufnahme und damit verbunden auf die

vermehrte Antioxidantienaufnahme zurückzuführen. Insbesondere die Gruppen 2 (30 mg Lf/kg TS) und 4 (60 mg Lf/kg TS) wiesen deutlich gesteigerte TEAC-Werte auf und hatten in der 12. und 13. Woche eine um durchschnittlich 150 g höhere Futteraufnahme als die Kontrollgruppe zu verzeichnen.

Es gibt mehrere mögliche Erklärungen für die mangelnde Wirkung von Lactoferrin, z.B. eine Inaktivierung des Lactoferrins nach der Zugabe zu Milchaustauschern, immunologische Abwehrreaktionen gegen das körperfremde Protein im Darm und fehlende oder unzureichend vorhandene Hilfsfaktoren, die für eine optimale Eisenbindung nötig sind (Bicarbonat-Ionen). Gutteridge et al. (1981) zeigten, dass eisengesättigtes Lactoferrin nicht in der Lage ist, Oxidationen in einem Liposomen-System zu verhindern. Dagegen fanden Satué-Gracia et al. (2000), dass bovines Lactoferrin in Ersatzmilchpräparaten auch bei 100 % Eisensättigung als Antioxidans wirkt. Sie erklärten sich den antioxidativen Effekt bei molaren Eisen/Lactoferrin-Verhältnissen von über 2:1 mit der unspezifischen Eisenbindung an anderen Stellen als an den beiden hochaffinen Eisenbindungsstellen des Lactoferrins. Ob das supplementierte Lactoferrin durch die höheren Eisengehalte in dem von uns verwendeten Milchaustauscher (siehe 1.4) in der Wirkung beeinträchtigt wurde, bleibt noch zu klären.

2.4 Einfluss von *Enterococcus faecium* auf den antioxidativen Status

Antioxidative Aktivitäten von milchsäurebildenden Bakterien wurden erstmals 1993 von Kaizu et al. nachgewiesen. In einem in vivo-Experiment fütterten sie Ratten eine Vitamin E-Mangeldiät und beurteilten die Auswirkungen einer oralen Administration von intrazellulären zellfreien Extrakten zweier *Lactobacillus* spp. auf den Vitamin E-Mangelzustand. *Lactobacillus* sp. SBT 2028 konnte die Hämolyse deutlich verhindern, die bei allen Ratten der Kontrollgruppe auftrat. Zusätzlich zeigten sich tendentiell geringere Konzentrationen an Peroxiden in der Leber der supplementierten Ratten. Dabei waren die antioxidativen Effekte nicht auf eine Vitamin E-Synthese des Bakteriums zurückzuführen. Spätere Studien identifizierten sie als Superoxid-Dismutase-Aktivität, Eisenbindungs- und Radikalfänger-eigenschaften (Lin und Yen, 1999; Kullisaar et al., 2002). Da auch Neugeborene niedrigere Vitamin E-Spiegel und verringerte antioxidative Aktivitäten im Blut aufweisen, wäre eine Erhöhung der TEAC-Werte durch die Verabreichung antioxidativ wirksamer Probiotika denkbar. Im vorliegenden *Ec. faecium*-Versuch unterschied sich die TEAC der Probiotikumgruppe zu keinem Zeitpunkt signifikant von der Kontrollgruppe. Nach einem anfänglichen

Tiefpunkt stiegen die Werte in beiden Gruppen bis Tag 56 an, um anschließend bis Versuchsende deutlich abzusinken. Dieser Verlauf in der Festfutterperiode lässt sich mit der schlechteren Futtermittelverwertung des Feuchtfutters erklären, welches die Welpen ab Tag 56 nach Absetzen des Milchaustauschers ausschließlich erhielten. Ein geringerer Protein- und Vitamingehalt könnte zum Absinken der Antioxidantien im Blut geführt haben. Dies wird durch die sinkenden Vitamin E- Spiegel im Plasma der Welpen beider Gruppen ab Tag 56 bestätigt.

Die mangelhaften Auswirkungen des *Ec. faecium* sind vermutlich auf fehlende oder unzureichende antioxidative Aktivitäten zurückzuführen. Kaizu et al. (1993) untersuchten 570 milchsäurebildende Bakterienspezies auf ihre antioxidativen Aktivitäten und stellten lediglich bei 19 Arten eine Hemmung der Oxidationsprozesse fest. Von den zwei in vivo getesteten antioxidativ wirksamen *Lactobacillus* spp. verbesserte nur *Lactobacillus* sp. SBT 2028 den Vitamin E- Mangelzustand der Ratten und verminderte das Risiko von oxidativem Stress. Lin und Chang (2000) bestimmten in einem in vitro-Experiment den antioxidativen Effekt von *Bifidobacterium longum* und *Lactobacillus acidophilus* auf Lipidperoxidationen im Plasma. Dabei zeigten die intrazellulären zellfreien Extrakte beider Bakterien inhibitorische Wirkungen. Auch intakte Bakterienzellen wurden getestet, sie gelangen jedoch unter physiologischen Bedingungen nicht vom Darm ins Blut. Inwieweit ein antioxidativer Effekt im Plasma auftritt, hängt hauptsächlich davon ab, wieviel der intrazellulären zellfreien Extrakte, die nach Zerstörung der Bakterien im Darm frei werden, ins Blut absorbiert werden. Lin und Chang konnten zusätzlich eine schützende Wirkung von *Bifidobacterium longum* und *Lactobacillus acidophilus* auf intestinale Zellen nachweisen, die mit einer zytotoxischen oxidativ wirksamen Substanz inkubiert worden waren. Ob *Ec. faecium* im Gastrointestinaltrakt von Welpen die Darmschleimhaut vor sauerstoffradikalinduzierten Schäden bewahren kann und somit antioxidative Effekte zeigt, muss durch weitere Untersuchungen geprüft werden.

2.5 Antioxidativ wirksame Vitamine im Blut der Hundewelpen

Um eine detaillierte Beurteilung und eine Erklärung des verschlechterten antioxidativen Status im Blut der Hundewelpen zu erhalten, wurden die Konzentrationen einzelner Plasmaantioxidantien gemessen: Vitamin E als Antioxidans der fettlöslichen Phase und Vitamin C als Antioxidans der wasserlöslichen Phase.

Vitamin E wird im Körper als wichtigstes Antioxidans der fettlöslichen Phase angesehen. Es stellt einen integralen Bestandteil von Lipidmembranen dar, in denen es seine Radikalfängeraktivitäten ausübt und ungesättigte Fettsäuren vor Oxidationen bewahrt.

Im Serum der Mutteraufzucht-Welpen wurden direkt nach der Geburt niedrige Vitamin E-Konzentrationen gemessen, die in den darauffolgenden Tagen durch die Kolostrumaufnahme schnell anstiegen (Abb.3). Ein ähnlicher Verlauf wurde auch bei anderen neugeborenen Tierarten gesehen (Loudenslager et al., 1986; Njeru et al., 1994). Da die Plazenta für fettlösliche Vitamine wenig permeabel ist, kommen Neugeborene mit nur geringen Vitamin E-Reserven auf die Welt und sind auf eine Aufnahme mit der Milch angewiesen. Insbesondere das Kolostrum enthält hohe Konzentrationen an Vitamin E (Hidiroglou, 1989; Njeru et al., 1994), was in den eigenen Untersuchungen an Hundemilch bestätigt werden konnte (siehe E 1.4). Die geringen Vorräte der Welpen an Vitamin E werden auch dadurch deutlich, dass Hunde in den ersten Lebenstagen noch keine nennenswerten Mengen an Speicherfett besitzen (Meyer et al., 1985).

Die Welpen des *Ec. faecium*- und des Lactoferrin- Versuchs wiesen nach der Kolostrumaufnahme an Tag 3 niedrigere Vitamin E- Spiegel als die Mutteraufzuchtwelpen auf (Abb.3). Dies lässt sich möglicherweise mit vermehrtem oxidativen Stress und der längeren Nahrungskarenz nach dem Absetzen von den Muttertieren erklären. In den folgenden Wochen erhöhten sich die Vitamin E- Konzentrationen im Plasma der *Ec. faecium*-Welpen, stiegen jedoch wegen des geringeren Vitamin E- Gehalts des Milchaustauschers langsamer als die der Mutteraufzuchtwelpen an. Ab Tag 56 konnte ein Absinken der Plasmawerte beobachtet werden. Als Ursache kommen der Wegfall des Milchaustauschers und die geringeren Vitamin E- Gehalte des Feuchtfutters in Frage. Im Plasma der Lactoferrin-Welpen konnte in den ersten Lebenswochen, vermutlich durch die geringeren Milchaustauscheraufnahmen, kein vergleichbarer Anstieg der Vitamin E- Konzentrationen wie bei den *Ec. faecium*-Welpen festgestellt werden. Über den gesamten Versuchszeitraum wiesen die Welpen des Lactoferrin-Versuchs deutlich niedrigere Vitamin E- Spiegel auf. Turek et al. (2003) fütterten 2-Monate alten Coonhound-Welpen eine Diät mit oxidierten Fetten und stellten eine mit steigendem Oxidationsgrad der Nahrung abnehmende Vitamin E- Konzentration im Serum der Tiere fest. Der antioxidative Status (TEAC) der Lactoferrin-Welpen erhöhte sich jedoch im Vergleich zu den *Ec. faecium*-Welpen ab Tag 56 kontinuierlich, so dass vermehrte Oxidationsprodukte im Trockenfutter unwahrscheinlich sind. Über die Vitamin E- Gehalte des Trockenfutters liegen keine Angaben vor.

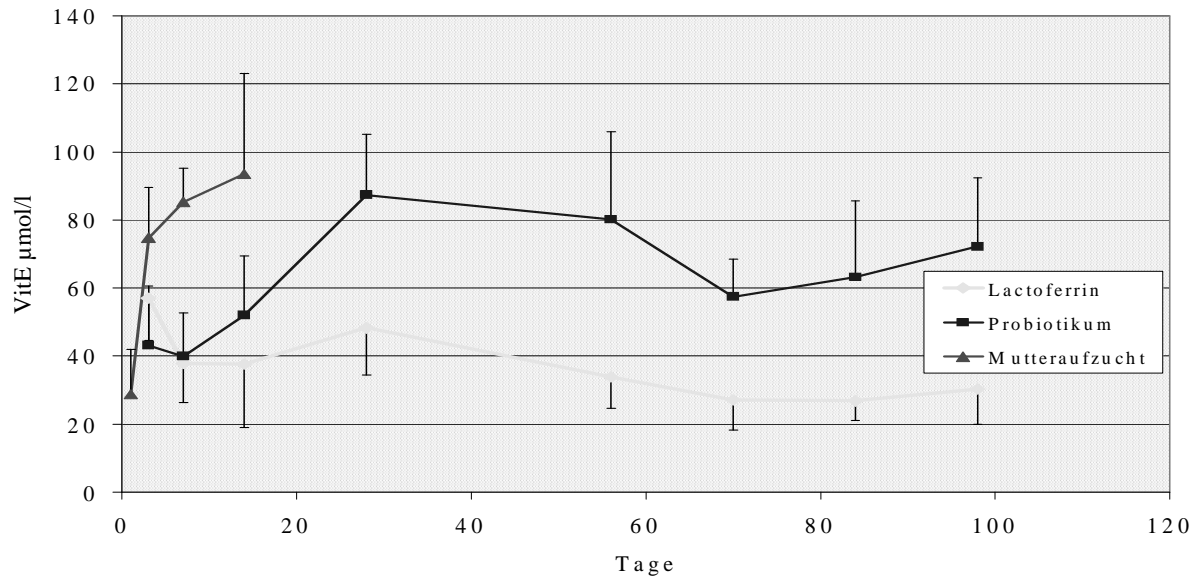


Abbildung 3: Vitamin E - Konzentrationen von Lactoferrin-, Probiotikum- und Mutteraufzucht-Welpen

Beim Vergleich des Verlaufs von TEAC und Vitamin E konnten keine eindeutigen Korrelationen festgestellt werden. Miller et al. (1993b) bestimmten die TEAC einzelner Plasmaantioxidantien und beurteilten ihre Bedeutung an der Gesamt-TEAC von humanem Plasma. Albumin weist nur geringe antioxidative Aktivitäten auf, durch die hohen Plasmakonzentrationen gilt es jedoch neben Harnsäure als wichtigstes Antioxidans. Vitamin E trägt etwa 3 % zur Gesamt-TEAC bei. Der Anteil von Ascorbinsäure beträgt weniger als 10% und die hohe hepatische und renale Clearance machen es unwahrscheinlich, dass dieser Wert großartig ansteigen kann. Bilirubin zeigt hohe antioxidative Aktivitäten, die in bestimmten pathologischen Situationen, in denen die Plasmaspiegel ansteigen, bedeutsam werden können.

Vitamin E wird im Plasma mit Hilfe von Lipoproteinen transportiert. Bei der Bestimmung der Plasma-Vitamin E- Konzentration wurde durch Fällung der Proteine und Extraktion mit Hexan das gesamte Vitamin E aus den Lipoproteinen herausgelöst und gemessen. Die TEAC-Bestimmung wurde dagegen mit einer unbehandelten Plasmaprobe durchgeführt, in der das gebundene Vitamin E möglicherweise nicht vollständig mit den freien Radikalen reagierte und somit nur teilweise erfasst wurde.

Es wird deutlich, dass Vitamin E an der antioxidativen Aktivität, die als TEAC gemessen wurde, keinen großen Anteil ausmacht. Dies darf jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, dass es an Lipidmembranen als wichtigstes Antioxidans gilt und die ungesättigten Fettsäuren durch

Unterbrechung radikaler Kettenreaktionen vor Oxidationen schützt. Um die Abnahme der TEAC in den ersten Lebenstagen deuten zu können, müssen noch weitere Antioxidantien im Blut untersucht werden.

Die Vitamin C- Konzentration konnte lediglich im Blut der Mutteraufzucht-Welpen bestimmt werden. Die Werte sanken vom Zeitpunkt der Geburt bis Tag 3 deutlich ab, erreichten bis Tag 7 wieder den Ausgangswert und blieben in der folgenden Woche konstant. Im Gegensatz zu Primaten, Menschen und Meerschweinchen können Hunde Vitamin C selbstständig synthetisieren. In der Leber besitzen sie das Enzym L-gulono- γ -lacton-Oxidase, das L-gulono- γ -lacton zu L-keto- γ -lacton umwandelt, woraus durch Isomerisation L-Ascorbinsäure entsteht. Während der Trächtigkeit wird Vitamin C aktiv über die Plazenta transportiert. Daneben konnte in der Leber fetaler Ferkel eine Vitamin C-Synthese nachgewiesen werden (Ching et al., 2001). Somit kommen die Neugeborenen bereits mit hohen Vitamin C-Konzentrationen im Blut auf die Welt und können die Plasmaspiegel durch Eigensynthese und Vitamin C-Aufnahme über die Muttermilch relativ konstant halten.

Nach starker körperlicher Anstrengung und oxidativem Stress steigt der Vitamin C-Bedarf jedoch über die Syntheseleistung der Leber hinaus an. Insbesondere beim Neugeborenen ist noch nicht mit einer vollen Syntheseleistung zu rechnen. Das Absinken der Vitamin C-Konzentrationen an Tag 3 lässt sich mit hohem oxidativen Stress erklären und korrelierte mit der Abnahme der TEAC-Werte. In den folgenden Tagen konnten die Welpen den Vitamin C-Spiegel bereits wieder nachregulieren.

2.6 Freie Eisenionen im Blut als Ursache des verschlechterten antioxidativen Status

Für den erhöhten oxidativen Stress in den ersten Lebenswochen wird neben dem verringerten antioxidativen Abwehrsystem die Gegenwart von freien Eisenionen im Plasma des Neugeborenen verantwortlich gemacht. Insbesondere beim frühgeborenen und hypoxischen Säugling konnten nicht protein-gebundene Eisenionen im Plasma gemessen werden (Evans et al., 1992; Dorrepaal et al., 1996).

Da der Vitamin E- Gehalt der neonatalen Erythrozyten in den ersten 4-6 Wochen stark absinkt und die antioxidativen Enzyme, wie die Glutathion-Peroxidase, eine niedrige Aktivität aufweisen, sind die Erythrozyten der Neugeborenen für oxidativen Stress besonders anfällig (Jain, 1989; Böhles, 1996). Mehrere Faktoren führen zur kürzeren Überlebensdauer der

neonatalen Erythrozyten im Vergleich zu den adulten: Unterschiede in der Zellgeometrie und der Membranlipid-Zusammensetzung, oxidative Membranschäden und verstärktes Binden von Immunglobulinen auf der Zelloberfläche (Jain, 1989). Durch den Abbau der neonatalen Erythrozyten im ersten Lebensmonat fallen vermehrt Eisenionen an, die die Bindungskapazität des Transferrins überschreiten und zum Auftreten von freien Eisenionen im Plasma führen können. Dagegen zeigten Evans et al. (1992), dass im Plasma einiger Neugeborener freie Eisenionen trotz vorhandener latenter Eisenbindungskapazität vorkommen. Möglicherweise liegt das Eisen als Chelatkomplex vor und kann so nur schlecht vom Transferrin gebunden werden. Auch Ciccoli et al. (2003) fanden keine Korrelation zwischen den Plasmaspiegeln an Transferrin und nicht protein-gebundenem Eisen, so dass die Gegenwart der freien Eisenionen nicht nur von der Konzentration dieses Proteins abhängt.

Die aerobe Inkubation von neonatalen Erythrozyten, die einen oxidativen Stress darstellt, führte zur intraerythrozytären Eisenfreisetzung vom Hämoglobin (Ciccoli et al., 2003). Das freie Eisen fördert den oxidativen Membranschaden von der Innenseite der Erythrozyten und führt bei Mangel an Glutathion zu Lipidperoxidationen und Hämolyse. Dies könnte der Auslöser für den Abbau der neonatalen Erythrozyten und das Entfernen aus dem Blutstrom sein. Zusätzlich demonstrierten die Autoren, dass das freigesetzte Eisen aus den Erythrozyten in das Inkubationsmedium diffundierte und somit im Plasma nach oxidativem Stress zum Auftreten von nicht protein-gebundenem Eisen führen kann.

Die Erythrozyten von Patienten mit intermediärer β -Thalassämie, die reich an fetalem Hämoglobin sind, zeigen nach aerober Inkubation eine ähnlich hohe intraerythrozytäre Eisenfreisetzung wie die der Neugeborenen. Ciccoli et al. (2003) vermuteten daher, dass die Gegenwart von fetalem Hämoglobin eine günstige Voraussetzung für die Eisenfreisetzung in den Erythrozyten darstellt. Da Hunde eine Spezies sind, die kein spezielles fetales Hämoglobin aufweisen (LeCrone, 1970), könnte dies eine Erklärung sein, warum im Serum der Mutteraufzuchtewelpen keine freien Eisenionen nachgewiesen werden konnten.

Auch zwischen dem Auftreten von Hypoxie und freien Eisenionen im Plasma wurde ein Zusammenhang festgestellt. Dorrepaal et al. (1996) fanden in ihren Untersuchungen bei 60 % der mäßig asphyktischen und bei 80 % der schwer asphyktischen Kinder nicht protein-gebundenes Eisen im Plasma. Durch Absinken des pH-Werts während der Ischämie können Eisenionen vom Speicherprotein Ferritin freigesetzt werden und durch oxidative Schädigung der Zellen ins Plasma gelangen. Über die Bildung hochreaktiver Hydroxyl-Radikale kommt

es zu umfangreichen Zellschäden, wodurch weitere katalytisch wirksame Eisenionen freigesetzt werden. Buonocore et al. (1998) stellten im Blut von Neugeborenen eine deutliche Korrelation zwischen den Hypoxanthin-Spiegeln (als Parameter für Hypoxie) und intraerythrozytär freigesetzten Eisenionen fest, die ins Plasma diffundieren und zum Auftreten von nicht protein-gebundenem Eisen führen können.

So gibt es mehrere Erklärungsversuche für das Auftreten von freien Eisenionen im neonatalen Plasma. Sie können zum einen beim Abbau der fetalen Erythrozyten vermehrt anfallen und zum anderen unter hypoxischen Bedingungen vom Speicherprotein Ferritin freigesetzt werden. Die intraerythrozytäre Eisenfreisetzung nach Hypoxie und oxidativem Stress, wie er bei Neugeborenen durch den Wechsel aus der sauerstoffarmen Umgebung des Uterus in die sauerstoffreiche Außenwelt auftritt, stellt eine dritte Möglichkeit dar. Inwieweit diese Phänomene beim neugeborenen Hundewelpen von Bedeutung sind, ist noch unklar. Bei den Welpen der Mutteraufzucht konnten keine freien Eisenionen im Serum nachgewiesen werden. Da an Tag 1 und 3 nicht von allen Welpen genügend Serum zur Bestimmung von freiem Eisen zur Verfügung stand, war möglicherweise die Zahl der untersuchten Welpen zu gering, um eine eindeutige Aussage treffen zu können. Es sollte an einer größeren Tierzahl weiter überprüft werden, ob der verschlechterte antioxidative Status von neugeborenen Hundewelpen mit dem Auftreten von freien Eisenionen im Plasma zu erklären ist. Auch wäre in diesem Zusammenhang interessant zu erfahren, ob die Zufütterung höherer Lactoferrin-Konzentrationen das eventuelle Auftreten der freien Eisenionen verhindern kann.

Lindeman et al. (1992) zeigten, dass neugeborene Säuglinge im Vergleich zu Erwachsenen eine sehr geringe latente Eisenbindungskapazität aufweisen. Bei einigen Neugeborenen konnte gar keine latente Eisenbindungskapazität nachgewiesen werden. Das Plasma dieser Babys enthielt freie Eisenionen und stimulierte Lipidperoxidationen.

Im Blut der Mutteraufzucht-Welpen sank die latente Eisenbindungskapazität in den ersten zwei Lebenswochen deutlich ab. Bei 2 der Welpen wurden Werte unter 10 µg/dl gemessen, was einer Transferrin-Sättigung von über 90 % entsprach. Dieses Ergebnis deutet auf ein vermehrtes Auftreten von Eisenionen hin, das zur höheren Sättigung des Transportproteins im Plasma geführt hat. Ob es Zeitpunkte gab, an denen die Sättigung kurzfristig 100 % betrug und freies Eisen im Plasma der Welpen auftrat, bleibt spekulativ.

2.7 Gesundheitliche Folgen des verschlechterten antioxidativen Status

Beim menschlichen Säugling werden eine Reihe von Neugeborenenenerkrankungen wie die bronchopulmonale Dysplasie, die Frühgeborenen-Retinopathie und die nekrotisierende Enterocolitis mit reaktiven Sauerstoffspezies in Verbindung gebracht (Saugstad, 2001). Ein vermindertes antioxidatives Abwehrsystem kann den Neugeborenen für die Entwicklung dieser Erkrankungen prädisponieren. Zusätzlich wird die Inzidenz durch eine Ernährung mit Ersatzmilchpräparaten erhöht. So erkrankten mutterlos aufgezogene Hundewelpen wesentlich häufiger an sauerstoffradikalinduzierter nekrotisierender Enterocolitis als gesäugte Welpen (Hansbrough et al., 1983).

Silvers et al. (1994) zeigten, dass ein niedriger antioxidativer Status zur Geburt ein Risikofaktor für die Mortalität des Neugeborenen ist. In unseren Fütterungsversuchen sahen wir jedoch keinen Zusammenhang zwischen dem verschlechterten antioxidativen Status und einer erhöhten Sterblichkeitsrate der Welpen. Alle Welpen des Lactoferrin- und *Ec. faecium*-Versuchs überlebten die mutterlose Aufzucht und zeigten im gesamten Versuchszeitraum von 14 Wochen keine Beeinträchtigung des Gesundheitszustands. Ein Welpe mit angeborener Gaumenspalte sowie die Welpen eines Wurfes, die in der zweiten Lebenswoche an Parvovirose erkrankten, wurden vom weiteren Versuch ausgeschlossen und ihre Daten nicht berücksichtigt. Auch Rogers et al. (2000) konnten keine Korrelation zwischen dem antioxidativen Status (TEAC) und dem Auftreten von sauerstoffradikalbedingten Neugeborenenenerkrankungen entdecken.

Stohrer et al. (2001) bestimmten verschiedene Enzymaktivitäten im Blut von Kälbern und Fohlen, um die gesundheitlichen Folgen des geburtsnah erniedrigten antioxidativen Status zu beurteilen. Dabei stellten sie bei beiden untersuchten Spezies erhöhte Aktivitäten des Leberenzym AST und des Muskelenzym CK fest, die auf eine Belastung mit Sauerstoffradikalen zurückzuführen sein könnten. Um bei den neugeborenen Hundewelpen genauere Aussagen über die gesundheitlichen Folgen des verschlechterten antioxidativen Status machen zu können, müssen neben der durchgeführten klinischen Untersuchung weitere Parameter, wie Enzymaktivitäten im Blut gemessen werden.

F Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der antioxidative Status von neugeborenen Hundewelpen bestimmt. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Zufütterung von Lactoferrin bzw. *Enterococcus faecium* einen Einfluss auf den antioxidativen Status der Tiere ausübt. Dazu wurden 42 neonatale Beagle-Welpen am 3. Tag nach der Geburt von den Muttertieren getrennt und in zwei unabhängigen Fütterungsversuchen von Hand aufgezogen. Im Lactoferrin-Versuch erhielten 30 Welpen ab Tag 3 einen selbsthergestellten Milchaustauscher mit unterschiedlichen Lactoferrinkonzentrationen (0, 30, 60, 120 mg / kg TS), die später über ein Festfutter verabreicht wurden. Im *Ec. faecium*-Versuch erhielten 12 Welpen anstelle des Lactoferrins das Probiotikum *Enterococcus faecium* (0 bzw. 2×10^9 KbE / kg TS). Der antioxidative Status wurde als TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) an Tag 3, 7, 14, 28, 56, 70, 84 und 98 im Blut der Welpen gemessen. Um mögliche Veränderungen der TEAC genauer beurteilen zu können, wurden die Plasmakonzentrationen des antioxidativ wirksamen Vitamin E bestimmt.

Als Vergleich zur mutterlosen Aufzucht dienten 11 neugeborene Beagle-Welpen, die bei ihren Mutterhündinnen aufwuchsen (Mutteraufzucht). An Tag 1, 3, 7 und 14 wurden bei ihnen neben der TEAC die Vitamine E und C im Blut gemessen. Da freie, nicht protein-gebundene Eisenionen im Plasma die Bildung hochreaktiver Sauerstoffradikale katalysieren können und somit als Ursache für einen beeinträchtigten antioxidativen Status in Frage kommen, wurden im Blut der Mutteraufzucht-Welpen zusätzlich freies Eisen, die latente Eisenbindungskapazität sowie Gesamteisen bestimmt und die totale Eisenbindungskapazität und Transferrinsättigung berechnet.

Die Bestimmung der TEAC ergab bei den Welpen der Mutteraufzucht direkt nach der Geburt hohe Werte, die mit denen erwachsener Beagle-Hunde vergleichbar waren. In den ersten Lebenstagen sank die TEAC jedoch deutlich ab. Die Welpen des Lactoferrin- und *Ec. faecium*-Versuchs wiesen an Tag 3 und 7 ebenfalls niedrige TEAC-Werte auf, die in den darauffolgenden Wochen langsam anstiegen. Nach der Geburt kommt es somit bei neugeborenen Hundewelpen durch erhöhten oxidativen Stress zu einer deutlichen Verminderung des antioxidativen Status im Blut. Dabei konnte kein Einfluss der Lactoferrin- bzw. *Ec. faecium*- Supplementierung festgestellt werden. Möglicherweise hätten die probiotischen Substanzen direkt nach der Geburt verabreicht werden müssen, um die signifikante Abnahme der TEAC in den ersten Lebenstagen zu verhindern. Dies war in

unseren Fütterungsversuchen aus praktischen Gründen nicht möglich, da die Welpen erst am 3. Lebenstag nach der Kolostrumaufnahme in den Versuch eingingen.

Die Welpen wurden mit geringen Vitamin E- Konzentrationen im Blut geboren. In Abhängigkeit von der Fütterung erhöhten sich die Blutspiegel unterschiedlich schnell, wobei der deutlichste Anstieg bei den Mutteraufzucht-Welpen zu verzeichnen war. Der erniedrigte antioxidative Status in der Neugeborenenphase wurde somit nicht von einer Abnahme an antioxidativ wirksamen Vitamin E begleitet, sondern muss durch die Verminderung anderer Antioxidantien im Blut hervorgerufen worden sein. Die Zufütterung von Lactoferrin bzw. *Ec. faecium* bewirkte keine nennenswerten Änderungen der Vitamin E- Gehalte im Plasma.

Die Konzentrationen an Vitamin C sanken im Blut der Mutteraufzucht-Welpen nach der Geburt bis zum Tag 3 deutlich ab und spiegelten sich damit in der Verschlechterung des antioxidativen Status wider. Bis zum Tag 7 waren die Welpen in der Lage, ihre Blutspiegel durch körpereigene Vitamin C- Synthese und Vitamin C- Aufnahme über die Muttermilch wieder zu erhöhen.

Zu keinem der vier Mess-Zeitpunkte konnten freie Eisenionen im Serum der Mutteraufzucht-Welpen nachgewiesen werden. Da aber die latente Eisenbindungskapazität im Serum bis zum Tag 14 deutlich abnahm und bei zwei Welpen eine Transferrin-Sättigung von über 90% ermittelt wurde, ist in der Neugeborenenphase mit einem vermehrten Anfall von Eisenionen zu rechnen. Ein zeitweises Auftreten von nicht protein-gebundenem freien Eisen kann somit als mögliche Ursache des verminderten antioxidativen Status der Welpen nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass der antioxidative Status von neugeborenen Hundewelpen in den ersten Lebenswochen durch oxidativen Stress verschlechtert ist. Dabei wurde kein Zusammenhang zwischen dem erniedrigten antioxidativen Status und einem vermehrten Auftreten von Neugeborenenenerkrankungen oder einer erhöhten Mortalität offensichtlich. Die Zufütterung probiotischer Substanzen ab dem 3. Lebenstag brachte hinsichtlich des antioxidativen Status keine Vorteile.

G Summary

Influence of probiotic substances on the antioxidant status of newborn puppies.

The present study is the first to determine the antioxidant status of newborn puppies. In addition to that, the thesis tried to settle whether the additional feeding of lactoferrin and *Enterococcus faecium* respectively does exert an influence on the antioxidant status of the animals.

42 neonatal beagle puppies were separated from their mothers on the third day after birth and reared by hand in two different feeding trials. In the lactoferrin experiment, 30 puppies received a self-made formula with different lactoferrin-concentrations (0, 30, 60, 120 mg Lf / kg dry matter of feed), which were later given to them in solid food. In the *Ec. faecium* experiment, 12 puppies received the probiotic *Enterococcus faecium* (0 and 2×10^9 cfu / kg dry matter of feed, respectively) instead of the lactoferrin. The antioxidant status was measured as TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) in the puppies' blood on day 3, 7, 14, 28, 56, 70, 84 and 98 of the experiment. In order to judge possible changes of the TEAC more exactly, the plasma-concentrations of the antioxidant vitamin E were determined.

11 newborn beagle puppies, which were raised by their mother dogs (mother care), were observed in comparison to the orphan puppies. On day 1, 3, 7 and 14, the TEAC as well as vitamin E and C of the puppies in mother care were measured. Free, non protein-bound iron ions in the plasma can catalyze the production of highly reactive oxygen radicals and can thus be a possible cause for an impairment of the antioxidant status. Therefore, free iron, the latent iron-binding capacity as well as total iron were determined and the total iron-binding capacity and transferrin saturation were calculated in the blood of the puppies in mother care.

The determination of the TEAC of the puppies in mother care showed high values directly after birth. These values were comparable to those of adult beagle dogs. In the first days of their life, the TEAC clearly decreased. The puppies of the lactoferrin- and *Ec. faecium*-experiment also showed low TEAC-values on day 3 and 7, which slowly increased during the following weeks. Therefore, heightened antioxidant stress after birth leads to a significant decrease of the antioxidant status in the blood of newborn puppies. In connection with this, no influence of the lactoferrin- and *Ec. faecium*- supplementation could be observed. The probiotic substances should possibly have been given to the puppies directly after birth in order to prevent the significant decrease of the TEAC in the first days of their life. For

practical reasons, this was impossible in our feeding trials, since the puppies only entered the experiment on the third day after birth, when the colostrum uptake was already finished.

The puppies were born with low vitamin E-concentrations in their blood, which then increased - depending on the feeding - at a different pace. The clearest increase could be registered in the blood of the puppies in mother care. Therefore, the impaired antioxidant status in the neonatal period was not accompanied by a decrease of the antioxidant vitamin E but must have been caused by the reduction of other antioxidants in the blood. The additional feeding of lactoferrin and *Ec. faecium* respectively did not cause any significant changes of the vitamin E concentrations in the plasma. In the lactoferrin- and the *Ec. faecium*-experiment, the treatment groups differed only vaguely from the control groups with respect to the vitamin E levels.

The vitamin C concentrations in the serum of the puppies in mother care clearly decreased after birth until day 3 and thus reflected the deterioration of the antioxidant status. Until day 7, the puppies could then raise their blood levels with the help of their own vitamin C synthesis and through uptake of vitamin C by breast milk.

Free iron ions could not be ascertained in the serum of the puppies in mother care at any of the four times of measurement. Since the latent iron-binding capacity in the serum clearly decreased until day 14 and since a transferrin saturation of over 90% was ascertained with two puppies, an augmented occurrence of iron ions is to be expected in the neonatal period. A temporary occurrence of non protein-bound free iron as a possible cause for the reduced antioxidant status can thus not be completely excluded.

It could be shown that the antioxidant status of newborn puppies in the first weeks after birth is impaired by oxidative stress. In connection with this, no correlation between the lowered antioxidant status and an augmented occurrence of newborn-diseases or a heightened mortality became obvious. The additional feeding of probiotic substances from day 3 after birth did not produce any advantages with respect to the antioxidant status.

H Literaturverzeichnis

Abe F, Ishibashi N, Shimamura S : Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *J. Dairy Sci.* **1995**; 78: 2838-2846

Agarwal R, Sharma N, Chaudhry R, Deorari A, Paul VK, Gewolb IH, Panigrahi P : Effects of oral Lactobacillus GG on enteric microflora in low-birth-weight neonates. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2003**; 36: 397-402

Ahotupa M, Saxelin M, Korpela R : Antioxidative properties of Lactobacillus GG. *Nutrition Today* **1996**; 31 (Suppl): 51S-52S

Almaas R, Rootwelt T, Øyasæter S, Saugstad OD : Ascorbic acid enhances hydroxyl radical formation in iron-fortified infant cereals and infant formulas. *Eur. J. Pediatr.* **1997**; 156: 488-492

Ambe KS, Tappel AL : Oxidative damage to amino acids, peptides and proteins by radiation. *Journal of Food Science and Technology* **1961**; 26: 448-451

Ambruso DR, Johnston RB Jr. : Lactoferrin enhances hydroxyl radical production by human neutrophils, neutrophil particulate fractions, and an enzymatic generating system. *J. Clin. Invest.* **1981**; 67: 352-360

Andrews JS, Griffith WH, Mead JF, Stein RA : Toxicity of air-oxidized soybean oil. *J. Nutr.* **1960**; 70: 199-210

Annuk H, Shchepetova J, Kullisaar T, Songisepp E, Zilmer M, Mikelsaar M : Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. *J. Appl. Microbiol.* **2003**; 94: 403-412

Araujo V, Arnal C, Boronat M, Ruiz E, Dominguez C : Oxidant-antioxidant imbalance in blood of children with juvenile rheumatoid arthritis. *Biofactors.* **1998**; 8: 155-159

Arnold RR, Brewer M, Gauthier JJ : Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect. Immun.* **1980**; 28: 893-898

Art T, Kirschvink N, Smith N, Lekeux P : Indices of oxidative stress in blood and pulmonary epithelium lining fluid in horses suffering from recurrent airway obstruction. *Equine Veterinary Journal* **1999**; 31: 397-401

Aruoma OI, Halliwell B : Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. *Biochem. J.* **1987**; 241: 273-278

Ashton N : Retinal angiogenesis in the human embryo. *Br. Med. Bull.* **1970**; 26: 103-106

Audisio MC, Oliver G, Apella MC : Protective effect of Enterococcus faecium J96, a potential probiotic strain, on chicks infected with Salmonella pullorum. *J. Food Protect.* **2000**; 63: 1333-1337

- Babior BM : Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. (First of Two Parts). *The New England Journal of Medicine* **1978**; 298: 659-668
- Baldwin DA, Jenny ER, Aisen P : The effect of human serum transferrin and milk lactoferrin on hydroxyl radical formation from Superoxide and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **1984**; 259: 13391-13394
- Balmer SE, Wharton BA : Diet and faecal flora in the newborn: breast milk and infant formula. *Arch. Dis. Child.* **1989**; 64: 1672-1677
- Bannister JV, Bannister WH, Hill HA, Thornalley PJ : Enhanced production of hydroxyl radicals by the xanthine-xanthine oxidase reaction in the presence of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**; 715: 116-120
- Baskin CR, Hinchcliff KW, DiSilvestro RA, Reinhart GA, Hayek MG, Chew BP, Burr JR, Swenson RA : Effects of dietary antioxidant supplementation on oxidative damage and resistance to oxidative damage during prolonged exercise in sled dogs. *AJVR* **2000**; 61: 886-891
- Baveye S, Ellass E, Mazurier J, Spik G, Legrand D : Lactoferrin: A multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process. *Clin. Chem. Lab. Med.* **1999**; 37: 281-286
- Baveye S, Ellass E, Mazurier J, Legrand D : Lactoferrin inhibits the binding of lipopolysaccharides to L-selectin and subsequent production of reactive oxygen species by neutrophils. *FEBS Letters* **2000**; 469: 5-8
- Baydas G, Karatas F, Gursu MF, Bozkurt HA, Ilhan N, Yasar A, Canatan H : Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. *Archives of Medical Research* **2002**; 33: 276-280
- Beckman JS, Minor RL Jr., White CW, Repine JE; Rosen GM, Freeman BA : Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *J. Biol. Chem.* **1988**; 263: 6884-6892
- Beckmann KB, Ames BN : The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews* **1998**; 78: 547-581
- Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M : Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**; 1121: 130-136
- Benyacoub J, Czarnecki-Maulden GL, Cavadini C, Sauthier T, Anderson RE, Schiffrin EJ, von der Weid T : Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. *Am. Soc. Nutr. Sci.* **2003**; 133: 1158-1162
- Berger HM, Mumby S, Gutteridge JM : Ferrous ions detected in iron-overloaded cord blood plasma from preterm and term babies: implications for oxidative stress. *Free Rad. Res.* **1995**; 22: 555-559
- Berliner JA, Heinecke JW : The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radical Biology and Medicine* **1996**; 20: 707-727

- Block G, Patterson B, Subar A : Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer* **1992**; 18: 1-29
- Böhles H : Antioxidative vitamins in prematurely and maturely born infants. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* **1997**; 67: 321-328
- Bolisetty S, Naidoo D, Lui K, Koh TH, Watson D, Whitehall J : Antenatal supplementation of antioxidant vitamins to reduce the oxidative stress at delivery – a pilot study. *Early Human Development* **2002**; 67: 47-53
- Bolli R, Patel BS, Zhu WX, O'Neill PG, Hartley CJ, Charlat ML, Roberts RJ : The iron chelator desferrioxamine attenuates postischemic ventricular dysfunction. *Am. J. Physiol.* **1987**; 253: H1372-1380
- Braun OH : Über die infektionsverhütende Wirkung der Muttermilch und deren mögliche Ursachen. *Klin. Pädiat.* **1976**; 188: 297-310
- Britigan BE, Serody JS, Hayek MB, Charniga LM, Cohen MS : Uptake of lactoferrin by mononuclear phagocytes inhibits their ability to form hydroxyl radical and protects them from membrane autoperoxidation. *J. Immunol.* **1991**; 147: 4271-4277
- Brzezinska-Slebodzinska E, Miller JK, Quigley JD, Moore JR, Madsen FC : Antioxidant status of dairy cows supplemented prepartum with vitamin E and selenium. *J. Dairy Sci.* **1994**; 77: 3087-3095
- Bullen JJ, Rogers HJ, Leigh L : Iron-binding proteins in milk and resistance to E.coli infection in infants. *Br. Med. J.* **1972**; 1: 69-75
- Bullen CL, Tearle PV, Willis AT : Bifidobacteria in the intestinal tract of infants: an in-vivo study. *J. Med. Microbiol.* **1976**; 9: 325-333
- Buonocore G, Zani S, Sargentini I, Gioia D, Signorini C, Bracci R : Hypoxia-induced free iron release in the red cells of newborn infants. *Acta Paediatr.* **1998**; 87: 77-81
- Buonocore G, Perrone S, Longini M, Terzuoli I, Bracci R : Total hydroperoxide and advanced oxidation protein products in preterm hypoxic Babies. *Pediatric Research* **2000**; 47: 221-224
- Buonocore G, Perrone S, Longini M, Paffetti P, Vezzosi P, Gatti MG, Bracci R : Non protein bound iron as early predictive marker of neonatal brain damage. *Brain.* **2003**; 126: 1224-1230
- Burrin DG, Wang H, Heath J, Dudley MA : Orally administered lactoferrin increases hepatic protein synthesis in formula-fed newborn pigs. *Pediatr. Res.* **1996**; 40: 72-76
- Buss IH, Darlow BA, Winterbourn CC : Elevated protein carbonyls and lipid peroxidation products correlating with myeloperoxidase in tracheal aspirates from premature infants. *Pediatr. Res.* **2000**; 47: 640-645
- Butel MJ, Roland N, Hibert A, Popot F, Favre A, Tessedre AC, Bensaada M, Rimbault A, Szylit O : Clostridial pathogenicity in experimental necrotising enterocolitis in gnotobiotic quails and protective role of bifidobacteria. *J. Med. Microbiol.* **1998**; 47: 391-399

- Câmara LM, Carbonare SB, Silva ML, Carneiro-Sampaio MM : Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* [EPEC] adhesion to HeLa cells by human colostrum: detection of specific sIgA related to EPEC outer-membrane proteins. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1994**; 103: 307-310
- Caplan MS; Hedlund E, Adler L, Hsueh W : Role of asphyxia and feeding in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *Pediatr. Pathol.* **1994**; 14: 1017-1028
- Caplan MS, Miller-Catchpole R, Kaup S, Russell T, Lickerman M, Amer M, Xiao Y, Thomson R Jr. : Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology* **1999**; 117: 577-583
- Cazzola M, Huebers HA, Sayers MH, MacPhail AP, Eng M, Finch CA : Transferrin saturation, plasma iron turnover, and transferrin uptake in normal humans. *Blood.* **1985**; 66: 935-939
- Cerriotti F, Cerriotti G : Improved direct specific determination of serum iron and total iron-binding capacity. *Clin. Chem.* **1980**; 26: 327-331
- Chan DK, Lim MS, Choo SH, Tan IK : Vitamin E status of infants at birth. *J. Perinat. Med.* **1999**; 27: 395-398
- Cheeseman KH : Lipid peroxidation in biological systems. In: DNA and Free Radicals, ed. Halliwell B, Aruoma OI; London: Ellis Horwood Ltd. **1993**; pp:109-144
- Chen HW, Lii CK, Ou CC, Wong YC, Kuo BJ, Liu CH : Plasma vitamins A and E and red blood cell fatty acid profile in newborns and their mothers. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1996**; 50: 556-559
- Cherbut C : Motor effects of short-chain fatty acids and lactate in the gastrointestinal tract. *Proc. Nutr. Soc.* **2003**; 62: 95-99
- Ching S, Mahan DC, Ottobre JS, Dabrowski K : Ascorbic acid synthesis in fetal and neonatal pigs and in pregnant and postpartum sows. *Am. Soc. Nutr. Sci.* **2001**; 1997-2001
- Ciccoli L, Rossi V, Leoncini S, Signorini C, Paffetti P, Bracci R, Buonocore G, Comporti M : Iron release in erythrocytes and plasma non protein-bound iron in hypoxic and non hypoxic newborns. *Free Radical Research* **2003**; 37: 51-58
- Cochrane CG : Mechanisms of oxidant injury of cells. *Mol. Aspects Med.* 1991; 12: 137-147
- Comporti M, Signorini C, Buonocore G, Ciccoli L : Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. *Free Radical Biology & Medicine* **2002**; 32: 568-576
- Cohen MS, Mao H, Rasmussen GT, Serody JS, Britigan BE : Interaction of lactoferrin and lipopolysaccharide (LPS): Effects on the antioxidant property of lactoferrin and the ability of LPS to prime human neutrophils for enhanced superoxide formation. *J. Infect. Dis.* **1992**; 166: 1375-1378
- Crouch SP, Slater KJ, Fletcher J : Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin. *Blood* **1992**; 80: 235-240

- Cueva JP, Hsueh W : Role of oxygen derived free radicals in platelet activating factor induced bowel necrosis. *Gut*. **1988**; 29: 1207-1212
- D`Amore PA : Mechanisms of retinal and choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* **1994**; 35: 3974-3979
- Dani C, Biadaioli R, Bertini G, Martelli E, Rubaltelli FF : Probiotics feeding in prevention of urinary tract infection, bacterial sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Biology of the Neonate* **2002**; 82: 103-108
- Dani C, Martelli E, Bertini G, Pezzati M, Filippi L, Rossetti M, Rizutti G, Rubaltelli FF : Plasma bilirubin level and oxidative stress in preterm infants. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal. Ed.* **2003**; 88: F119-F123
- De Araújo AN, Giugliano LG : Lactoferrin and free secretory component of human milk inhibit the adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to HeLa cells. *BMC Microbiology* **2001**; 1: 25
- Debbabi H, Dubarry M, Rautureau M, Tome D : Bovine lactoferrin induces both mucosal and systemic immune response in mice. *J. Dairy Res.* **1998**; 65: 283-293
- De Curtis M, Paone C, Vetrano G, Romano G, Paludetto R, Ciccimarra F : A case control study of necrotizing enterocolitis occurring over 8 years in a neonatal intensive care unit. *Eur. J. Pediatr.* **1987**; 146: 398-400
- Decuypere J, Van der Heyde H : Study of the gastro-intestinal microflora of suckling piglets and early weaned piglets reared using different feeding systems. *Zbl. Bakt. Hyg. Orig. A* **1972**; 221: 492-510
- Delguste C, de Moffarts B, Sandersen C, Debrue M, Guyot H, Amory H : Serum vitamin E concentrations in a group of horses, with a high incidence of equine motor neuron disease. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **2002**, March, R3
- Demopoulos HD, Flamm ES, Petronigro DD, Seligman ML : The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta Physiol. Scand.* **1980**; 492: 91-119
- Dennery PA, McDonagh AF, Spitz DR, Rodgers PA, Stevenson DK : Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**; 19: 395-404
- Derksen FJ : Oxidant injury and nitric oxide: a role in exercise-induced pulmonary haemorrhage? *Vet. J.* **1997**; 153: 119-122
- Diplock AT : Antioxidants and disease prevention. In: Molecular Aspects of Medicine, ed. Baum H, Oxford and New York: Pergamon Press; **1994**, 15: 295-376
- Dorrepaal CA, Berger HM, Benders MJ, van Zoeren-Grobbe D, Van de Bor M, Van Bel F : Nonprotein-bound iron in postasphyxial reperfusion injury of the newborn. *Pediatrics* **1996**; 98: 883-889

- Edde L, Hipolito RB, Hwang FF, Headon DR, Shalwitz RA, Sherman MP : Lactoferrin protects neonatal rats from gut-related systemic infection. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2001**; 281: G1140-1150
- Ehrenkranz RA, Ablow RC, Warshaw JB : Prevention of bronchopulmonary dysplasia with vitamin E administration during the acute stages of respiratory distress syndrome. *J. Pediatr.* **1979**; 95: 873-878
- Eijsink VG, Axelsson L, Diep DB, Håvarstein LS, Holo H, Nes IF : Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek* **2002**; 81: 639-654
- Elass-Rochard E, Legrand D, Salmon V, Roseanu A, Trif M, Tobias PS, Mazurier J, Spik G : Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by competition with the lipopolysaccharide-binding protein. *Infect. Immun.* **1998**; 66: 486-491
- Ellison RT 3rd, Giehl TJ, LaForce FM : Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infect. Immun.* **1988**; 56: 2774-2781
- Ellison RT 3rd : The effects of lactoferrin on gram-negative bacteria. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1994**; 357: 71-90
- Engberg RM, Lauridsen C, Jensen SK, Jakobsen K : Inclusion of oxidized vegetable oil in broiler diets. Its influence on nutrient balance and on the antioxidative status of broilers. *Poult Sci* **1996**; 75: 1003-1011
- Erhard MH, Lösch U, Stangassinger M : Untersuchungen zur intestinalen Absorption von homologem und heterologem Immunglobulin G bei neugeborenen Kälbern. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaften* **1995**; 34: 160-163
- Evans PJ, Evans R, Kovar IZ, Holton AF, Halliwell B : Bleomycin-detectable iron in the plasma of premature and full-term neonates. *FEBS Letters* **1992**; 303: 210-212
- Fellman V, Raivio KO : Reperfusion injury as the mechanism of brain damage after perinatal asphyxia. *Pediatr. Res.* **1997**; 41: 599-606
- Finer NN, Peters KL, Schindler RF, Grant GD : Vitamin E and retrolental fibroplasia: prevention of serious ocular sequelae. *Ciba Found. Symp.* **1983**; 101: 147-164
- Flower RW, Blake DA : Retrolental fibroplasia: evidence for a role of the prostaglandin cascade in the pathogenesis of oxygen-induced retinopathy in the newborn beagle. *Pediatr. Res.* **1981**; 15: 1293-1302
- Frank L, Lewis PL, Sosenko IR : Dexamethasone stimulation of fetal rat lung antioxidant enzyme activity in parallel with surfactant stimulation. *Pediatrics.* **1985**; 75: 569-574
- Frank L, Sosenko IR : Prenatal development of lung antioxidant enzymes in four species. *J. Pediatr.* **1987**; 110: 106-110

- Frank L, Price LT, Whitney PL : Possible mechanism for late gestational development of the antioxidant enzymes in the fetal rat lung. *Biol. Neonate* **1996**; 70: 116-127
- Friel JK, Martin SM, Langdon M, Herzberg GR, Buettner GR : Milk from mothers of both premature and full-term infants provides better antioxidant protection than does infant formula. *Pediatric Research* **2002**; 51: 612-618
- Fu S, Gebicki S, Jessup W, Gebicki J, Dean RT : Biological fate of amino acid, peptide and protein hydroperoxides. *Biochemical Journal* **1995**; 311: 821-827
- Fuller R : Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **1989**; 66: 365-378
- Furll M, Sattler T, Dabbagh MN, Spielmann C, Furll B : Etiology and prophylaxis of reperfusion injuries. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschrift* **1999**; 106: 389-393
- Gerschman R, Gilbert DL, Nyl SW, Dwyer P, Fen WO : Oxygen poisoning and x-ray irradiation: a mechanism in common. *Science* **1954**; 119: 624-626
- Goldin BR, Gorbach SL : The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Am. J. Clin. Nutr.* **1984**; 39: 756-761
- Granger DN, Rutili G, McCord JM : Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology.* **1981**; 81: 22-29
- Granger DN : Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol.* **1988**; 255: H1269-1275
- Green SL, Bouley DM, Pinter MJ, Cork LC, Vatassery GT : Canine motor neuron disease: clinicopathologic features and selected indicators of oxidative stress. *J. Vet. Intern. Med.* **2001**; 15: 112-119
- Grisham MB : Role of reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease. *Curr. Opinion Gastroenterol.* **1993**; 9: 971-980
- Gupta A, Gupta A, Nigam D, Shukla GS, Agarwal AK : Profile of reactive oxygen species generation and antioxidative mechanisms in the maturing rat kidney. *J. Appl. Toxicol.* **1999**; 19: 55-59
- Gutteridge JMC, Stocks J : Caeruloplasmin: physiological and pathological perspectives. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **1981**; 14: 257-329
- Gutteridge JM, Rowley DA, Halliwell B : Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. Detection of „free“ iron in biological systems by using bleomycin-dependent degradation of DNA. *Biochem. J.* **1981a**; 199: 263-265
- Gutteridge JM, Paterson SK, Segal AW, Halliwell B : Inhibition of lipid peroxidation by the iron-binding protein lactoferrin. *Biochem. J.* **1981b**; 199: 259-261
- Gutteridge JM : Plasma ascorbate levels and inhibition of the antioxidant activity of caeruloplasmin. *Clin. Sci.* **1991**; 81: 413-417

- Halliwell B, Gutteridge JMC : Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and anti-oxidant therapy. *Lancet* **1984**; 1: 1396-1398
- Halliwell B, Gutteridge JMC : Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Methods Enzymol.* **1990**; 186: 1-85
- Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE : Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* **1992**; 119: 598-620
- Halliwell B : How to characterize an antioxidant: an update. *Biochem. Soc. Symp.* **1995**; 61: 73-101
- Halliwell B: Oxidative stress, nutrition and health. *Free Radical Research* **1996**; 25: 57-74
- Hansbrough F, Priebe CJ, Falterman KW, Bornside GH, Welsh RA : Pathogenesis of early necrotizing enterocolitis in the hypoxic neonatal dog. *The American Journal of Surgery* **1983**; 145: 169-175
- Harada E, Itoh Y, Sitizyo K, Takeuchi T, Araki Y, Kitagawa H : Characteristic transport of lactoferrin from the intestinal lumen into the bile via the blood in piglets. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **1999**; 124: 321-327
- Harisch G, Kretschmer M, Richter T, Pickel M : Investigations on the influence of copper succinate on the production of superoxide anion radicals by bovine small intestinal mucosa cells. *Zentralbl. Veterinärmedizin A* **1989**; 36: 576-584
- Heaton PR, Reed CF, Mann SJ, Ransley R, Stevenson J, Charlton CJ, Smith BH, Harper EJ, Rawlings JM : Role of dietary antioxidants to protect against DNA damage in adult dogs. *Am. Soc. Nutr. Sci.* **2002**; Suppl: 1720S-1724S
- Hernell O, Lonnerdal B : Iron status of infants fed low-iron formula: no effect of added bovine lactoferrin or nucleotides. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**; 76: 858-864
- Hilderbrand DC, Fahim Z, James E, Fahim M : Ceruloplasmin and alkaline phosphatase levels in cord serum of term, preterm and physiologically jaundiced neonates. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1974**; 118: 950-954
- Hidiroglou M : Mammary transfer of vitamin E in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **1989**; 72: 1067-1071
- Hittner HM, Godio LB, Rudolph AJ, Adams JM, Garcia-Prats JA, Friedman Z, Kautz JA, Monaco WA : Retrolental fibroplasia: efficacy of vitamin E in a double-blind clinical study of preterm infants. *N. Engl. J. Med.* **1981**; 305: 1365-1371
- Hoyos AB : Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* to neonates in an intensive care unit. *Int. J. Infect. Dis.* **1999**; 3: 197-202
- Hsueh W, Gonzalez-Crussi F, Arroyave JL : Platelet-activating factor-induced ischemic bowel necrosis. An investigation of secondary mediators in its pathogenesis. *Am. J. Pathol.* **1986**; 122: 231-239

- Hsueh W, Gonzalez-Crussi F, Arroyave JL : Sequential release of leukotrienes and norepinephrine in rat bowel after platelet-activating factor. A mechanistic study of platelet-activating factor-induced bowel necrosis. *Gastroenterology*. **1988**; 94: 1412-1418
- Hsueh W, Caplan MS, Qu XW, Tan XD, De Plaen IG, Gonzalez-Crussi F : Neonatal necrotizing enterocolitis: Clinical considerations and pathogenetic concepts. *Pediatric and Developmental Pathology* **2002**; 6: 6-23
- Hu WL, Mazurier J, Montreuil J, Spik G : Isolation and partial characterization of a lactotransferrin receptor from mouse intestinal brush border. *Biochemistry*. **1990**; 29: 535-541
- Huang L, Tan X, Crawford SE, Hsueh W : Platelet-activating factor and endotoxin induce tumour necrosis factor gene expression in rat intestine and liver. *Immunology*. **1994**; 83: 65-69
- Inanami O, Shiga A, Okada K, Sato R, Miyake Y, Kuwabara M : Lipid peroxides and antioxidants in serum of neonatal calves. *Am. J. Vet. Res.* **1999**; 60: 452-457
- Isolauri E, Kaila M, Mykkanen H, Ling WH; Salminen S : Oral bacteriotherapy for viral gastroenteritis. *Dig. Dis. Sci.* **1994**; 39: 2595-2600
- Iversen PO, Stokland A, Rolstad B, Benestad HB : Adrenaline-induced leucocytosis: recruitment of blood cells from rat spleen, bone marrow and lymphatics. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **1994**; 68: 219-227
- Jain SK : The neonatal erythrocyte and its oxidative susceptibility. *Semin. Hematol.* **1989**; 26: 286-300
- Jenkinson SG, Roberts RJ, DeLemos RA, Lawrence RA, Coalson JJ, King RJ, Null DM Jr., Gerstmann DR : Allopurinol-induced effects in premature baboons with respiratory distress syndrome. *J. Appl. Physiol.* **1991**; 70: 1160-1167
- Johanson B : Isolation of an iron-containing red protein from human milk. *Acta Chem. Scand.* **1960**; 14: 510-512
- Johnson L, Abbasi S, Bowen F, et al. : Does breast milk taurine protect against retinopathy of prematurity? *Pediatr. Res.* **1985**; 19: 347A
- Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, Abrams GD, Lucchesi BR : Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ. Res.* **1984**; 54: 277-285
- Joslin RS, Erickson PS, Santoro HM, Whitehouse NL, Schwab CG, Rejman JJ : Lactoferrin supplementation to dairy calves. *J. Dairy Sci.* **2002**; 85: 1237-1242
- Kaizu H, Sasaki M, Nakajima H, Suzuki Y : Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin E. *J. Dairy Sci.* **1993**; 76: 2493-2499
- Kanyshkova TG, Babina SE, Semenov DV, Isaeva N, Vlassov AV, Neustroev KN, Kul'minskaya AA, Buneva VN, Nevinsky GA : Multiple enzymic activities of human milk lactoferrin. *Eur. J. Biochem.* **2003**; 270: 3353-3361

- Kawamura T, Toyabe S, Moroda T, Iiai T, Takahashi-Iwanaga H, Fukada M, Watanabe H, Sekikawa H, Seki S, Abo T : Neonatal granulocytosis is a postpartum event which is seen in the liver as well as in the blood. *Hepatology*. **1997**; 26: 1567-1572
- Keli SO, Hertog GL, Feskens EJ, Kromhout D : Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and the incidence of stroke. *Arch. Int. Med.* **1996**; 154: 637-642
- Kiely M, Morrissey PA, Cogan PF, Kearney PJ : Low molecular weight plasma antioxidants and lipid peroxidation in maternal and cord blood. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1999**; 53: 861-864
- Kienzle E, Meyer H, Dammers C, Lohrie H : Milchaufnahme, Gewichtsentwicklung, Milchverdaulichkeit sowie Energie- und Nährstoffretention bei Saugwelpen. *Adv. An. Phys. Nutr.* **1985**; 16: 26-50
- Kienzle E, Landes E : Aufzucht verwaister Jungtiere. Teil I: Indikationsstellung und Zusammensetzung der Muttermilch. *Kleintierpraxis* **1995**; 40: 681-685
- Kievits F, Kijlstra A : Inhibition of C3 deposition on solid-phase bound immune complexes by lactoferrin. *Immunology*. **1985**; 54: 449-456
- Kinsey VE, Zacharia L : Retrorenal fibroplasia: incidence in different localities in recent years and correlation of incidence with treatment given infants. *J. Am. Med. Assoc.* **1949**; 139: 572-578
- Kirschvink N, Smith N, Fiévez L, Bougnet V, Art T, Degand G, Marlin D, Roberts C, Genicot B, Lindsey P, Lekeux P : Effect of chronic airway inflammation and exercise on pulmonary and systemic antioxidant status of healthy and heaves-affected horses. *Equine Vet. J.* **2002**; 34: 563-571
- Kitagawa H, Yoshizawa Y, Yokoyama T, Takeuchi T, Talukder MJ, Shimizu H, Ando K, Harada E : Persorption of bovine lactoferrin from the intestinal lumen into the systemic circulation via the portal vein and the mesenteric lymphatics in growing pigs. *J. Vet. Med. Sci.* **2003**; 65: 567-572
- Korhonen PA, Lilius EM, Hyypä S, Räsänen LA, Pösö AR : Production of reactive oxygen species in neutrophils after repeated bouts of exercise in standardbred trotters. *J. Vet. Med. A* **2000**; 47: 565-573
- Korpela R, Peuhkuri K, Lähteenmäki T, Sievi E, Saxelin M, Vapaatalo H : Lactobacillus rhamnosus GG shows antioxidative properties in vascular endothelial cell culture. *Milchwissenschaft* **1997**; 52: 503-505
- Kot E, Bezkorovainy A : Binding of ferric iron to the cell walls and membranes of Bifidobacterium thermophilum: Effect of free radicals. *J. Agric. Food Chem.* **1999**; 47: 4606-4610
- Kretzer FL, McPherson AR, Hittner HM : An interpretation of retinopathy of prematurity in terms of spindle cells: relationship to vitamin E prophylaxis and cryotherapy. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **1986**; 224: 205-214

- Kullisaar T, Zilmer M, Mikelsaar M, Vihalemm T, Annuk H, Kairane C, Kilk A : Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **2002**; 72: 215-224
- Kume S, Tanabe S : Effect of supplemental lactoferrin with ferrous iron on iron status of newborn calves. *J. Dairy Sci.* **1996**; 79: 459-464
- Kurose I, Yamada T, Wolf R, Granger DN : P-selectin-dependent leukocyte recruitment and intestinal mucosal injury induced by lactoferrin. *J. Leukoc. Biol.* **1994**; 55: 771-777
- Lahrssen M, Zentek J : Wirksamkeit von probiotischen Mikroorganismen als Futterzusatzstoff: Leitlinien zur Prüfung der Wirksamkeit von Mikroorganismen bei den Tierkategorien Hund, Katze und Pferd. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* **2002**; 109: 22-25
- Laur PF : Wirkung von Lactoferrin auf den Organismus neonataler Hundewelpen. *München, Diss. med. vet.* **2003**
- Law MR, Wijewardene K, Wald NJ : Is routine vitamin E administration justified in very low-birthweight infants? *Dev. Med. Child Neurol.* **1990**; 32: 442-450
- LeCrone CN : Absence of special fetal hemoglobin in beagle dogs. *Blood* **1970**; 35: 451-452
- Lee SR, Kwon KS, Kim SR, Rhee SG : Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **1998a**; 273: 15366-15372
- Lee WJ, Farmer JL, Hilty M, Kim YB : The protective effects of lactoferrin feeding against endotoxin lethal shock in germfree piglets. *Infection and Immunity* **1998b**; 66: 1421-1426
- Lee DJ, Drongowski RA, Coran AG, Harmon CM : Evaluation of probiotic treatment in a neonatal animal model. *Pediatr. Surg. Int.* **2000**; 16: 237-242
- Lee YM, Chen HR, Hsiao G, Streu JR, Wang JJ, Yen MH : Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo. *J. Pineal Res.* **2002**; 33: 72-80
- Lewenstein A, Frigerio G, Moroni M : Biological properties of SF68, a new approach for the treatment of diarrhoeal diseases. *Curr. Ther. Res.* **1979**; 26: 967-981
- Lidbeck A, Nord CE, Gustafsson JA, Rafter J : Lactobacilli, anticarcinogenic activities and human intestinal microflora. *Eur. J. Cancer Prev.* **1992**; 1: 341-353
- Lin MY, Yen CL : Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *J. Agric. Food Chem.* **1999**; 47: 1460-1466
- Lin MY, Chang FJ : Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Dig. Dis. Sci.* **2000**; 45: 1617-1622
- Lindeman JH, van Zoeren-Grobbe D, Schrijver J, Speek AJ, Poorthuis BJ, Berger HM : The total free radical trapping ability of cord blood plasma in preterm and term babies. *Pediatric Research* **1989**; 26: 20-24

- Lindeman JH, Houdkamp E, Lentjes EG, Poorthuis BJ, Berger HM : Limited protection against iron-induced lipid peroxidation by cord blood plasma. *Free Rad. Res. Comms.* **1992**; 16: 285-294
- Lindmark-Månsson H, Åkesson B : Antioxidative factors in milk. *British Journal of Nutrition* **2000**; 84 Suppl.1: S103-S110
- Link-Amster H, Rochat F, Saudan KY, Mignot O, Aeschlimann JM : Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **1994**; 10: 55-63
- Lofstedt J : White muscle disease of foals. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* **1997**; 13: 169-185
- Loudenslager MJ, Ku PK, Whetter PA, Ullrey DE, Whitehair CK, Stowe HD, Miller ER : Importance of diet of dam and colostrum to the biological antioxidant status and parenteral iron tolerance of the pig. *J. Anim. Sci.* **1986**; 63: 1905-1914
- Lucas A, Cole TJ : Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet.* **1990**; 336: 1519-1523
- Luo X, Sedlackova L, Belcastro R, Cabacungan J, Lye SJ, Tanswell AK : Effect of the 21-aminosteroid U74389G on oxygen-induced free radical production, lipid peroxidation, and inhibition of lung growth in neonatal rats. *Pediatr. Res.* **1999**; 46: 215-223
- Luukkainen P, Aejmelaeus R, Alho H, Metsä-Ketelä T, Ikonen SR, Salo MK : Plasma chain-breaking antioxidants in preterm infants with good and poor short-term outcome. *Free Rad. Res.* **1999**; 30: 189-197
- Macfarlane S, Macfarlane GT : Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc. Nutr. Soc.* **2003**; 62: 67-72
- MacLeay JM : Neonatal maladjustment syndrome. *J. Equine Vet. Sci.* **2000**; 20: 88-90
- Machnicki M, Zimecki M, Zagulski T : Lactoferrin regulates the tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 in vivo. *Int. J. Exp. Pathol.* **1993**; 74: 433-439
- Maisels MJ : Neonatal jaundice. *Semin. Liver Dis.* **1988**; 8: 148-162
- Majamaa H, Isolauri E, Saxelin M, Vesikari T : Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **1995**; 20: 333-338
- Marshall TA, Roberts RJ : In vitro and in vivo assessment of lipid peroxidation of infant nutrient preparations: Effect of nutrition on oxygen toxicity. *J. Am. Coll. Nutr.* **1990**; 9: 190-199
- Marshall RJ, Scott KC, Hill RC, Lewis DD, Sundstrom D, Jones GL, Harper J : Supplemental vitamin C appears to slow racing greyhounds. *Am. Soc. Nutr. Sci.* **2002**; Suppl.: 1616S-1621S
- Marteau PR, de Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeir J : Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**; 73 (Suppl): 430S-436S

- Masson PL, Heremans JF, Schonke E : Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J. Exp. Med.* **1969**; 130: 643-658
- Masson PL, Heremans JF : Lactoferrin in milk from different species. *Comp. Biochem. Physiol.* **1971**; 39B: 119-129
- Matsue M, Tomita S, Nyui S, Matuyama J, Kiyosawa I : Suppressive effects of lactoferrin on bleomycin-dependent DNA damage by the iron ion and ascorbate. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1994**; 58: 67-71
- Matsue M, Matsuyama J, Kiyosawa I : Interaction of lactoferrin with ascorbate and the relationship with bleomycin-dependent DNA damage. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1995**; 59: 358-362
- Matsuzaki T, Yamazaki R, Hashimoto S, Yokokura T : The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. *J. Dairy Sci.* **1998**; 81: 48-53
- Mattsby-Baltzer I, Roseanu A, Motas C, Elverfors J, Engberg I, Hanson LA : Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells. *Pediatr. Res.* **1996**; 40: 257-262
- McCord JM, Fridovich I : Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (haemocuprein). *J. Biol. Chem.* **1969**; 244: 6049-6055
- McElroy MC; Postle AD, Kelly FJ : Catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities of lung and liver human development. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**; 1117: 153-158
- Meyer H, Dammers C, Kienzle E : Körperzusammensetzung neugeborener Welpen und Nährstoffbedarf tragender Hündinnen. *Fortschr. Tierphysiol. Tierernährg.* **1985**; Beiheft 16: 7-25
- Meyer H, Heckötter E : Futterwerttabellen für Hunde und Katzen. 2.Auflage **1986**; Schlütersche Verlagsanstalt, Hannover.
- Millar MR, Bacon C, Smith SL, Walker V, Hall MA : Enteral feeding of premature infants with *Lactobacillus GG*. *Arch. Dis. Child.* **1993**; 69: 483-487
- Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska E, Madsen FC : Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J. Dairy Sci.* **1993a**; 76: 2812-2823
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A : A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science* **1993b**; 84: 407-412
- Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA : Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters* **1996**; 384: 240-242
- Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M : Cellular mechanisms of hypoxic injury in the developing brain. *Brain Res. Bull.* **1999**; 48: 233-238

- Mitsuoka T, Kimura N, Kobayashi A : Untersuchungen über die Zusammensetzung der Fäkalflora gesunder Hunde unter besonderer Berücksichtigung der Laktobazillen- und Bifidobakterienflora. *Zentralbl. Bakteriolog. Orig. A* **1976**; 235: 485-493
- Miyauchi H, Hashimoto S, Nakajima M, Shinoda I, Fukuwatari Y, Hayasawa H : Bovine lactoferrin stimulates the phagocytic activity of human neutrophils: identification of its active domain. *Cell. Immunol.* **1998**; 187: 34-37
- Moison RM, Palinckx JJ, Roest M, Houdkamp E, Berger HM : Induction of lipid peroxidation of pulmonary surfactant by plasma of preterm babies. *Lancet.* **1993**; 341: 79-82
- Molitor D : In-vitro- und In-vivo-Effekte eines Probiotikums (*Enterococcus faecium*) als Futterzusatz bei Hunden. *Hannover, Diss. med. vet.* **1996**
- Morata de Ambrosini V, Gonzalez S, de Ruiz Holgado AP, Oliver G : Study of the morphology of the cell walls of some strains of lactic acid bacteria and related species. *J. Food. Prot.* **1998**; 61: 557-562
- Mulherin D, Fitzgerald O, Bresnihan B : Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1996; 39: 115-124
- Mundt HC, Thomée A, Meyer H : Zur Energie- und Eiweißversorgung von Saugwelpen über die Muttermilch. *Kleintierpraxis* **1981**; 26: 353-360
- Niesman MR, Johnson KA, Penn JS : Therapeutic effect of liposomal superoxide dismutase in an animal model of retinopathy of prematurity. *Neurochem. Res.* **1997**; 22: 597-605
- Nagasako Y, Saito H, Tamura Y, Shimamura S, Tomita M : Iron-binding properties of bovine lactoferrin in iron-rich solution. *J. Dairy Sci.* **1993**; 76: 1876-1881
- Nichols BL, McKee K, Henry JF, Putman M : Human lactoferrin stimulates thymidine incorporation into DNA of rat crypt cells. *Pediatr. Res.* **1987**; 21: 563-567
- Niesman MR, Johnson KA, Penn JS : Therapeutic effect of liposomal superoxide dismutase in an animal model of retinopathy of prematurity. *Neurochem. Res.* **1997**; 22: 597-605
- Niki E : Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids* **1987**; 44: 227-253
- Nimmagudda R, Bagchi D, Bagchi M, Tran MX, Steijnsj J, Braun S : Cytoprotection by lactoferrin in oxygen radical mediated gastrointestinal injury. *Biochem. Arch.* **1999**; 15: 323-336
- Njeru CA, McDowell LR, Wilkinson NS, Linda SB, Williams SN : Pre- and postpartum supplemental DL- α -tocopheryl acetate effects on placental and mammary vitamin E transfer in sheep. *J. Anim. Sci.* **1994**; 72: 1636-1640
- Northway WH Jr., Rosan RC, Porter DY : Pulmonary disease following respirator therapy of myaline membrane disease: bronchopulmonary dysplasia. *N. Engl. J. Med.* **1967**; 276: 357-368

- Ogihara T, Okamoto R, Kim HS, Nagai A, Morinobu T, Moji H, Kamegai H, Hirano K, Ogihara H, Tamai H, Mino M : New evidence for the involvement of oxygen radicals in triggering neonatal chronic lung disease. *Pediatric Research* **1996**; 39: 117-119
- Ouwehand AC, Salminen SJ : The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *Int. Dairy Sci.* **1998**; 8: 749-758
- Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Shortt C, Salminen S : Probiotics: mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.* **1999**; 9: 43-52
- Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E : Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek.* **2002**; 82: 279-289
- Owens WC, Owens EU : Retroental fibroplasia in premature infants. II. Studies on the prophylaxis of the disease. The use of alphanaphthyl acetate. *Am. J. Ophthalmol.* **1949**; 32: 1631-1637
- Papparella A, DeLuca FG, Oyer CE, Pinar H, Stonestreet BS : Ischemia-reperfusion injury in the intestines of newborn pigs. *Pediatr. Res.* **1997**; 42: 180-188
- Pasupathy K, Sahoo A, Pathak NN : Effect of lactobacillus supplementation on growth and nutrient utilization in mongrel pups. *Arch. Anim. Nutr.* **2001**; 55: 243-253
- Penn JS : Oxygen-induced retinopathy in the rat: possible contribution of peroxidation reactions. *Doc. Ophthalmol.* **1990**; 74: 179-186
- Penn SJ, Tolman BL, Bullard LE : Effect of a water-soluble vitamin E analog, Trolox C, on retinal vascular development in an animal model of retinopathy of prematurity. *Free Rad. Biol. Med.* **1997**; 22: 977-984
- Perdigón G, de Macías ME, Alvarez S, Oliver G, de Ruiz Holgado AA : Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infect. Immun.* **1986**; 53: 404-410
- Persijn JP, Van der Slik W, Riethorst A : Determination of serum iron and latent iron-binding capacity (LIBC). *Clin. Chim. Acta* **1971**; 35: 91-98
- Phuapradit P, Varavithya W, Vathanophas K, Sangchai R, Podhipak A, Suthutvoravut U, Nopchinda S, Chantraruksa V, Haschke F : Reduction of rotavirus infection in children receiving bifidobacteria-supplemented formula. *J. Med. Assoc. Thai.* **1999**; 82 Suppl. 1: S43-S48
- Pitkanen OM, Hallman M, Andersson SM : Correlation of free oxygen radical-induced lipid peroxidation with outcome in very low birth weight infants. *J. Pediatr.* **1990**; 116: 760-764
- Pitt J, Barlow B, Heird WC : Protection against experimental necrotizing enterocolitis by maternal milk. I. Role of milk leucocytes. *Pediatr. Res.* **1977**; 11: 906-909
- Pollmann DS, Danielson DM, Peo ER Jr. : Effects of microbial feed additives on performance of starter and growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* **1980**; 51: 577-582

- Powers HJ, Loban A, Silvers K, Gibson AT : Vitamin C concentrations observed in premature babies inhibits the ferroxidase activity of caeruloplasmin. *Free Rad. Res.* **1995**; 22: 57-65
- Qu XW, Rozenfeld RA, Huang W, Bulkley GB, Hsueh W : The role of xanthine oxidase in platelet activating factor induced intestinal injury in the rat. *Gut.* **1999**; 44: 203-211
- Raghuveer TS, McGuire EM, Martin SM, Wagner BA, Rebouché CJ, Buettner GR, Widness JA : Lactoferrin in the preterm infants' diet attenuates iron-induced oxidation products. *Pediatric Research* **2002**; 52: 964-972
- Reiter RJ, Tan DX : Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovascular Research* **2003**; 58: 10-19
- Rhee SG, Chang TS, Bae YS, Lee SR, Kang SW : Cellular regulation by hydrogen peroxide. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2003**; 14 Suppl 3: S211-S215
- Rice-Evans C, Miller NJ : Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology* **1994**; 234: 279-293
- Rinkinen M, Jalava K, Westermarck E, Salminen S, Ouwehand AC : Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization? *Veterinary Microbiology* **2003**; 92: 111-119
- Robblee ED, Erickson PS, Whitehouse NL, McLaughlin AM, Schwab CG, Rejman JJ, Rompala RE : Supplemental lactoferrin improves health and growth of Holstein calves during the preweaning phase. *J. Dairy Sci.* **2003**; 86: 1458-1464
- Robinson K, Stewart CA, Pye QN, Nguyen X, Kenney L, Salsman S, Floyd RA, Hensley K: Redox sensitive protein phosphatase activity regulates the phosphorylation state of p38 protein kinase in primary astrocyte culture. *J. Neurosci. Res.* **1999**; 55: 724-732
- Robles R, Palomino N, Robles A : Oxidative stress in neonate. *Early Human Development* **2001**; 65 Suppl. S75-S81
- Rogers S, Witz G, Anwar M, Hiatt M, Hegyi T : Antioxidant capacity and oxygen radical diseases in the preterm newborn. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **2000**; 154: 544-548
- Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ, Valdivia-Velázquez M, Martínez-Barboza G, Acosta-Martínez JP, Ortiz GG : Orally administered melatonin reduces oxidative stress and proinflammatory cytokines induced by amyloid- β peptide in rat brain: a comparative, in vivo study versus vitamin C and E. *J. Pineal Res.* **2003**; 35: 80-84
- Rosenfeld W, Evans H, Concepcion L, Jhaveri R, Schaeffer H, Friedman A : Prevention of bronchopulmonary dysplasia by administration of bovine superoxide dismutase in preterm infants with respiratory distress syndrome. *J. Pediatr.* **1984**; 105: 781-785
- Rossdale PD, Burguez PN, Cash RS : Changes in blood neutrophil/lymphocyte ratio related to adrenocortical function in the horse. *Equine Vet. J.* **1982**; 14: 293-298
- Roth FX, Kirchgessner M : Zur nutritiven Wirksamkeit von Streptococcus faecium (Stamm M 74) in der Ferkelaufzucht. *Landwirtsch. Forsch.* **1986**; 39: 198-205

- Rowland IR, Rumney CJ, Coutts JT, Lievens LC : Effect of Bifidobacterium longum and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*. **1998**; 19: 281-285
- Ryan TP, Aust SD : The role of iron in oxygen-mediated toxicities. *Crit. Rev. Toxicol.* **1992**; 22: 119-141
- Saavedra JM, Bauman NA, Oung I, Perman JA, Yolken RH : Feeding of Bifidobacterium bifidum and Streptococcus thermophilus to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* **1994**; 344: 1046-1049
- Sakata T, Kojima T, Fujieda M, Miyakozawa M, Takahashi M, Ushida K : Probiotic preparations dose-dependently increase net production rates of organic acids and decrease that of ammonia by pig cecal bacteria in batch culture. *Dig. Dis. Sci.* **1999**; 44: 1485-1493
- Saldanha RL, Cepeda EE, Poland RL : The effect of vitamin E prophylaxis on the incidence and severity of bronchopulmonary dysplasia. *J. Pediatr.* **1982**; 101: 89-93
- Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, Lee YK : Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science & Technology* **1999**; 10: 107-110
- Sanders JW, Leenhouts KJ, Haandrikman AJ, Venema G, Kok J : Stress response in Lactococcus lactis: Cloning, expression analysis and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. *J. Bacteriol.* **1995**; 177: 5254-5260
- Sanford HN, Root JH, Graham RH : The premature infant. *Pediatrics* **1951**; 8: 431
- Satué-Gracia MT, Frankel EN, Rangavajhyala N, German JB : Lactoferrin in infant formulas: Effect on oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **2000**; 48: 4984-4990
- Saugstad OD, Aasen AO : Plasma hypoxanthine levels as a prognostic aid of tissue hypoxia. *Eur. Surg. Res.* **1980**; 12: 123-129
- Saugstad OD : Hypoxanthin as an indicator of hypoxia: Its role in health and disease through free radical production. *Pediatric Research* **1988**; 23: 143-150
- Saugstad OD : Oxygen toxicity in the neonatal period. *Acta Paediatr. Scand.* **1990**; 79: 881-892
- Saugstad OD : Update on oxygen radical disease in neonatology. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **2001**; 13: 147-153
- Schaffer DB, Johnson L, Quinn GE, Weston M, Bowen FW Jr. : Vitamin E and retinopathy of prematurity. Follow-up at one year. *Ophthalmology*. **1985**; 92: 1005-1011
- Schiffirin EJ, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann JM, Donnet-Hughes A : Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **1995**; 78: 491-497

- Schmidt H, Grune T, Muller R, Siems WG, Wauer RR : Increased levels of lipid peroxidation products malondialdehyde and 4-hydroxynonenal after perinatal hypoxia. *Pediatr. Res.* **1996**; 40: 15-20
- Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA : Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-reponsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic. Res. Commun.* **1992**; 17: 221-237
- Schrod L, Neuhaus T, Speer CP, Girschick H : Possible role of uric acid as an antioxidant in premature infants. *Biol. Neonate* **1997**; 72: 102-111
- Schüep W, Vuilleumier JP, Gysel D, Hess D : Determination of ascorbic acid in body fluids, tissues and feedstuffs. In: Proceedings of workshop on ascorbic acid in domestic animals. Wegger I, Tagwerker FJ, Moustgaard J (Eds.). The Royal Danish Agricultural Society, Copenhagen **1984**; pp 50-55
- Schumm H, Pohl R, Willeke H : Ergebnisse des Einsatzes von Suiferm bei Absatzferkeln mit Durchfällen zur Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der gesunden Darmflora. *Tierärztl. Umschau* **1990**; 45: 402-411
- Schweigert FJ, Buchholz I, Bonitz K : Effect of age on the levels of retinol and retinyl esters in blood plasma, liver and kidney of dogs. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **1998**; 68: 237-241
- Scott PH, Berger HM, Kenward C, Scott P, Wharton BA : Effect of gestational age and intrauterine nutrition on plasma transferrin and iron in the newborn. *Arch. Dis. Child.* **1975**; 50: 796-798
- Sevanian A, Davies KJA, Hochstein P : Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* **1991**; 54: 1129S-1134S
- Shadid M, Van Bel F, Steendijk P, Dorrepaal CA, Moison R, Van der Velde ET, Baan J : Effect of deferoxamine on post-hypoxic-ischemic reperfusion injury of the newborn lamb heart. *Biology of the Neonate* **1999a**; 75: 239-249
- Shadid M, Van Bel F, Steendijk P, Dorrepaal CA, Moison R, Van der Velde ET, Baan J : Pretreatment with allopurinol in cardiac hypoxic-ischemic reperfusion injury in newborn lambs exerts its beneficial effect through afterload reduction. *Basic Res. Cardiol.* **1999b**; 94: 23-30
- Shah RS, Rajalakshmi R, Bhatt RV, Hazra MN, Patel BC, Swamy NB, Patel TV : Vitamin E status of the newborn in relation to gestational age, birth weight and maternal vitamin E status. *Br. J. Nutr.* **1987**; 58: 191-198
- Shen JG, Quo XS, Jiang B, Li M, Xin W, Zhao BL : Chinonin, a novel drug against cardiomyocyte apoptosis induced by hypoxia and reoxygenation. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**; 1500: 217-226
- Shimamura S, Abe F, Ishibashi N, Miyakawa H, Yaeshima T, Araya T, Tomita M : Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of Bifidobacterium Species. *J. Dairy Sci.* **1992**; 75: 3296-3306

- Shimizu K, Matsuzawa H, Okada K, Tazume S, Dosako S, Kawasaki Y, Hashimoto K, Koga Y : Lactoferrin-mediated protection of the host from murine cytomegalovirus infection by a T-cell-dependent augmentation of natural killer cell activity. *Arch. Virol.* **1996**; 141: 1875-1889
- Shinmoto H, Dosako S, Nakajima I : Anti-oxidant activity of bovine lactoferrin on iron/ascorbate induced lipid peroxidation. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1992**; 56: 2079-2080
- Sies, H, ed.: Oxidative stress, oxidants and antioxidants. London and New York Academic Press **1991**
- Sies H : Oxidative stress: from basic research to clinical application. *American Journal of Medicine* **1991a**; 91: 31S-39S
- Siigur U, Tamm E, Torm S, Lutsar I, Salminen S, Midtvedt T : Effect of bacterial infection and administration of a probiotic on faecal short-chain fatty acids. *Microbial Ecology in Health and Disease* **1996**; 9: 271-277
- Silvers KM, Gibson AT, Powers HJ : High plasma vitamin C concentrations at birth associated with low antioxidant status and poor outcome in premature infants. *Archives of Disease in Childhood* **1994**; 71: F40-F44
- Simonian NA, Coyle JT : Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology* **1996**; 36: 83-106
- Skoumalova A, Rofina J, Schwippelova Z, Gruys E, Wilhelm J : The role of free radicals in canine counterpart of senile dementia of the Alzheimer type. *Exp. Gerontol.* **2003**; 38: 711-719
- Slaviková M, Lódinová-Zadníková R, Adlerberth I, Hanson LÅ, Svanborg C, Wold AE : Increased mannose-specific adherence and colonizing ability of Escherichia coli O83 in breastfed infants. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1995**; 371A : 421-423
- Smith HW : The development of the flora of the alimentary tract in young animals. *J. Path. Bact.* **1965**; 90: 495-513
- Stark PL, Lee A : The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *J. Med. Microbiol.* **1982**; 15: 189-203
- Steinwender G, Schimpl G, Sixl B, Kerbler S, Ratschek M, Kilzer S, Hollwarth ME, Wenzl HH : Effect of early nutritional deprivation and diet on translocation of bacteria from the gastrointestinal tract in the newborn rat. *Pediatr. Res.* **1996**; 39: 415-420
- Still J, Delahaut P, Coppe P, Kaeckenbeeck A, Perraudin JP : Treatment of induced enterotoxigenic colibacillosis (scours) in calves by the lactoperoxidase system and lactoferrin. *Ann. Rech. Vet.* **1990**; 21: 143-152
- Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN : Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* **1987**; 235: 1043-1046

- Stohrer M, Lutz S, Stangassinger M : Antioxidativer Status von Neugeborenen und Jungtieren. In: Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier. Schubert R (Hrsg.). 8. Symposium 26./27. Sept. **2001** Jena/Thüringen: 361-364
- Sullivan JL : Iron, plasma antioxidants, and the 'Oxygen Radikal Disease of Prematurity'. *AJDC* **1988**; 142: 1341-1344
- Sullivan JL, Newton RB : Serum antioxidant activity in neonates. *Archives of Disease in Childhood* **1988**; 63: 748-757
- Sun XM, Hsueh W : Platelet-activating factor produces shock, in vivo complement activation, and tissue injury in mice. *J. Immunol.* **1991**; 147: 509-514
- Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans FJ, Irani K, Finkel T: Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* **1995**; 270: 296-299
- Supnet MC, David-Cu R, Walther FJ : Plasma xanthine oxidase activity and lipid hydroperoxide levels in preterm infants. *Pediatr. Res.* **1994**; 36: 283-287
- Surawicz CM, Elmer GW, Speelman P, McFarland LV, Chinn J, van Belle G : Prevention of antibiotic associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. *Gastroenterology* **1989**; 96: 981-988
- Talukder MJ, Takeuchi T, Harada E : Characteristics of lactoferrin receptor in bovine intestine: higher binding activity to the epithelium overlying Peyer's patches. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* **2003**; 50: 123-131
- Teraguchi S, Shin K, Ozawa K, Nakamura S, Fukuwatari Y, Tsuyuki S, Namihira H, Shimamura S : Bacteriostatic effect of orally administered bovine lactoferrin on proliferation of *Clostridium* species in the gut of mice fed bovine milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**; 61: 501-506
- Terry TL : Extreme prematurity and fibroplastic overgrowth of persistent vascular sheath behind each crystalline lens. I. Preliminary report. *Am. J. Ophthalmol.* **1942**; 25: 203-204
- Thomas DG, Miller JK, Mueller FJ, Holmes CR, Madsen FC : Daily supplementation of dairy cows with 1,000 IU vitamin E for 6 wk before calving reduced placental retention by almost 60 %. *J. Dairy Sci.* **1990**; 73 (Suppl. 1): 166 (abstr.)
- Thomas DG, Miller JK, Mueller FJ, Erickson BH, Madsen FC : Effects of vitamin E and iron supplementation on progesterone and estrogen concentrations in relation to retained placenta. *J. Dairy Sci.* **1992**; 75 (Suppl. 1): 244 (abstr.)
- Tomita M, Takase M, Wakabayashi H, Bellamy W : Antimicrobial peptides of lactoferrin. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1994**; 357: 209-218
- Tripathi Y, Hegde BM, Rai YS, Raghuveer CV : Effect of N-2-mercaptopropionylglycine in limiting myocardial reperfusion injury following 90 minutes of ischemia in dogs. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **2000**; 44: 290-296

- Turek JJ, Watkins BA, Schoenlein IA, Allen KG, Hayek MG, Aldrich CG : Oxidized lipid depresses canine growth, immune function, and bone formation. *J. Nutr. Biochem.* **2003**; 14: 24-31
- Turrens JF, Freeman BA, Levitt JG, Crapo JD : The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch. Biochem. Biophys.* **1982a**; 217: 401-410
- Turrens JF, Freeman BA, Capro JD : Hyperoxia increases H₂O₂ release by lung mitochondria and microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **1982b**; 217: 411-421
- Turrens JF, Crapo JD, Freeman BA : Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. *J. Clin. Invest.* **1984**; 73: 87-95
- Unsöld E : Modell der mutterlosen Aufzucht von Hundewelpen zur Wirksamkeitsprüfung probiotischer Substanzen. *München, Diss. med. vet.* **2003**
- Van der Strate BW, Beljaars L, Molema G, Harmsen MC, Meijer DK : Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Research* **2001**; 52: 225-239
- Van Winden SC, Kuiper R : Congenital white muscle disease in a Belgian blue calf. *Tijdschr. Diergeneeskd.* **2002**; 127: 74-77
- Van Zoeren-Grobbe D, Lindeman JH, Houdkamp E, Brand R, Schrijver J, Berger HM : Postnatal changes in plasma chain-breaking antioxidants in healthy infants fed formula and / or human milk. *Am. J. Clin. Nutr.* **1994**; 60: 900-906
- Van Zoeren-Grobbe D, Moison RM, Ester WM, Berger HM : Lipid peroxidation in human milk and infant formulas: effect of storage, tube feeding and exposure to phototherapy. *Acta Paediatr.* **1993**; 82: 645-649
- Verdejo C, Marco P, Renau-Piqueras J, Pinazo-Duran MD : Lipid peroxidation in proliferative vitreoretinopathies. *Eye.* **1999**; 13: 183-188
- Von Engelhardt W, Bartels J, Kirschberger S, Meyer zu Düttingdorf H, Busche R : Role of short-chain fatty acids in the hind gut. *Veterinary Quarterly* **1998**; S52-S59
- Voogd A, Sluiter W, van Eijk HG, Koster JF : Low molecular weight iron and the oxygen paradox in isolated rat hearts. *Clin. Invest.* **1992**; 90: 2050-2055
- Vorobjeva L : Physiological peculiarities of propionibacteria – present facts and prospective applications. *Sci. Prog.* **2000**; 83: 277-301
- Weese JS, Anderson ME, Lowe A, Monteith GJ : Preliminary investigation of the probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in horses: fecal recovery following oral administration and safety. *Can. Vet. J.* **2003**; 44: 299-302
- Wakabayashi H, Matsumoto H, Hashimoto K, Teraguchi S, Takase M, Hayasawa H : Inhibition of iron/ ascorbate-induced lipid peroxidation by an N-terminal peptide of bovine lactoferrin and its acylated derivatives. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**; 63: 955-957

- Wakabayashi H, Takakura N, Teraguchi S, Tamura Y : Lactoferrin feeding augments peritoneal macrophage activities in mice intraperitoneally injected with inactivated *Candida albicans*. *Microbiol. Immunol.* **2003**; 47: 37-43
- Wang WP, Iigo M, Sato J, Sekine K, Adachi I, Tsuda H : Activation of intestinal mucosal immunity in tumor-bearing mice by lactoferrin. *Jpn. J. Cancer Res.* **2000**; 91: 1022-1027
- Ward PP, Mendoza-Meneses M, Cunningham GA, Conneely OM : Iron status in mice carrying a targeted disruption of lactoferrin. *Mol. Cell. Biol.* **2003**; 23: 178-185
- Weiss M : Wirkung von *Enterococcus faecium* auf den Organismus neonataler Hundewelpen. *München, Diss. med. vet.* **2003**
- Wiedemann M, Kontush A, Finckh B, Hellwege HH, Kohlschütter A : Neonatal blood plasma is less susceptible to oxidation than adult plasma owing to its higher content of bilirubin and lower content of oxidizable fatty acids. *Pediatric Research* **2003**; 53: 843-849
- Wilkins PA : Hypoxic ischemic encephalopathy: Neonatal Encephalopathy. In: Recent advances in equine neonatal care. Wilkins PA, Palmer JE (Eds.). Publisher: *International Veterinary Information Service* (www.ivis.org) **2003**; PDF
- Winterbourn CC, Chain T, Buss H, Inder TE, Mogridge N, Darlow BA : Protein carbonyls and lipid peroxidation products as oxidation markers in preterm infant plasma: associations with chronic lung disease and retinopathy and effects of selenium supplementation. *Pediatric Research* **2000**; 48: 84-90
- Wiseman H, Halliwell B : Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal* **1996**; 313: 17-29
- Wold AE, Adlerberth I : Breast feeding and the intestinal microflora of the infant--implications for protection against infectious diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2000**; 478: 77-93
- Wright SW, Filer LJ Jr., Mason KE : Vitamin E blood levels in premature and full term infants. *Pediatrics* **1951**; 7: 386
- Wunderlich PF, Braun L, Fumagalli I, D'Apuzzo V, Heim F, Karly M, Lodi R, Politta G, Vonbank F, Zeltner L : Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing *Enterococcus SF68* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and in the treatment of acute diarrhoea. *J. Int. Med. Res.* **1989**; 17: 333-338
- Yajima M, Nakayama M, Hatano S, Yamazaki K, Aoyama Y, Yajima T, Kuwata T : Bacterial translocation in neonatal rats: the relation between intestinal flora, translocated bacteria, and influence of milk. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2001**; 33: 592-601
- Zagulski T, Lipiński P, Zagulska A, Broniek S, Jarzabek Z : Lactoferrin can protect mice against a lethal dose of *Escherichia coli* in experimental infection *in vivo*. *Br. J. Exp. Path.* **1989**; 70: 697-704
- Zanker IA, Hammon HM, Blum JW : Beta-carotene, retinol and alpha-tocopherol status in calves fed the first colostrum at 0-2, 6-7, 12-13 or 24-25 hours after birth. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **2000**; 70: 305-310

Zentek J, Molitor D, Kamphues J : Prüfung intestinaler Effekte eines Probiotikums (Enterococcus faecium) bei Hunden. *Kleintierpraxis* **1998**; 43: 187-197

Zentek J, Hall EJ, German A, Haverson K, Bailey M, Rolfe V, Butterwick R, Day MJ : Morphology and immunopathy of the small and large intestine in dogs with nonspecific dietary sensitivity. *J. Nutr.* **2002**; 132: 1652S-1654S

Zhang P, Sawicki V, Lewis A, Hanson L, Nuijens JH, Neville MC : Human lactoferrin in the milk of transgenic mice increases intestinal growth in ten-day-old suckling neonates. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2001**; 501: 107-113

Zimecki M, Mazurier J, Machnicki M, Wieczorek Z, Montreuil J, Spik G : Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4- CD8- murine thymocytes. *Immunol. Lett.* **1991**; 30: 119-123

Zimecki M, Mazurier J, Spik G, Kapp JA : Human lactoferrin induces phenotypic and functional changes in murine splenic B cells. *Immunology.* **1995**; 86: 122-127

Zimecki M, Spiegel K, Wlaszczyk A, Kubler A, Kruzel ML : Lactoferrin increases the output of neutrophil precursors and attenuates the spontaneous of TNF-alpha and IL-6 by peripheral blood cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **1999**; 47: 113-118

I Anhang

1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABTS	2, 2'- azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
AMP	Adenosinmonophosphat
AST	Aspartataminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
B.	Bifidobacterium
C.	Campylobacter
CD	cluster of differentiation
cfu	colony forming units
CK	Creatinkinase
Cl.	Clostridium
CLD	chronic lung disease
DNA	deoxyribonucleic acid
E.	Escherichia
Ec.	Enterococcus
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
GALT	gut associated lymphoid tissue
GSH	Glutathionsulphydryl, reduzierte Form
GSSG	Glutathiondisulfid, oxidierte Form
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	high performance liquid chromatography
hSa	humanes Serumalbumin
HX	Hypoxanthin
IE	Internationale Einheit
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KbE	Kolonie bildende Einheit
KGW	Körpergewicht

Lb.	Lactobacillus
LEBK	latente Eisenbindungskapazität
Lf	Lactoferrin
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
Lnn.	Lymphonodi
LPS	Lipopolysaccharide
MAT	Milchaustauscher
NEC	Nekrotisierende Enterocolitis
NPBI	non protein-bound iron
$O_2^{\bullet -}$	Superoxid-Radikal-Anion
OH^{\bullet}	Hydroxyl-Radikal
p.a.	pro analysi
PAF	plättchenaktivierender Faktor
PBS	phosphate buffered saline
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
RNA	ribonucleic acid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Sc.	Streptococcus
SOD	Superoxid-Dismutase
spp.	species
TAA	total antioxidant activity
Tab.	Tabelle
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances
TEAC	trolox equivalent antioxidant capacity
TEBK	totale Eisenbindungskapazität
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAP	total radical trapping antioxidant parameter
TS	Trockensubstanz
U/min	Umdrehungen pro Minute
uS	ursprüngliche Substanz

2 Tabellen - und Abbildungsverzeichnis

	Seite
Tab. 1: Einteilung der Welpen in die Versuchsgruppen des Lactoferrin-Versuchs	55
Tab. 2: Einteilung der Welpen in die Versuchsgruppen des <i>Ec. faecium</i> -Versuchs	56
Tab. 3: Zusammensetzung des verwendeten Milchaustauschers	58
Tab. 4: Nährstoffgehalt des Milchaustauschers	58
Tab. 5: Zusammensetzung des Trockenfutters für Hundewelpen	60
Tab. 6: Zusammensetzung des Feuchtfutters	61
Tab. 7: Antioxidativer Status von Lactoferrin-, Probiotikum- und Mutteraufzucht-Welpen	87
Tab. 8: Einfluss von Lactoferrin auf den antioxidativen Status von Hundewelpen	88
Tab. 9: Einfluss von Lactoferrin auf den antioxidativen Status von Hundewelpen	89
Tab. 10: Vitamin E- Konzentrationen im Plasma der Welpen des Lactoferrin-Versuchs	91
Tab. 11: Vitamin E- Konzentrationen im Plasma der Welpen des <i>Ec. faecium</i> -Versuchs	92
Tab. 12: Latente Eisenbindungskapazität, Gesamteisenkonzentration, totale Eisenbindungskapazität und Transferrinsättigung im Serum der Mutteraufzucht-Welpen	95
Abb. 1: Antioxidativer Status der Hundewelpen	86
Abb. 2: Antioxidativer Status von Lactoferrin-, Probiotikum- und Mutteraufzucht-Welpen	102
Abb. 3: Vitamin E- Konzentrationen von Lactoferrin-, Probiotikum- und Mutteraufzucht-Welpen	108

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W.A. Rambeck für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung und tatkräftige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. M. Stohrer für die Erstellung des Versuchskonzepts und die Betreuung der labortechnischen Arbeiten bedanken.

Marco Weiss danke ich ganz herzlich für die nette Zusammenarbeit bei der Aufzucht der Welpen und seine jederzeit gern gewährte Hilfe.

Ein großer Dank geht an Sieglinde Lutz, die durch ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Stephanie Porzig möchte ich für die liebevolle Betreuung von Laska danken. Die Blutspende von Luzie war mit eine entscheidende Hilfe.

Uli Wehr danke ich für die Betreuung und die große Hilfestellung bei der Durchführung der Welpenversuche.

Bei allen Pflegern der GSF, insbesondere Gustl, Sabine, Doris und Herrn Wenig, möchte ich mich sehr herzlich für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Mutteraufzucht-Welpen bedanken.

Außerdem danke ich Vera Rettenmaier, die mir durch ihre hervorragenden Englischkenntnisse bei der Übersetzung der Zusammenfassung sehr geholfen hat.

Bei der Studienstiftung des deutschen Volkes möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung dieser Dissertation recht herzlich bedanken.

Lebenslauf

Name: Julia Schwarzer

Geburtsdatum: 28.06.1977

Geburtsort: Frankfurt a. Main

Staatsangehörigkeit: deutsch

Eltern: Ingrid R. Schwarzer, geb. Lange (geb. 18.10.1945)
Dr. Michael Schwarzer (geb. 26.07.1938)

Schulischer Werdegang: 1983 – 1987 Grundschule in Königstein i.Ts.
1987 – 1989 Gymnasium St. Angela in Königstein i.Ts.
1989 – 1996 Gymnasium in der Taus in Backnang
21.06. 1996 Allgemeine Hochschulreife

Studium: 1996 – 2002 Studium der Veterinärmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
26.02. 2002 Staatsexamen

Approbation als Tierärztin: 15.04. 2002

Beginn der Dissertation: Mai 2002 am Institut für Physiologie, Physiologische
Chemie und Tierernährung der Tierärzt-
lichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München.