

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 der Leitung von

Prof. Dr. W. A. Rambeck

**Lactoferrin-Supplementierung bei neonatalen Hundewelpen –
Wirkung auf Immunsystem und Blutbild**

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

von

Silke Regulski

aus München

München 2005

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent:	Prof. Dr. W. Rambeck
1. Korreferentin:	Priv.-Doz. Dr. A. Fischer
2. Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. T. Göbel

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	14
2	Literatur	16
2.1	Immunologisch wirksame Nahrungsergänzungstoffe	16
2.1.1	Einführung	16
2.1.2	Vitamine, Provitamine, Antioxidanzien	17
2.1.2.1	Definition und Vorkommen.....	17
2.1.2.2	Beispiele für Vitamine, Provitamine und Antioxidanzien in der Tierernährung und deren Wirkung.....	18
2.1.2.3	Anwendung in der Human- und Tiermedizin	24
2.1.3	Spurenelemente	25
2.1.3.1	Definition und Vorkommen.....	25
2.1.3.2	Wirkung.....	25
2.1.3.3	Anwendung in der Human- und Tiermedizin	26
2.1.4	Andere immunologisch wirksame Nahrungsergänzungstoffe	27
2.1.4.1	Definition und Vorkommen.....	27
2.1.4.2	Wirkung und Anwendung in der Human- und Tiermedizin.....	27
2.1.5	Probiotika	28
2.1.5.1	Definition und Vorkommen.....	28
2.1.5.2	Wirkung.....	29
2.1.5.3	Anwendung in der Human- und Tiermedizin	31
2.1.6	Prebiotika, Synbiotika.....	32
2.1.6.1	Definition und Vorkommen.....	32
2.1.6.2	Wirkung.....	33
2.1.6.3	Anwendung in der Tiermedizin.....	35
2.1.7	Lactoferrin – eine prebiotisch wirksame Substanz	36
2.1.7.1	Biochemische Struktur und natürliches Vorkommen.....	36
2.1.7.2	Metabolismus von Lactoferrin:	38
2.1.7.3	Wirkung.....	39

2.1.7.3.1	Beeinflussung des Eisen-Metabolismus	39
2.1.7.3.2	Antimikrobielle Wirkung	40
2.1.7.3.2.1	Antibakterielle Wirkung.....	40
2.1.7.3.2.2	Hemmung der bakteriellen Adhäsion	41
2.1.7.3.2.3	Antivirale Wirkung	42
2.1.7.3.2.4	Antiprotozoische Wirkung.....	43
2.1.7.3.2.5	Antimykotische Eigenschaften	43
2.1.7.3.3	Antiinflammatorische Wirkung	43
2.1.7.3.4	Antiallergene Eigenschaften	44
2.1.7.3.5	Immunmodulation	45
2.1.7.3.6	Lactoferrin und Tumorgenese.....	47
2.1.7.3.7	Enzymatische Aktivität.....	48
2.1.7.3.8	Beeinflussung des Blutbildes.....	48
2.1.7.4	Anwendungsmöglichkeiten in der Human- und Tiermedizin	49
3	Material & Methoden	50
3.1	Versuchsaufbau	50
3.2	Versuchstiere	51
3.3	Aufzuchtbedingungen.....	52
3.4	Fütterung	53
3.4.1	Einteilung der Versuchstiere in vier Fütterungsgruppen.....	53
3.4.2	Futterzusammensetzung	53
3.4.2.1	Zusammensetzung des Milchaustauschers	53
3.4.2.2	Zusammensetzung des Trockenfutters	55
3.4.3	Fütterungszeiten.....	55
3.4.4	Fütterungstechnik.....	56
3.4.5	Kot- und Urinabsatz.....	56
3.4.6	Entwurmung	56
3.4.7	Impfung und Applikation von Humanem Serum Albumin (HSA) ..	56
3.4.7.1	Herstellung der Humanes-Serum-Albumin-Lösung.....	57
3.4.7.1.1	Verwendete Chemikalien.....	57

3.4.7.1.2	Herstellung	57
3.5	Futteraufnahme und Gewichtsentwicklung.....	57
3.6	Kotuntersuchung	58
3.6.1	Untersuchungen	58
3.6.2	Entnahmezeitpunkte.....	58
3.6.2.1	Durchführung der mikrobiologischen Untersuchung	58
3.6.2.1.1	Untersuchte Parameter	59
3.6.2.1.2	Materialien und Nährböden	59
3.6.2.1.3	Probenaufbereitung und Durchführung	59
3.6.2.1.3.1	Bestimmung der Gesamtkeimzahl.....	60
3.6.2.1.3.2	Untersuchung auf E. coli, Enterococcen, Lactobacillen/ Leuconostoc, Clostridien	60
3.6.2.2	Bestimmung der Trockensubstanz.....	60
3.6.2.3	L-Laktatbestimmung	60
3.6.2.3.1	Vorbereitung	60
3.6.2.3.2	Prinzip.....	60
3.6.2.3.3	Chemikalien	61
3.6.2.3.4	Geräte.....	61
3.6.2.3.5	Durchführung.....	61
3.6.2.4	Ammoniakbestimmung.....	62
3.6.2.4.1	Materialien und Reagenzien	62
3.6.2.4.2	Geräte.....	62
3.6.2.4.3	Vorbereitung	62
3.6.2.5	pH-Wert-Messung	62
3.7	Blutuntersuchung	62
3.7.1	Entnahmezeitpunkte.....	62
3.7.2	Probenentnahme.....	63
3.7.3	Bestimmung des roten und weißen Blutbildes	63
3.7.3.1	Materialien	63
3.7.3.2	Probenvorbereitung	63

3.7.3.3	Durchführung der Untersuchung.....	63
3.7.4	Untersuchung des Gehaltes von Immunglobulin G (IgG) gegen Humanes Serum Albumin (HSA).....	64
3.7.4.1	Prinzip.....	64
3.7.4.2	Materialien.....	64
3.7.4.3	Chemikalien.....	65
3.7.4.4	Probenvorbereitung.....	66
3.7.4.5	Durchführung.....	66
3.7.4.5.1	Beschichtung.....	66
3.7.4.5.2	Waschvorgang.....	66
3.7.4.5.3	Blockierung.....	67
3.7.4.5.4	Waschvorgang.....	67
3.7.4.5.5	Zugabe der Proben.....	67
3.7.4.5.6	Waschvorgang.....	68
3.7.4.5.7	Konjugat-Zugabe.....	68
3.7.4.5.8	Waschvorgang.....	68
3.7.4.5.9	Zugabe des Substrats.....	68
3.7.4.5.10	Stoppreagenz.....	68
3.7.4.5.11	Auswertung.....	69
3.8	Statistische Auswertung.....	69
4	Ergebnisse.....	70
4.1	Versuchsverlauf.....	70
4.2	Gewichtsentwicklung.....	71
4.3	Rotes und weißes Blutbild.....	77
4.3.1	Rotes Blutbild.....	77
4.3.1.1	Erythrozyten.....	77
4.3.1.2	Hämatokrit.....	78
4.3.1.3	Hämoglobin.....	79
4.3.2	Weißes Blutbild.....	79
4.3.2.1	Leukozyten.....	79

4.3.2.2	Neutrophile.....	80
4.3.2.2.1	Absolute Werte	80
4.3.2.2.2	Relative Werte	81
4.3.2.3	Lymphozyten.....	82
4.3.2.3.1	Absolute Werte	82
4.3.2.3.2	Relative Werte	82
4.4	Immunglobulin G gegen Humanes Serum Albumin.....	83
5	Diskussion.....	86
5.1	Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung	86
5.2	Zusammensetzung des Milchaustauschers	87
5.3	Gewichtsentwicklung.....	88
5.4	Rotes und weißes Blutbild	90
5.4.1	Rotes Blutbild	91
5.4.2	Weißes Blutbild	94
5.5	Immunglobulin G gegen Humanes Serum Albumin.....	98
6	Zusammenfassung.....	101
7	Summary.....	103
8	Literaturverzeichnis	105
9	Danksagung	133
10	Lebenslauf.....	135

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Prebiotika, die den hauptsächlichen Marktanteil bilden (nach Rastall, 2002)	33
Tabelle 2:	Geschlechter- und Gruppenverteilung der Welpen in vier verschiedenen Fütterungsgruppen und die Anfangsgewichte der Welpen in g KGW	51
Tabelle 3:	Fütterungsgruppen	53
Tabelle 4:	Zusammensetzung des Milchaustauschers pro 100 g.....	53
Tabelle 5:	Zusammensetzung der Inhaltsstoffe des Milchaustauschers (in g/100 g Milchaustauscher) (Meyer et al. 1986)	53
Tabelle 6:	Aminosäuregehalte des Milchaustauschers (in g/100 g Milchaustauscher) (Meyer et al. 1986)	54
Tabelle 7:	Mineralstoff- und Spurenelementgehalt des Milchaustauschers (in 100 g Milchaustauscher) (Meyer et al. 1986)	54
Tabelle 8:	Vitamingehalt des Milchaustauschers (in 100 g Milchaustauscher) (Meyer et al. 1986)	54
Tabelle 9:	Zusammensetzung des Trockenfutters (Weender Analyse).....	55
Tabelle 10:	Mineralstoff- und Spurenelementgehalt des Trockenfutters (in der TS)	55
Tabelle 11:	Entnahmezeitpunkte für die verschiedenen Kotparameterbestimmungen	58
Tabelle 12:	Entnahmezeitpunkte für die verschiedenen Blutparameter- bestimmungen	63
Tabelle 13:	Zahl und Geschlecht der Welpen in den einzelnen Versuchsgruppen	71
Tabelle 14:	Durchschnittliche Anfangs- und Endgewichte der Welpen jeder Gruppe (n = 8) in g (Mittelwert ± Standardabweichung)	72
Tabelle 15:	Durchschnittsgewichte der Hunde der einzelnen Versuchsgruppen (n = 8) wochenweise in g/Hund (Mittelwert ± Standardabweichung)	73
Tabelle 16:	Durchschnittliche wöchentliche Gewichtszunahmen in g je Hund und Gruppe (Mittelwert ± Standardabweichung)	75

Tabelle 17:	Durchschnittliche Erythrozytenmenge im Welpenblut in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert ± Standardabweichung) in 10 ⁶ /μl	78
Tabelle 18:	Durchschnittlicher Hämatokritwert im Welpenblut in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert ± Standardabweichung) in %	78
Tabelle 19:	Durchschnittlicher Hämoglobinwert im Welpenblut in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert ± Standardabweichung) in mmol/l.....	79
Tabelle 20:	Leukozyten in 10 ⁹ /l in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert ± Standardabweichung) in mmol/l	80
Tabelle 21:	Durchschnittlicher Gehalt an neutrophilen Granulozyten im Welpenblut in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert ± Standardabweichung) in 10 ⁹ /l	81
Tabelle 22:	Anteil der neutrophilen Granulozyten in % an der Gesamtleukozytenzahl in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert ± Standardabweichung) in mmol/l	81
Tabelle 23:	Durchschnittlicher Gehalt an Lymphozyten im Welpenblut in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert ± Standardabweichung) in 10 ⁹ /l	82
Tabelle 24:	Lymphozytenanteil in % an der Gesamtleukozytenzahl im Welpenblut in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert ± Standardabweichung)	83
Tabelle 25:	Mittlerer Gehalt an IgG gegen HSA im Blut in ng/ml Plasma in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert ± Standardabweichung)	84
Tabelle 26:	Gehalt an IgG gegen HSA im Blut in ng/ml Plasma der einzelnen Welpen in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert ± Standardabweichung)	85
Tabelle 27:	Einfluss verschiedener Probiotika auf die Leistung einiger landwirtschaftlicher Nutztiere (nach Busch et al. 1999).....	90

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Struktur eines Lactoferrin-Moleküls (nach NAIDU, 2000).....	38
Abbildung 2:	Mögliche Funktionen von Lactoferrin (nach BROCK, 2002)	39
Abbildung 4:	Pipettierschema auf einer 96-Loch-ELISA-Platte	68
Abbildung 5:	Schematische Anordnung des Versuchsverlaufs	70
Abbildung 6:	Gewichtsentwicklung der vier Versuchsgruppen (n = 8) wochenweise in g KGW (Mittelwert ± Standardabweichung)	89
Abbildung 7:	Durchschnittlicher Hämoglobinwert im Welpenblut der vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert ± Standardabweichung) in mmol/l	92
Abbildung 8:	Durchschnittlicher Hämatokritwert im Welpenblut in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert ± Standardabweichung) in %.....	93
Abbildung 9:	Durchschnittlicher Gehalt an Lymphozyten im Welpenblut in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert ± Standardabweichung) in 10 ⁹ /l	95
Abbildung 10:	Lymphozytenanteil in % an der Gesamtleukozytenzahl im Welpenblut in vier experimentellen Gruppen zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert ± Standardabweichung)	96
Abbildung 11:	Anteil der neutrophilen Granulozyten in % an der Gesamtleukozytenzahl in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert ± Standardabweichung).....	97
Abbildung 12:	IgG gegen HSA in ng/ml Plasma in vier Gruppen (n = 8) zu vier Entnahmezeitpunkten in ng/ml Plasma (Mittelwert ± Standardabweichung).....	99
Abbildung 13:	IgG gegen HSA in ng/ml Plasma in der Gruppe LF 120 zu vier Entnahmezeitpunkten in ng/ml Plasma (Mittelwert ± Standardabweichung).....	99

Abkürzungsverzeichnis

Arg	Arginin
BE	Bruttoenergie
BGBI. I	Bundesgesetzblatt I
Ca	Calcium
cm	Centimeter
Cu	Kupfer
Cys	Cystin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
et al.	et alii (und andere)
etc.	et cetera (und so weiter)
FAO	The Food Agricultural Organisation
Fe	Eisen
g	Gramm
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue
GIT	Gastrointestinaltrakt
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
H ⁺	Wasserstoff-Atom (einfach positiv geladen)
HCl	Salzsäure
His	Histidin
HSA	Humanes Serum Albumin
HIV	Humane Immunodeficiency Virus (Humanes Immunschwäche Virus)
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgA	Immunglobulin der Klasse A
IL-18	Interleukin-18
Ile	Isoleucin
J	Jod

K	Kalium
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
Leu	Leucin
L-LDH	L-Laktat-Dehydrogenase
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LPS	Lipopolysaccharide
LW	Leerwert
Lys	Lysin
Met	Methionin
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
Mg	Magnesium
MJ	Megajoule
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
Mn	Mangan
MW	Mittelwert
n	Stichprobenzahl
Na	Natrium
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
Neg-K	Negativkontrolle
NfE	Stickstoff-freie Extraktstoffe
nm	Nanometer
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P	Phosphat
PBS	phosphate buffered saline
PCSL	Pam3Cys-Ser-(Lys)4x3HCl
Phe	Phenylalanin
ppm	parts per million

PUFA	Polyunsaturated Fatty Acid
Ra	Rohasche
RBC	Read Blood Cells
Rfa	Rohfaser
Rfe	Rohfett
Rp	Rohprotein
spp.	Subspezies
Stabw	Standardabweichung
Thr	Threonin
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
Trp	Tryptophan
TS	Trockensubstanz
u.v.a.	und viele andere
Val	Valin
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zink

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Welpensterblichkeit bei Hunden im Zeitraum zwischen dem Tag der Geburt bis zum Absetzalter von acht Wochen liegt bei 18 bis 22 Prozent (KRAMMER, 2001). Häufigste Ursachen für die Frühsterblichkeit sind bakterielle und virale Infektionen, kongenitale Anomalien und Ernährungsdefizite bei den Welpen aber auch beim Muttertier (LOESENBECK, 2004).

Lactoferrin, ein prebiotisch wirksames Glycoprotein, das bereits in einigen in vitro und in vivo Studien an Mensch und Tier untersucht wurde, zeigte vielfältige Wirkungen auf den Organismus. Es ist in der Lage antimikrobiell, antiviral, antimykotisch, antiprotozoisch, antiinflammatorisch, antiallergisch aber auch immunmodulierend und hemmend auf die Tumorgenese zu wirken.

In der Humanmedizin wurden bereits erfolgreiche Versuche bei Säuglingen durchgeführt, um deren Krankheitsanfälligkeit in den ersten Lebenswochen durch Gabe von Probiotika, Prebiotika oder Synbiotika zu minimieren. In der vorliegenden Studie sollte erstmalig an neonatalen Hundewelpen untersucht werden, wie sich die Applikation der prebiotisch wirksamen Substanz Lactoferrin auf den Gesundheitsstatus der Tiere auswirkt.

Dazu wurde, um standardisierte Versuchsbedingungen zu schaffen, das Modell der mütterlosen Aufzucht gewählt. 32 Beaglewelpen wurden am dritten Lebenstag von der Mutter getrennt und blieben bis zur vollendeten 14. Lebenswoche im Versuch. Sie wurden in vier Gruppen eingeteilt ($n = 8$), die verschiedene Lactoferrindosierungen erhielten (0, 30, 60, 120 mg Lactoferrin/kg Milchaustauscher oder Trockenfertigfutter). Bis zum Absetzen in Woche 8 wurden die Welpen mit selbst angefertigtem, bilanziertem Milchaustauscher, anschließend mit kommerzieller Trockennahrung gefüttert.

In dieser Studie sollte untersucht werden, ob Lactoferrin Veränderungen der Gewichtsentwicklung oder des Blutbildes bewirkt und im Besonderen, ob es Auswirkungen auf den Immunstatus der Tiere zeigt, da diese immunologische

Wirksamkeit als ein Ansatzpunkt für eine Verminderung der Welpensterblichkeit diskutiert werden könnte.

2 LITERATUR

2.1 Immunologisch wirksame Nahrungsergänzungstoffe

2.1.1 Einführung

In den letzten Jahren nehmen natürliche Ergänzungsstoffe in der Gesundheitsvorsorge immer mehr zu. Die positiven Effekte einer gesunden Ernährung werden in wachsendem Maße durch wissenschaftliche Studien belegt. So erfreut sich in der humanen Ernährung so genanntes „functional food“ immer größerer Beliebtheit und auch in der Tierernährung gibt es inzwischen so genanntes „functional feed“. Als solche werden Nahrungs- oder Futtermittel bezeichnet, denen gesundheitsfördernde Stoffe zugesetzt werden. Diese können Vitamine, Spurenelemente, essentielle Fettsäuren, Ballaststoffe sowie Mikroorganismen und eine Vielzahl anderer von Mensch und Tier zu einer gesunden Ernährung benötigten Substanzen sein.

Vitamine und Antioxidanzien werden entweder als Zusatzstoffe in Nahrungsmitteln beziehungsweise Fertigfuttermitteln eingesetzt oder als Einzelpräparate oder kombinierte Präparate in Form von Pulver, Tabletten, Kapseln, Emulsionen und ähnlichem verabreicht. Eine wissenschaftliche Bewertung der Supplementierung von Vitaminen, Mengen- und Spurenelementen beim Menschen wurde durch MCCARTHY und RAKOWSKI (1996) durchgeführt.

Besonderer Beliebtheit in der menschlichen Ernährung erfreut seit einiger Zeit die Gruppe der Probiotika. Bereits Anfang des 19. Jahrhunderts postulierte ELI METCHNIKOFF (1908), dass die Ernährung der Bulgarischen Bevölkerung, die besonders viele fermentierte Milchprodukte beinhaltet, deren hohe Lebenserwartung und Gesundheit fördere (YOUNG, 2003). In der Humanernährung kann der Gesundheitsbewusste heute vom „probiotischen Joghurt“ über „Probiotika-Drinks“ bis hin zu Kapseln, die getrocknete „probiotisch wirksame Mikroorganismen“ beinhalten, alles Erdenkliche erwerben.

In der Tierernährung reicht die Palette der Futtermittel, die mit gesundheitsfördernden Substanzen angereichert sind, noch nicht ganz so weit. Allerdings werden besonders im Kleintiersektor immer neue Produkte auf den Markt gebracht. Seit die Menschen sich um ihre Haustiere immer intensiver kümmern und

diese immer älter werden, wird auch ihrer gesunden Ernährung wachsende Bedeutung beigemessen.

Doch auch im Bereich der Nutztierernährung gewinnen eine ausgewogene Fütterung und der Zusatz verschiedener biologischer Substanzen, wie zum Beispiel Pre- und Probiotika, Vitamine, Provitamine, Antioxidanzien, organische Säuren, Enzyme, Pflanzenextrakte, Mineralstoffe und Spurenelemente, zunehmend an Bedeutung aufgrund der Wirksamkeit in der Gesundheitsvorsorge und vor allem wegen leistungssteigernder Effekte. Da die Nutztiere der Ernährung des Menschen dienen, kann die gesundheitsfördernde Wirkung der „functional feed“ durch die Nahrungskette an den Menschen weiter gegeben werden und so „functional food“ für die humane Ernährung entstehen (RAMBECK, 2001).

2.1.2 Vitamine, Provitamine, Antioxidanzien

2.1.2.1 Definition und Vorkommen

Vitamine sind organische Verbindungen, die vom Körper nicht oder nicht in ausreichendem Maße synthetisiert werden und deshalb als essentielle Nahrungsbestandteile vom Organismus aufgenommen werden müssen. Der Begriff „Vitamin“ wurde 1912 von Funk geprägt (WIESNER, RIBBECK, 1991). Der Vitaminbedarf ist von der Spezies abhängig und variiert je nach Alter, Gesundheitszustand, Zyklusstand, Leistung und anderen Gesichtspunkten. Es muss zwischen wasserlöslichen und fettlöslichen Vitaminen unterschieden werden, da davon die Speichermöglichkeit im Organismus, Transport- und Ausscheidungswege und auch das Vorkommen abhängen. Eine ausreichende Aufnahme von Vitaminen ist für die „Aufrechterhaltung von Gesundheit und Leistungsfähigkeit des menschlichen und tierischen Organismus notwendig...“ (RÖMPPS, 1987).

Provitamine sind Vorstufen von Vitaminen, die erst durch eine bestimmte Reaktion in vitro oder in vivo in das Vitamin überführt werden.

Der Bedarf an Vitaminen und Provitaminen liegt bei wenigen Mikrogramm bis Milligramm pro Tag. Jedes einzelne erfüllt spezifische physiologische Funktionen. Früher glaubte man alle Vitamine und Provitamine würden als Biokatalysatoren wirken, heute weiß man jedoch, dass deren Wirkungsweisen vielfältiger sind und sie zum Beispiel als Coenzyme oder prosthetische Gruppen von Enzymen fungieren

können oder gar in die Regulation des Stoffwechsels eingreifen beziehungsweise als Hormone wirken (RÖMPPS, 1987).

Vitamine und Provitamine findet man vor allem in pflanzlichen und tierischen Organismen. Sie können jedoch auch chemisch isoliert beziehungsweise hergestellt werden und in verschiedenen Formulierungen als Einzelpräparate oder als Multivitaminpräparate eingesetzt werden oder bereits als vitaminisierte Lebensmittel oder Futtermittel erworben werden. Für den Menschen essentiell sind laut WHO und FAO die Vitamine A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, D, E, K, Nicotinsäure und Folsäure. Die meisten Säugetiere - außer Primaten und Meerschweine - können Vitamin C im Körper synthetisieren, es ist für diese also kein essentieller Nahrungsbestandteil.

Wird der Vitaminbedarf über längere Zeiträume nicht ausreichend gedeckt, so entstehen typische Mangelkrankungen mit mehr oder weniger typischen Symptomen. Beim Menschen sind solche unter Trivialbezeichnungen wie zum Beispiel Skorbut, Rachitis oder Beriberi bekannt. Gleiche oder ähnliche Krankheiten können auch beim Tier durch Hypo- oder Avitaminosen hervorgerufen werden.

2.1.2.2 Beispiele für Vitamine, Provitamine und Antioxidanzien in der Tierernährung und deren Wirkung

Hinter Retinol verbirgt sich die Vitamin A-Gruppe. Darunter werden die fettlöslichen, isoprenoiden C₂₀-Vitamine A₁ (Retinol) und A₂ (3-Dehydroretinol) zusammengefasst. Retinol ist von Bedeutung für das Wachstum und die Entwicklung, den Aufbau und die Resistenz von Haut und Schleimhaut, die Differenzierung und Integrität von Epithelien, die Erhaltung des Immunsystems, für die Reproduktion sowohl bei weiblichen als auch männlichen Tieren und für funktionelle Abläufe beim Sehvorgang. Darüber hinaus wird vermutet, dass es eine Rolle beim Knochenwachstum spielt und antikarzinogen wirkt.

Bei Vitamin A-Mangel kommt es zu trockener Haut, eingeschränkter Sekretion von Schweiß-, Tränen-, Talg und Magendrüsen, Gewichtsabnahme, Wachstumshemmungen und erhöhter Anfälligkeit gegenüber Infektionen.

Bei Supplementierung über den Bedarf hinaus ist eine antikarzinogene Wirkung beschrieben. Zusätzlich wird es zur unterstützenden Therapie bei Hauterkrankungen eingesetzt.

Bei Vitamin A-Unterversorgung konnte in mehreren Studien, vor allem bei der Ratte, aber auch bei Hund und Katze, eine Verschlechterung der Immunabwehr

nachgewiesen werden. Diese beruht zum einen auf einer Schädigung der Epithelien der äußeren Haut und der Schleimhaut von Urogenital- und Atmungsstrakt, zum anderen nimmt die Produktion von Immunglobulinen und „Natural Killerzellen“ (NK-Zellen) ab und die Funktionalität von NK-Zellen, T-Lymphozyten und Neutrophilen Granulozyten ist gestört (ZHAO und ROSS, 1995; ROGERSON, 1979; TVEDTEN und WHITEHAIR, 1977). Auch auf die lokale Immunabwehr des Darmes wirkt sich eine Unterversorgung mit Vitamin A negativ aus. So konnten BJERSING et al. (2002) bei Ratten eine signifikante Reduktion der IgA-Plasmazellen in der Lamina propria und den CD4+-T-Lymphozyten und in den Peyerschen Platten feststellen. In einer Studie von SIDDIQUI et al. (2001), in der freiwillige Testpersonen gegen Tollwut geimpft wurden, konnten bei der Testgruppe mit Vitamin A-Supplementierung signifikant höhere Anti-Tollwut-Antikörpertiter gemessen werden, als in der Kontrollgruppe.

Bei einer Hypovitaminose kommt es sowohl zu Störungen der humoralen als auch der zellulären Immunantwort. Umgekehrt konnte durch eine übermäßige Versorgung mit Vitamin A kein stimulierender Effekt auf das Immunsystem nachgewiesen werden.

Das fettlösliche Vitamin A kommt in Nahrungs- und Futtermitteln tierischer Herkunft vor. Besonders reich an Vitamin A sind Leber, Eigelb und Milch. Eine weitere Quelle stellen die in Pflanzen vorliegenden Carotine dar, die im Organismus, außer von der Katze, zu Vitamin A umgewandelt werden können. Für Pflanzenfresser stellen die Carotine die bedeutendste Vitamin A-Quelle dar. Vitamin A wird in der Leber, bei Hund und Katze auch in der Niere, gespeichert (WORDEN et al., 1955; SCHWEIGERT et al., 1991).

Auch bei Vitamin D wird eine Funktion bei der Modulation des Immunsystems vermutet. Es konnte beobachtet werden, dass der hormonähnliche Metabolit des Vitamin D, Calcitriol, sich auf die Proliferation und Differenzierung von Makrophagen und Monozyten und die Produktion von Interleukin-2 und Leukotrien auswirkte (MANOLAGAS et al., 1985). Außerdem ist es für die Regulierung der Calcium- und Phosphathomöostase und damit des Knochenstoffwechsels verantwortlich und übt einen positiven Einfluss auf das Wachstum und die Differenzierung epidermaler Zellen aus. Das Wachstum von Krebszellen scheint es dagegen zu hemmen. Als Steroid kann das Vitamin D an Kernrezeptoren binden und so eine Stimulierung der

Genexpression hervorrufen (BROWN et al., 1999; RACHEZ und FREEMAN, 2000). Im Organismus wird es vorwiegend in der Leber gespeichert.

In der Natur kommen zwei Formen von Vitamin D vor: zum einen Ergocalciferol, oder Vitamin D₂, das in Pflanzen und Mikroorganismen gebildet wird und zum anderen das im tierischen Organismus auftretende Cholecalciferol, oder Vitamin D₃. Es kann in der Haut des Menschen und verschiedener Tiere mit Hilfe von ultravioletter Strahlung aus Cholesterol gebildet werden (OKANO et al., 1978; LAWSON et al., 1986). Katzen und Hunde können Vitamin D₃ dagegen nicht synthetisieren (HOW et al., 1994). Das fettlösliche Vitamin D₃ kommt in hohen Konzentrationen in Leber, Eigelb, verschiedenen Fischen und in Milch vor.

Es konnte bisher nicht nachgewiesen werden, dass es positive Auswirkungen hat, wenn man Vitamin D in Mengen, die den Bedarf übersteigen, verabreicht. Aufgrund der zu erwartenden Hypercalcämie und der toxischen Wirkung bei Aufnahme größerer Mengen von Calciferol ist dieses nicht zu empfehlen.

Vitamin E, auch als Tocopherol bekannt, ist ebenfalls notwendig für eine einwandfreie Funktion des Immunsystems. Es beeinflusst die Proliferation und die Reifung von T-Lymphozyten, die Phagozytoserate und die Migrationsfähigkeit von Makrophagen. Außerdem schützt es den Organismus als potentes Antioxidans vor Schäden durch freigesetzte Entzündungsmediatoren (MORIGUCHI und MURAGA, 2000). Daneben benötigt es der Organismus für die Aufrechterhaltung der Funktionen von Muskulatur, Nervensystem und Reproduktionssystem.

Bei Zufuhr über den Bedarf hinaus werden dem Tocopherol eine Reihe positiver Effekte zugesprochen. Das Immunsystem scheint optimiert zu werden und aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaft geht man davon aus, dass es den Alterungsprozess verzögert, bei körperlich belasteten Tieren die Leistungsfähigkeit steigert beziehungsweise erhält und vor den Folgeschäden eines Diabetes mellitus schützt. Zusätzlich wird ihm eine antikarzinogene Wirkung zugeschrieben. Vitamin E findet auch zur Unterstützung der Therapie bei Herz- oder Hauterkrankungen Anwendung.

Vitamin E gehört zu den fettlöslichen Vitaminen und wird ausschließlich in Pflanzen synthetisiert. In besonders hohen Konzentrationen liegt es zum Beispiel in Pflanzenkeimöl, Getreide, frischem Gras und Ölsaatkuchen vor (CABELL und ELLIS, 1942). Es ist sehr leicht oxidierbar und deshalb verringert sich der Vitamin E-Gehalt

in Nahrungs- und Futtermitteln durch Lagerung sehr stark. In Vitaminpräparaten wird deshalb eine Mischung der D- und L-Isomere von Vitamin E oder Tocopherylacetat verwendet, das eine stabilere Struktur besitzt und erst nach Spaltung im Gastrointestinaltrakt seine biologische Aktivität entfalten kann. Vitamin E wird im Körper vor allem in der Leber und im Fettgewebe gespeichert (DREVON, 1991).

Eine über dem Bedarf liegende Supplementierung bewirkt eine Optimierung des Immunsystems. Dies konnte durch verschiedene Experimente an Ratten (SAKAI und MORIGUCHI, 1997; MORIGUCHI und ITOH, 1997; GU et al., 1999) und am Rind (CHEW, 1995) belegt werden. Es konnte ein positiver Einfluss auf die Differenzierung von Thymozyten und T-Lymphozyten und die Bildung von Interleukin-2, Immunglobulinen und Cytokinen verzeichnet werden. In einer Studie von KONJUFCA et al. (2004) an Broilern wurde eine Stimulierung der Fc-Rezeptor-medierten Phagozytoseaktivität von Makrophagen festgestellt und die Arbeit von POLITIS et al. (2004) belegt einen positiven Einfluss auf die Funktion von bovinen neutrophilen Granulozyten.

Ein weiteres Vitamin, das sich auf das Immunsystem auswirkt, ist das Vitamin B₆. Die phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Formen von Pyridoxin, Pyridoxal und Pyridoxamin gehören zu der Gruppe des Vitamin B₆. Während in Futtermitteln pflanzlicher Herkunft hauptsächlich Pyridoxin vorkommt, überwiegt in tierischen Geweben Pyridoxal und Pyridoxamin. Besonders hohe Konzentrationen findet man in Hefe, Fischmehl, Milch, Luzerne und Getreide, besonders in dessen Kleie. Weiterhin findet eine Synthese von Vitamin B₆ durch die intestinale Mikroflora statt, welche besonders bei Pferd und Ratte von Bedeutung ist (SUMI et al., 1977).

Es ist für verschiedene Funktionen von Haut, Herz und Nervensystem unerlässlich und spielt eine entscheidende Rolle bei der Hämatopoese und der Immunabwehr. Eine Vielzahl von Versuchen an Ratten belegen, dass Vitamin B₆-Mangel eine Atrophie des lymphatischen Gewebes und eine verminderte humorale und zelluläre Immunität hervorruft (ROBSON und SCHWARZ, 1980; CHANDRA und SUDHAKARAN, 1990; RALL und MEYDANI, 1993). Auch bei Hunden mit chronischem Vitamin B₆-Mangel kam es, neben Anämie und Kachexie, zur Atrophie von Thymus, Lymphknoten, Milz und Knochenmark (HUMPHRIES et al., 1961).

Es wird im Dünndarm absorbiert und anschließend in der Leber zum Pyridoxalphosphat, der aktiven Form, verstoffwechselt. In erster Linie fungiert es als Coenzym im anabolen und katabolen Aminosäurestoffwechsel (BAI et al., 1998) und

entfaltet außerdem bei anderen physiologischen Stoffwechselfvorgängen, wie dem Lipidmetabolismus oder der Genexpression, coenzymatische Wirkung (TSUGE et al., 2000). COBURN und MAHUREN (1987) postulieren eine Abweichung der Metabolisierung von Vitamin B₆ bei der Katze.

Positive Wirkungen bei erhöhter Supplementierung sind nicht nachgewiesen.

Folsäure spielt ebenfalls bei Hämatopoese und Immunabwehr eine nicht unwichtige Rolle. Außerdem beeinflusst sie Funktionen von Haut und Schleimhaut und wirkt antikanzinogen. Bei Ratten, Mäusen, Meerschweinchen und beim Menschen führt ein Mangel an Folsäure zu einer Verminderung der zellulären sowie der humoralen Immunantwort. Es lassen sich eine reduzierte Teilungsrate der T-Lymphozyten, eine verminderte Zytotoxizität und eine geringere Immunglobulinproliferation feststellen. Zusätzlich kommt es in vielen Versuchsreihen zu einer deutlichen Leukopenie und einer massiven Granulozytopenie.

Es liegen mehrere Derivate mit ähnlicher biologischer Aktivität vor, von denen die Folsäure die bekannteste ist. Man findet hohe Konzentrationen in Mikroorganismen und grünen Pflanzen, aber auch in Hefen und Lebergewebe. Die meisten Tierarten sind in der Lage Folsäure im Darmtrakt zu synthetisieren. Unter Beteiligung von Vitamin C wird die im Dünndarm absorbierte Folsäure zu Tetrahydrofolsäure, der aktiven Form, metabolisiert (DHUR et al., 1991; KIM et al., 2002).

Die Pantothersäure wird auch als Vitamin B₅ bezeichnet und kann als D- und als L-Pantothersäure vorliegen. Lediglich das D-Isomer ist biologisch aktiv. Hohe Gehalte sind in Innereien, Hefe, Eigelb, Milch, Luzerne, Ölsaatschrot und Kleie nachgewiesen. Da Pantothersäure ein visköses, stark hygroskopisches und instabiles Öl ist, wird sie als Futter- beziehungsweise Lebensmittelzusatz meist in Form von Kalium- oder Calciumsalzen angewandt. Sie ist essentiell für die Aufrechterhaltung von Haut und Haarkleid sowie der Darmschleimhaut und des Immunsystems. Vermutlich kommt ihr ebenfalls eine Funktion im neurovegetativen System zu. Sie ist am Metabolismus von Kohlenhydraten, Fetten und Eiweißen beteiligt (WITTEWERT et al., 1990) und wird über die Nieren ausgeschieden. Bei Pantothersäuremangel reduziert sich nachweislich die Synthese von Immunglobulinen und die Menge antikörperbildender Zellen in der Milz (LEDERER et al., 1975).

Bei Supplementierung über den Bedarf hinaus sind bislang keine positiven Wirkungen belegt.

Vitamin C ist ein Antioxidans, das von den meisten Säugetieren, außer Primaten und Meerschweinen, selbst synthetisiert werden kann. Deshalb fällt es bei diesen Tieren streng genommen nicht unter die Definition eines Vitamins, das als essentieller Nahrungsbestandteil aufgenommen werden muss. Zusätzliche orale Aufnahme kann das Immunsystem stimulieren, aber auch den Alterungsprozess verzögern, die körperliche Leistungsfähigkeit steigern, das Risiko der Entstehung eines Kataraktes mindern und Folgeschäden, die durch eine Erkrankung an Diabetes mellitus entstehen, reduzieren. Weiterhin soll der Ascorbinsäure eine antikarzinogene Wirkung zukommen.

Auch Pflanzen bilden Vitamin C, besonders reichhaltig ist es in Zitrusfrüchten, Spinat, Salaten und verschiedenen Kohllarten vorhanden. Biologische Aktivität besitzt lediglich die L-(+)-Ascorbinsäure, die im Körper als Antioxidans wirkt und an enzymatischen Reaktionen beteiligt ist (PADH, 1991).

Ascorbinsäure ist eines der wichtigsten wasserlöslichen Antioxidanzien, das in der Lage ist freie Radikale, wie zum Beispiel Superoxid-Anionen, Hydroperoxyd- und Sauerstoffradikale abzufangen und so den Organismus vor oxidativen Schäden zu schützen (SIES et al., 1992). Zusätzlich wird es für die Regeneration von Vitamin E benötigt und ist bei der Absorption von Eisen aus dem Darmtrakt von entscheidender Bedeutung (REDDY und COOK, 1991; WIENK et al., 1997).

In Stresssituationen steigt der Verbrauch an Vitamin C (NAKANO und SUZUKI, 1984).

Die Auswirkungen einer Supplementierung mit Vitamin C auf das Immunsystem, speziell bei Erkältungskrankheiten des Menschen, ist wohl eine der bekanntesten Wirkungen, die diesem Vitamin zugesprochen werden. Klinische Studien aus der Humanmedizin ergaben, dass eine zusätzliche Aufnahme von bis zu 1 g Vitamin C pro Tag zwar nicht die Inzidenz von Erkältungen senkt, aber deren Dauer verkürzt und die Symptome mildert (HEMILÄ, 1992). Die meisten Studien zur Wirksamkeit von supplementierter Ascorbinsäure auf das Immunsystem haben bis dato beim Menschen und beim Meerschwein stattgefunden, da diese Spezies keine Eigensynthese durchführen. Deshalb lässt sich schwer sagen, ob die Ergebnisse auch auf unsere übrigen Haustiere übertragbar sind. Bisher konnte nachgewiesen werden, dass in den Zellen der Immunabwehr eine wesentlich höhere Konzentration

von Ascorbinsäure vorliegt, als im Plasma. Das legt die Vermutung nahe, dass es durch Schutz vor reaktiven Substanzen, welche bei der Phagozytose von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen freigesetzt werden, eine Funktion im Immunsystem erfüllt (ANDERSON und LUKEY, 1987). Mehrere Studien liefern außerdem Hinweise darauf, dass sich Vitamin C auf die Funktion der phagozytierenden Immunzellen auswirkt. Ob sich eine zusätzliche Vitamin C-Supplementierung ebenfalls positiv auf das Immunsystem von Tieren auswirkt, die dieses Vitamin selbst synthetisieren können, bleibt unklar.

Lutein ist ebenfalls ein nicht-essentielles Antioxidans, das zu den Carotinoiden gehört. Bei zusätzlicher Aufnahme wirkt es antikarzinogen und soll eine Optimierung des Immunsystems bewirken. Es kommt als gelbes Pigment vor allem in Pflanzen vor, besonders reichhaltig in Mais, Luzerne, aber auch in Eigelb.

Bei Ratten konnte nachgewiesen werden, dass sich Lutein nach oraler Aufnahme im Serum und in der Leber anreicherte (YEUM et al., 1999). Auch bei Hund und Katze konnten CERVENY et al. (1998) und PARK et al. (1999) die intestinale Absorption belegen. Es wirkt antioxidativ und unterbricht die Kettenreaktion der Lipidperoxidation. KIM et al. (2000a) konnten eine immunmodulatorische Wirkung von Lutein bei Katzen nachweisen. Der Lutein-Plasmaspiegel stieg dosisabhängig und eine statistisch signifikante Stimulierung der Proliferation von Monozyten, CD4+- und CD21+Lymphozyten sowie Immunglobulin G konnte nachgewiesen werden. Dies bestätigt eine positive Wirkung des Luteins auf die zellmedierte sowie die humorale Immunantwort. Ähnliche Ergebnisse konnten KIM et al. (2000b) bei Hunden feststellen. Außer den bereits bei Katzen gezeigten Wirkungen, konnten bei den Lutein-supplementierten Hunden zusätzlich, nach Vakzination, signifikante Anstiege von Immunglobulin G, nicht jedoch von Immunglobulin M, verzeichnet werden.

2.1.2.3 Anwendung in der Human- und Tiermedizin

Für die menschliche Ernährung gibt es im Handel zahlreiche Vitaminpräparate, die sowohl als Einzel- meist jedoch als Kombinationspräparate angeboten werden. Viele moderne Menschen ernähren sich eher einseitig und beziehen wenige frische Produkte in ihren Speiseplan ein. Deshalb erfreut sich die prophylaktische Vitaminsupplementierung in Form von Fertigpräparaten, die meist in Kapselform angeboten werden, immer größerer Verbreitung.

Auch bei unseren Haustieren gewinnt die ausreichende Versorgung mit Vitaminen eine immer größere Bedeutung. Ein Großteil der Tierhalter, die für ihre Tiere eine eigene Ration zusammenstellen, geben zu diesem Futter meist kombinierte Vitamin-Mineralstoff-Präparate hinzu. In den Fertigfuttern, besonders für Hunde und Katzen, sind im Allgemeinen sämtliche essentiellen Nährstoffe in ausreichender Menge vorhanden.

2.1.3 Spurenelemente

2.1.3.1 Definition und Vorkommen

Spurenelemente gehören zu den Mineralstoffen. Sie kommen in sehr geringer Konzentration im Körper von Mensch und Tier vor. Dementsprechend besteht auch bei der Nahrungsaufnahme nur ein sehr geringer Bedarf an Spurenelementen. Es gibt akzidentelle Spurenelemente, die biologisch unwichtig sind, und nur zufällig mit der Nahrung aufgenommen werden, und essentielle Spurenelemente, die für die Vitalfunktionen im menschlichen und tierischen Körper unentbehrlich sind. Verabreicht werden diese als Nahrungsergänzung meist in Form von Mineralstoffmischungen. Mangelhafte Aufnahme bestimmter Spurenelemente äußert sich in spezifischen Mangelerscheinungen. Ebenso bewirkt eine Überversorgung bestimmte Krankheitsbilder.

Spurenelemente kommen sowohl im Boden als auch in Pflanzen in unterschiedlichster Konzentration vor. Durch die Nahrungskette kommt es zur Anreicherung in tierischen Lebens- und Futtermitteln.

2.1.3.2 Wirkung

Spurenelemente können ihre Wirkung nur in ionisch gelöster oder komplexgebundener Form entfalten. Als für den Menschen wichtige Spurenelemente, die vor allem katalytische Funktionen bei lebenswichtigen enzymatischen Prozessen erfüllen, gelten laut WHO Zink, Magnesium, Fe^{2+} , Kobalt, Kupfer, Chrom, Selen und Molybdän. Des Weiteren ist die Aufnahme von Zinn, Silizium, Mangan, Nickel, Cadmium, Vanadium, Jod und Fluor essentiell.

So ist zum Beispiel Zink ein essentieller Baustein unserer Abwehrzellen. Zinkmangel führt deshalb zu mangelhafter Immunabwehr, indem die Lymphknoten atrophieren, eine Lymphozytopenie entsteht, sich das Verhältnis zwischen Lymphozyten und

Phagozyten verschiebt, die T-Zell- und B-Zell-abhängige Immunantwort nur noch unzureichend ablaufen kann und auch der „Natural Killercell“-Spiegel abnimmt. Deshalb hat es sich als erfolgreich erwiesen immunsupprimierten Menschen und Tieren Zink zu verabreichen. Wichtig dabei ist die Dosis, in der es verabreicht wird. Beim Menschen werden unterschiedliche Tagesdosen in Abhängigkeit der Ursache des Zinkdefizits propagiert. Sie liegen zwischen 40 und 150 Milligramm pro Tag. In jedem Fall ist bei Mensch und Tier darauf zu achten, dass die Dosis nicht zu hoch gewählt wird, denn das kann zu unerwünschten Nebenwirkungen wie Serumcholesterol-Anstieg aber auch zu negativen Effekten auf die Immunantwort führen. Bei Versuchen an Kindern, die an Shigellose erkrankt waren, stellten RAHMAN et al. (2005) fest, dass durch tägliche orale Zink-Aufnahme (20 mg pro Tag) der Zink-Serum-Spiegel, im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Zink-Supplementierung, signifikant erhöht war. Des Weiteren verzeichneten sie eine signifikante Erhöhung der zirkulierenden B-Lymphozyten und Plasmazellen sowie eine verbesserte Serokonversion von Shigella-spezifischen Antikörpern.

RAYMAN (2004) konstatiert, dass eine Supplementierung von Selen, durch mit Selen angereicherte Hefen, positiven Einfluss auf die Immunantwort, auf HIV-Infektion und auf die Prävention von Krebs ausübt.

Die genaue Wirkung der meisten anderen Spurenelemente auf das Immunsystem bedarf noch der detaillierten Untersuchung.

2.1.3.3 Anwendung in der Human- und Tiermedizin

Die im Boden vorkommenden Spurenelemente können direkt über die pflanzliche Nahrung oder indirekt durch Anreicherung in der Nahrungskette von Mensch und Tier aufgenommen werden. Die Anreicherung in der Nahrungskette kann wiederum auf natürlichem Wege, durch pflanzliche Kost und Aufnahme von Erde und ähnlichem, erfolgen oder aber durch Zugabe von Mineralfutter zur Ration. Natürlich gibt es auch Nahrungs- beziehungsweise Futtermittel, die mit Spurenelementen angereichert sind, wie zum Beispiel fluoridiertes Trinkwasser oder jodiertes Salz. Präparate zur Zink-Supplementierung sind im Handel käuflich und finden bereits bei vielen Menschen Anwendung. In der Tiermedizin hat sich eine Zink-Verabreichung zur Unterstützung der Immunabwehr noch nicht durchgesetzt, eher findet es bei Zink-responsiver Dermatitis Anwendung.

2.1.4 Andere immunologisch wirksame Nahrungsergänzungstoffe

2.1.4.1 Definition und Vorkommen

Die so genannten PUFAs (polyunsaturated fatty acids) sind eine sehr beliebte Nahrungs- beziehungsweise Futterergänzung. Zu ihnen zählen die Linolsäure und die Linolensäure, die essentielle Nahrungsbestandteile für den Menschen und die meisten Tierarten darstellen. Besonders hohe Gehalte an der wichtigsten ungesättigten Fettsäure, der Omega-3-Fettsäure, findet man in Fischöl, verschiedenen Algen und verschiedenen Pflanzenölen wie Leinöl oder Rapsöl. Linolsäure kommt vor allem in Sojaöl, Maisöl und Rapsöl vor.

2.1.4.2 Wirkung und Anwendung in der Human- und Tiermedizin

In größeren Mengen aufgenommen bewirken nachweislich vor allem die Omega-3-Fettsäuren positive Effekte auf das Immunsystem, aber auch auf das Herz-Kreislaufsystem, Haut und Fell. Einige Tiernahrungshersteller entwickelten in den letzten Jahren Futtermittel, die Omega-6- und Omega-3-Fettsäuren in einem bestimmten Verhältnis zueinander beinhalten und dadurch positive Effekte auf Niereninsuffizienz bei Hunden und Katzen ausüben sollen und außerdem die Knochendichte und das Knochen turnover verbessern (MARKWELL et al., 1998; WATKINS et al., 2000; WEHR et al. 2004). Eine Fallstudie von WILLIAMS (1988) zeigt bei zwei Hunden, die an multizentrischem Lymphom erkrankt sind, eine Verbesserung von Habitus und Appetit und eine Minderung der Vergrößerung der peripheren Lymphknoten, Hautknoten, Milz und Tonsillen. Eine neue Studie von PLAT und MENSINK (2005) bestätigt einen entzündungshemmenden Effekt von Omega-3-Fettsäure aus Fischöl. Ob die gleiche Wirkung auch durch Omega-3-Fettsäure aus pflanzlichen Ressourcen erzielt werden kann, ist noch unklar. Eine andere Arbeit von WANG et al. (2004) belegt eine positive Beeinflussung der passiven Immunität von frisch geschlüpften Küken, an deren Mutterhennen eine mit Linolsäure und alpha-Linolensäure angereicherte Ration verfüttert wurde. Diese Fütterung hatte allerdings keine Auswirkungen auf die humorale Immunantwort der Hennen selbst.

2.1.5 **Probiotika**

2.1.5.1 **Definition und Vorkommen**

Für den Begriff „Probiotikum“ gibt es eine Reihe von Definitionen verschiedener Autoren. Sie zielen auf unterschiedliche Kriterien ab und unterliegen einem Wandel im Laufe der Zeit.

„Probiotikum“ kommt aus dem Griechischen und heißt wörtlich übersetzt „für das Leben“. Bereits 1908 erkannte der russische Nobelpreisträger ELI METCHNIKOFF den gesundheitsfördernden Einfluss des häufigen Verzehrs von fermentierten Milchprodukten in der bulgarischen Bevölkerung. Nach ausgiebigen Untersuchungen schrieb er den milchsäurebildenden Mikroorganismen einen positiven Einfluss auf die Darmflora des Menschen zu. Sie sollten im Darm des Menschen „abträgliche Keime“ zurückdrängen und dadurch die Belastung des Organismus durch deren Stoffwechselprodukte reduzieren. Er verwendete in seinen Versuchen ein grampositives Bakterium, das er *Bacillus bulgaricus* nannte, das dem heutigen *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* entspricht. PARKER (1974) benutzte 1974 als Erster den Begriff Probiotika für Substanzen und Organismen, die zum Gleichgewicht der Darmflora beitragen. Immer noch aktuell ist die Definition von FULLER (1989), der Probiotika als „lebende mikrobielle Futterzusätze, die sich vorteilhaft auf das Wirtstier auswirken, indem sie sein intestinales Gleichgewicht verbessern“ (FULLER, 1989) definiert. Die WHO beschreibt 1994 Probiotika im engeren Sinne als „Produkte zur Stabilisierung der Darmflora, die aus einem oder wenigen, genau definierten Mikroorganismus-Stämmen bestehen“ (BUSCH et al., 1999). Ein wichtiges Kriterium ist danach, dass die Mikroorganismen lebend den Dickdarm erreichen. Dazu müssen sie je nach Spezies in bestimmten Mindestmengen aufgenommen werden. SALMINEN et al. (1999) erweiterten die Definition indem sie „mikrobielle Zellzubereitungen oder Bestandteile von mikrobiellen Zellen, die vorteilhafte Auswirkungen auf die Gesundheit und das Wohlergehen des Wirtes haben“ als Probiotika definierten. Somit muss nach heutiger Erkenntnis ein Probiotikum nicht zwingend ein lebender Mikroorganismus sein, denn auch von Zellteilen oder nicht lebenden Mikroorganismen können gesundheitsfördernde Effekte ausgehen (OUWEHAND und SALMINEN, 1998).

OUWEHAND et al. (1999) verlangen von einem Probiotikum einige Soll-Eigenschaften, die es zwingend erfüllen muss, daneben kann es über zusätzliche Eigenschaften

verfügen, die es für einen speziellen Einsatz besonders auszeichnen. Zu den essentiellen Eigenschaften von oral applizierten Probiotika gehören die Resistenz gegen Säuren, Gallenflüssigkeit und Enzyme des Gastrointestinaltraktes, da nur dann ihre biologische Aktivität und ihre Adhäsionsfähigkeit während der Darmpassage erhalten bleibt. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Anwendungssicherheit, das heißt, eine Schädigung der intestinalen Muzinschicht darf nicht erfolgen und jeder probiotische Stamm sollte identifiziert und charakterisiert werden. OUWEHAND beschreibt noch weitere Kriterien für die Anwendungssicherheit von Probiotika, die eingehend in der Dissertation von WEISS (2003) behandelt wurden.

Bei den gebräuchlichen Probiotika handelt es sich vor allem um milchsäurebildende Bakterien, zum Beispiel um verschiedene Stämme von Lactobacillen und Bifidobakterien. Aber auch Enterococcen, Streptococcen, Bacillen, Bacteroides spp. sowie verschiedene Pilze und Hefen können probiotische Wirkungen aufweisen.

Milchsäurebildende Mikroorganismen kommen in sämtlichen so genannten „milchsauren“ Nahrungs- und Futtermitteln vor, wie es Jogurt, Dickmilch, Kefir, Sauerkraut oder Silage sind.

2.1.5.2 Wirkung

Die Mikroflora des menschlichen und tierischen Magen-Darm-Traktes besteht aus Bakterien, Pilzen und Protozoen. Sie setzt sich aus Hunderten von verschiedenen Arten zusammen. Man unterscheidet zwischen der Haupt-, Begleit- und Restflora (BUSCH et al., 1999). Die gesunde Hauptflora besteht vor allem aus Anaerobiern wie Lactobacillen, Bifidobakterien, Bacteroides und Eubakterien.

Man muss zwischen der lokalen Wirkung der probiotischen Mikroorganismen im Darmtrakt selbst und der Wirkung auf den Gesamtorganismus unterscheiden.

Manchen Probiotika, wie zum Beispiel *Lactobacillus rhamnosus* GG, konnte beim Menschen ein positiver Effekt auf das Immunsystem nachgewiesen werden (YOUNG, 2003; ISOLAURI et al., 1995; JUNG, 1999).

Die Hauptwirkung, die bisher in zahlreichen Studien bei Mensch und Tier belegt werden konnte, spielt sich jedoch direkt im Darmtrakt ab.

Milchsäure produzierende Probiotika setzen antimikrobielle Substanzen im Darm frei und bilden einen „Biofilm zum Schutz der Darmschleimhaut“ (BUSCH et al., 1999)

aus. Durch Bildung einer Muzinschicht, in der vor allem die Bakterien der Hauptflora und Immunglobuline vorkommen, wird eine Barriere gegenüber anderen, fakultativ oder obligat pathogenen, Bakterien aufgebaut. Der Einsatz von Lactobacillen dient vor allem der Erhaltung und Wiederherstellung der Eubiose im Darmtrakt.

Probiotika konkurrieren mit den pathogenen Mikroorganismen um die freien Bindungsstellen an der Darmwand. Die Permeabilität der Darmschleimhaut und die Produktion von schädigenden Metaboliten wird durch *Lactobacillus rhamnosus* GG reduziert (YOUNG, 2003; GUPTA et al. 2000). Des Weiteren sollen Probiotika in der Lage sein Toxinrezeptoren der intestinalen Mukosa zu zerstören und die schädliche Wirkung bakterieller Toxine dadurch zu vermindern (CONWAY et al., 1997). Sie können im Darmtrakt zur Bildung flüchtiger Fettsäuren führen, auf die viele Pathogene äußerst empfindlich reagieren. Dadurch wird ihre Keimzahl gesenkt, was wiederum die Produktion von schädlichen Stoffwechselprodukten wie Ammoniak oder biogene Amine, die über die Leber ausgeschieden werden müssen reduziert (GEDEK, 1993). Durch die Produktion von Milchsäure wird der pH-Wert im Darmtrakt gesenkt, was sich wiederum negativ auf das Wachstum der meisten pathogenen Mikroorganismen auswirkt. Des Weiteren können Probiotika sogar in der Lage sein, Bakteriozine, das sind bakterizide Substanzen, zu produzieren.

Es ist bekannt, dass die bakterielle Flora des Gastrointestinaltraktes großen Einfluss auf entzündliche Erkrankungen des Darmes ausübt. Tierversuche haben gezeigt, dass einige Probiotika entzündliche Darmerkrankungen verhindern oder heilen können. Einigen Studien am Menschen haben ebenfalls positive Effekte auf die Besserung von Erkrankungen an chronischer Tränensackentzündung, ulzerativer Colitis oder Morbus Crohn gezeigt (MARTEAU et al., 2001; GIONCHETTIN et al., 2000).

In vitro sind Probiotika in der Lage das Wachstum vieler verschiedener Bakterienarten (*Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*) zu inhibieren (FILHO-LIMA et al., 2000; SILVA et al., 1999).

In vivo kann die orale Aufnahme von Probiotika neben lokalen Effekten im Darm auch auf den gesamten Organismus wirken. So konnten CHRISTENSEN et al. (2002) zeigen, dass Probiotika die dendritischen Zellen, die zu den Antigen-präsentierenden Zellen in der Darmmukosa gehören, positiv beeinflussen. Sie initiieren eine lokale Immunantwort und spielen eine zentrale immunregulatorische Rolle im Gleichgewicht zwischen T-Helferzellen, Th1, Th2 und Th3. Die verschiedenen *Lactobacillus*

Species zeigen sehr unterschiedliche Aktivierungsmuster der dendritischen Zellen. Klar ist, dass nicht alle Probiotika die gleichen immunmodulatorischen Eigenschaften besitzen und dass sie auf manche Parameter gegensätzliche Wirkung zeigen können. Außerdem ist die Beeinflussung der Immunantwort sehr stark dosisabhängig. Die bakterielle DNA besitzt immunstimulierende Sequenzen, die als potente Aktivatoren der angeborenen Immunität fungieren und anti-apoptotische Eigenschaften in der Mukosa des Darmtraktes entwickeln (RACHMILEWITZ et al., 2002).

ISOLAURI et al. (2000) stellten die Hypothese auf, dass Probiotika zur Verhütung oder Therapie von Allergien bei Kindern eingesetzt werden können. Sie führten dazu zwei Studien durch. Babies, die bis zum Beginn der Studie mit Muttermilch ernährt wurden, wurden in zwei Versuchsgruppen, die mit Milchersatz mit Zugabe von Bifidobacterium lactis Bb12 beziehungsweise Lactobacillus rhamnosus GG und eine Placebogruppe, die mit Milchersatz, ohne probiotische Zusätze, ernährt wurden, eingeteilt. Alle Babies wiesen zu Beginn der Studie atopische Ekzeme auf. Nach zweimonatiger Behandlungsdauer konnte eine signifikante Verbesserung der atopischen Dermatitis bei beiden Probiotikagruppen nachgewiesen werden. In der zweiten Studie, die KALLIOMAKI et al. (2001) durchführten, wurde untersucht, ob durch die Verabreichung derselben Probiotika das Auftreten von atopischer Dermatitis bei Säuglingen, die einer erhöhten Risikogruppe angehörten, verhindert werden kann. Dazu wurde das Probiotikum bereits pränatal den werdenden Müttern und nach der Geburt, sechs Monate, lang den Säuglingen verabreicht. 46 % der Placebogruppe entwickelten eine atopische Dermatitis, jedoch nur 23 % der Probiotikagruppen. Die Mechanismen dieser antiallergenen Wirkung konnten bisher nicht geklärt werden. Nach SÜTAS et al. (1996) verbessert Lactobacillus rhamnosus GG die Symptomatik von erwachsenen Patienten mit atopischer Dermatitis ebenfalls wesentlich. Während in einer Studie von HELIN et al. (2002) die Applikation von Lactobacillus rhamnosus GG bei Teenagern und jungen Erwachsenen mit Allergien gegen Birkenpollen oder Apfelblütenpollen keine Wirkung zeigte.

2.1.5.3 Anwendung in der Human- und Tiermedizin

Probiotika können sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch eingesetzt werden. Es gibt Einzel- und Kombinationspräparate. Während beim Menschen und beim Kleintier meist gesundheitsfördernde Effekte erzielt werden sollen, stehen bei

Nutztieren leistungssteigernde Effekte wie die Verbesserung der Gewichtszunahme oder der Futtermittelverwertung im Vordergrund.

In der Humanmedizin werden Probiotika vor allem zur Begleittherapie bei viral oder bakteriell induzierten Durchfallerkrankungen eingesetzt, aber auch als Prophylaxe bei erhöhter Krankheitsanfälligkeit aufgrund einer geschädigten Darmflora durch Antibiose, HIV-Infektion oder bei chirurgischen Eingriffen. Auch als Prophylaxe von Colon-Karzinomen gewinnen sie immer größere Bedeutung (GOLDIN, 1990). BROWN und VALIERE (2004) berichten von weiteren medizinischen Anwendungsmöglichkeiten für Probiotika wie Gastroenteritiden, entzündliche Darmerkrankungen, Intoleranzen bei der Lactoseverdauung, Immunsuppression, Allergien bei Kindern, Hyperlipidämie, Lebererkrankungen, Infektionen mit *Helicobacter pylori* oder Infektionen des Urogenitaltraktes.

2.1.6 Prebiotika, Synbiotika

2.1.6.1 Definition und Vorkommen

GIBSON und ROBERFROID (1995) definierten Prebiotika als unverdauliche Nahrungsbestandteile, die sich, über die Stimulation von Wachstum und/oder Aktivität bestimmter im Darm siedelnder Bakterienspezies, günstig auf den Wirtsorganismus auswirken. Im engeren Sinne versteht man unter Prebiotika zum Beispiel bestimmte Oligosaccharide, bei denen zwei bis zehn Monosaccharide β -glykosidisch verknüpft sind. Zu den Prebiotika gehören verschiedene Nahrungsbestandteile wie resistente Stärke, Oligofruktose (zum Beispiel Inulin), Oligogalactose aber auch Lactulose und lösliche Ballaststoffe aus Haferkleie und Hülsenfrüchten (HAMM, 2000).

Oligosaccharide kommen in der Natur, vor allem in Obst in Form von Fructo-Oligosacchariden (FOS), aber auch in Gemüse und Hülsenfrüchten vor. Um sie in der Nahrungsmittel- und Futtermittel-Industrie einzusetzen werden sie auch künstlich synthetisiert, was durch Biosynthese aus natürlichen Zuckern oder Polysacchariden geschieht (DELZENNE, 2003).

Eine Übersicht über die verschiedenen Prebiotika, die üblicherweise eingesetzt werden gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Prebiotika, die den hauptsächlichen Marktanteil bilden (nach RASTALL, 2002)

Fructo-Oligosaccharide (FOS)
Inulin
Galacto-Oligosaccharide
Lactulose
Lactosucrose
Isomalto-Oligosaccharide
Sojabohnen-Oligosaccharide
Xylo-Oligosaccharide
Gentio-Oligosaccharide

Als Synbiotika bezeichnet man die Kombination von Prebiotika und Probiotika (GIBSON und ROBERFROID, 1995). Es wird vermutet, dass sich die positiven Eigenschaften beider Stoffgruppen potenzieren, wenn man sie als Kombinationspräparat verabreicht, da das Probiotikum durch die Anwesenheit des Prebiotikums im Verdauungstrakt des Zielorganismus optimale Stoffwechselbedingungen vorfindet. Das Prebiotikum dient im Synbiotikum also vor allem der probiotischen Substanz als Nährsubstrat.

2.1.6.2 Wirkung

Prebiotika können aufgrund ihrer Bindungsstruktur durch körpereigene Enzyme nicht aufgespalten werden, sondern gelangen unverdaut in untere Abschnitte des Verdauungstraktes, wo sie als Substrat für im Darm erwünschte Keime wie zum Beispiel Lactobacillen oder Bifidobakterien fungieren. Durch eine gezielte Förderung der Vermehrung dieser Mikroorganismen wird das Wachstum krankmachender Mikroorganismen gleichzeitig gehemmt (HAMM, 2000). Die saccharolytischen Darmbakterien sind bei Anwesenheit von Prebiotika im Vermehrungsvorteil gegenüber nicht-saccharolytischen Keimen. Durch die Verabreichung geeigneter Prebiotika kann so die Zusammensetzung der Darmflora modifiziert werden, indem die erwünschte Flora stabilisiert und unerwünschte, pathogene oder fakultativ pathogene Bakterien zurückgedrängt werden (GIBSON und ROBERFROID, 1995).

Des Weiteren wird durch die Beeinflussung der Bakterienflora die Immunabwehr des Darmtraktes gestärkt und so das Eindringen pathogener Keime aus der Nahrung erschwert. Es wird diskutiert, ob Prebiotika in der Lage sind Anheftungsstellen für

Pathogene zu besetzen oder ob sie sich direkt an die Pathogene binden und diese dadurch blockieren (KÜHN et al., 1999).

Bei der Verdauung von „resistenter Stärke“ entsteht Buttersäure, eine kurzkettige Fettsäure, die als Schutzstoff der Darmschleimhaut und Energielieferant der Darmzellen fungiert (HAMM, 2000). Allgemein gilt als erwiesen, dass durch die Fermentation der Prebiotika Metaboliten, wie vor allem kurzkettige Fettsäuren (Acetat, Propionat, Butyrat, Lactat u.v.a.), von den Darmbakterien freigesetzt werden, die eine direkte oder auch indirekte Wirkung auf die Darmzellen ausüben. Dadurch käme den prebiotischen Substanzen eine Rolle bei der Kontrolle verschiedener Prozesse wie Mucosaproliferation, Entzündungsprozesse, colorektale Carzinogenese oder Mineralienabsorption im Darmlumen zu (MARTI DEL MORAL, 2003).

Neben der positiven Beeinflussung der natürlichen Darmflora begünstigen Prebiotika außerdem das Wachstum und die Kolonisation des Darmtraktes durch Probiotika. Gelingt es Spezies-spezifische Prebiotika zu finden, wäre eine Komposition effektiver Synbiotika möglich. Zu einigen Prebiotika gibt es bereits Untersuchungen, welche Bakterienarten sie besonders fördern. Eine Studie von BIELECKA et al. (2002) testet in vitro die wachstumsfördernden Eigenschaften von Inulin und Fructo-Oligosacchariden auf verschiedene Bifidobakterien-Subspecies. Die Testergebnisse waren Grundlage für die Zusammenstellung von Synbiotika, die dann in einer in vivo Studie an Ratten verabreicht wurden. Es gab Synbiotika-Gruppen und eine Gruppe, die ausschließlich Fructo-Oligosaccharide bekam. Bei allen Ratten zeigte sich eine Erhöhung der Bifidobakterien-Zahl und eine Erniedrigung des Anteils an Coliformen. Dennoch konnte kein Unterschied zwischen den Synbiotika-Gruppen und der reinen Prebiotikum-Gruppe nachgewiesen werden.

Sehr viel versprechende Ergebnisse konnten mit Synbiotika, basierend auf resistenter Stärke, verzeichnet werden (CRITTENDEN et al., 2001). Die sogenannte resistente Stärke, die gegenüber den Verdauungsenzymen der Säugetiere mit einhöhligen Magen unempfindlich ist, entsteht durch Retrogradation von verkleisterter Stärke wie sie bei der Verarbeitung von stärkehaltigen Lebensmitteln entsteht. Beim Vorhandensein von resistenter Stärke zeigte besonders *Bifidobacterium lactis* gutes Wachstum und überstand außerdem eine simulierte Magen-Darmpassage unversehrt, so dass ein synbiotisches Joghurt mit beiden Bestandteilen kreiert wurde.

Der protektive Einsatz eines Synbiotikums bei Mäusen zum Schutz vor einer Manifestation von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium ist ASAHARA et al. (2001) gelungen.

Um Prebiotika in Zukunft definiert einsetzen zu können, sind Untersuchungen zur Aufklärung der spezifischen Wirksamkeit von Prebiotika gegenüber bestimmten Bakterienstämmen gefordert. Mit steigendem Wissen über die Zusammensetzung der Darmflora wird es immer wichtiger das passende Prebiotikum mit den entsprechend gewünschten modulatorischen Effekten zur vorliegenden Mikroflora zu wählen. So ist nachgewiesen, dass die Darmflora gestillter Säuglinge stark von der mit Milchersatzpräparaten gefütterter Säuglinge abweicht. Die Flora der mit Muttermilch ernährten Kinder besteht hauptsächlich aus Lactobacillen und Bifidobakterien, während die mit Milchersatz ernährten Kinder eine den Erwachsenen ähnliche, vielfältigere Flora aufweisen (HARMSSEN et al., 2000). Da Säuglinge, die mit Muttermilch ernährt werden wesentlich weniger an bakteriellen Infekten leiden, wäre es von Vorteil, Prebiotika zu finden, die die Species von Bifidobakterien und Lactobacillen, die bei muttermilchernährten Babies vorherrschen, fördern.

2.1.6.3 Anwendung in der Tiermedizin

Es liegen noch keine genauen Erkenntnisse der Anwendungsmöglichkeiten von Prebiotika in der Tierernährung vor. Bisher beschränkt sich der Einsatz von Prebiotika auf Jungtiere, deren Darmflora stabilisiert werden soll, um so vor Infektionen zu schützen und bei Nutztieren eine frühe, effiziente Verwertung der Nahrungsbestandteile zu fördern. SCHLEY und FIELD (2002) postulieren auch einen immunstimulierenden Effekt von Prebiotika, der sich vor allem in der Modulation von Immunparametern im GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue), sekundären lymphatischen Geweben und auch der peripheren Zirkulation zeigt.

In der vorliegenden Studie sollte deshalb die Wirkung von Lactoferrin, einer prebiotisch wirksamen Substanz, auf neonatale Hundewelpen untersucht werden.

2.1.7 Lactoferrin – eine prebiotisch wirksame Substanz

Lactoferrin ist ein eisenbindendes Protein. Es ist nahe verwandt mit dem Plasma-Protein Transferrin, das für den Eisentransport im Blut verantwortlich ist.

1960 wurde es von GROVES (1960) und JOHANSSON (1960) aus humaner Milch isoliert und in der Zwischenzeit in der Milch verschiedener anderer Säugetiere (Maus, Rind, Pferd, Ziege, Schwein) nachgewiesen.

In der Human- und Veterinärmedizin wird es seit einiger Zeit zur positiven Beeinflussung der Darmflora sowie zur Steigerung von Wachstum und Immunabwehr eingesetzt. Nicht für alle Tierarten gelten vergleichbare Effekte. Aus diesem Grund wurde die vorliegende Studie an Beaglewelpen durchgeführt, um die Auswirkungen von Lactoferrin auf neonatale Hundewelpen zu untersuchen.

2.1.7.1 Biochemische Struktur und natürliches Vorkommen

Lactoferrin ist ein eisenbindendes Glycoprotein der Transferrin-Familie. Es besteht aus einer einsträngigen Aminosäurenkette, die zweilappig gefaltet ist, und zwei N-glycosidisch gebundenen Glykanen. Die beiden Lappen bestehen aus homologen Sequenzen. Jeder Lappen ist in zwei Domänen unterteilt, zwischen denen sich die Bindungsstelle für ein dreiwertiges Eisen-Ion (Fe^{3+}) befindet. In Anwesenheit eines Bicarbonat-Ions oder eines Carbonat-Ions kann jeder Lappen ein Fe^{3+} -Ion reversibel binden (BROCK, 2000; NAIDU, 2000). Das gesättigte Lactoferrin-Molekül trägt zwei Eisen-Ionen. In eisenreichen Lösungen kann es auf der Moleküloberfläche zusätzliche Eisen-Ionen binden (NAGASAKO, 1993). Die Lappen bilden eine Alpha-Helix-Struktur. Durch die Eisenaufnahme beziehungsweise -abgabe verändert sich die Struktur des Lactoferrins und es liegt als offenes beziehungsweise geschlossenes Molekül vor. Die geschlossene Form ist resistenter gegen Proteolyse. Vermutlich aufgrund einer basischen N-terminalen Region kann sich Lactoferrin „pseudospezifisch“ an saure (negativ geladene) Moleküle wie Heparin und verschiedene Zell-Oberflächen-Moleküle binden. Das Molekulargewicht liegt bei etwa 80 Kilodalton. Die Aminosäuresequenzen des Lactoferrins von unterschiedlichen Spezies zeigen Abweichungen von bis zu 30 %. Humanes und bovines Lactoferrin zeigen eine große Homologie (NORRIS et al. 1982).

Im Körper vorliegendes Lactoferrin ist zu 15 bis 20 % mit Eisen gesättigt und wird als holo-Lactoferrin bezeichnet. Wenn die Eisensättigung weniger als 5 % beträgt, wird

es als apo-Lactoferrin bezeichnet (STEIJNS und VAN HOOIJDONK, 2000). Die hohe Eisen-Affinität des Lactoferrins bleibt auch bei niedrigem pH-Wert erhalten. Erst bei pH-Werten unter 4 erfolgt die Freisetzung des Eisens. Diese Tatsache ist für die physiologischen Funktionen von Lactoferrin bei septischen Vorgängen von Bedeutung, da in diesem Fall niedrige pH-Werte vorliegen.

Die meisten exokrinen Sekrete (Milch, Tränenflüssigkeit, Speichel, Galle, Pankreassaft u.a.) beinhalten apo-Lactoferrin.

Als erstes wurde Lactoferrin in der Milch, in der es in hohen Konzentrationen vorkommen kann, nachgewiesen. Die Konzentration in der Milch ist von der Tierart abhängig und des Weiteren von der Laktationsphase (MASSON und HEREMANS, 1971). Heute ist bekannt, dass es im menschlichen Körper hauptsächlich in zwei Reservoiren vorliegt, einem stationären Pool auf den Schleimhautoberflächen und einem zirkulatorischen Pool in den polymorphkernigen, neutrophilen Granulozyten (PMN) (NAIDU, 2000). Eine geringe Blutplasmakonzentration ist nachweisbar. Diese resultiert aus der Degranulation der neutrophilen Granulozyten, in deren Granula das Lactoferrin gespeichert ist (BROCK, 2000). Bei Infektionen und Entzündungen steigt die Konzentration durch vermehrte Degranulation an.

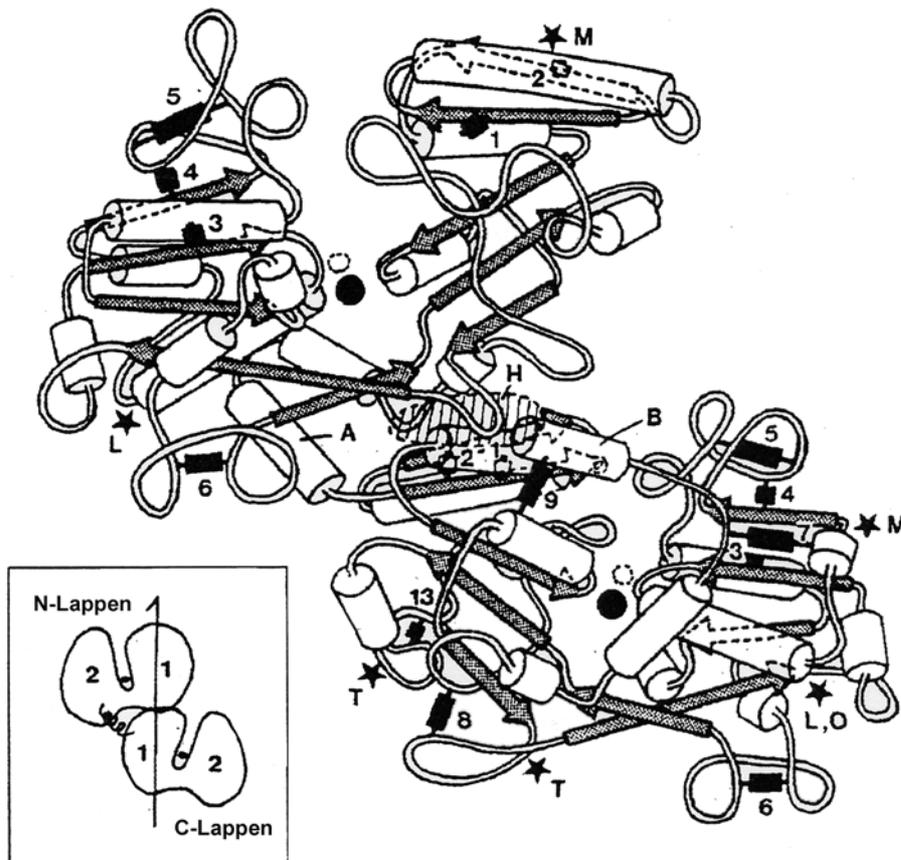


Abbildung 1: Schematische Struktur eines Lactoferrin-Moleküls (nach NAIDU, 2000)

2.1.7.2 Metabolismus von Lactoferrin:

Im Verdauungstrakt von Tier und Mensch kann Lactoferrin abgebaut werden, deshalb erreicht nur ein Teil unversehrt den Darmtrakt. Eine Hydrolyse durch Pepsin oder saure Proteasen im Magen setzt Lactoferricin, eine antimikrobielle Sequenz des N-terminalen Lappens, frei. Dieses verfügt über eine starke biologische Aktivität (WEINBERG, 2001). In erster Linie weist Lactoferricin eine bakterizide Wirkung auf.

Bei der Elimination des Lactoferrins aus dem Plasma spielt die Leber eine zentrale Rolle. Es wird durch spezifische Rezeptoren im endothelialen Retikulum der Leber aufgenommen und abgebaut, wobei die Abbauprodukte über die Galle ausgeschieden werden (MCABEE und ESBENSEN, 1993).

Lactoferrin-Rezeptoren konnten im Intestinaltrakt (IYER und LÖNNERDAL, 1993), sowie in Zellen, die der Immunabwehr dienen, wie Lymphozyten und dem Monozyten-Makrophagen-System (BIRGENS et al., 1984) nachgewiesen werden. Des Weiteren

befinden sich auf neutrophilen Granulozyten (EDA et al., 1997) aber auch auf Bakterien (BENNETT und DAVIS, 1981) Lactoferrinrezeptoren. Die genauen Mechanismen und Aufgaben der Rezeptoren sind zwar noch ungeklärt, aber es wäre denkbar, dass Lactoferrin über die Rezeptoren immunologische Vorgänge beeinflusst.

2.1.7.3 Wirkung

Lactoferrin spielt bei vielen physiologischen Vorgängen eine regulatorische Rolle.

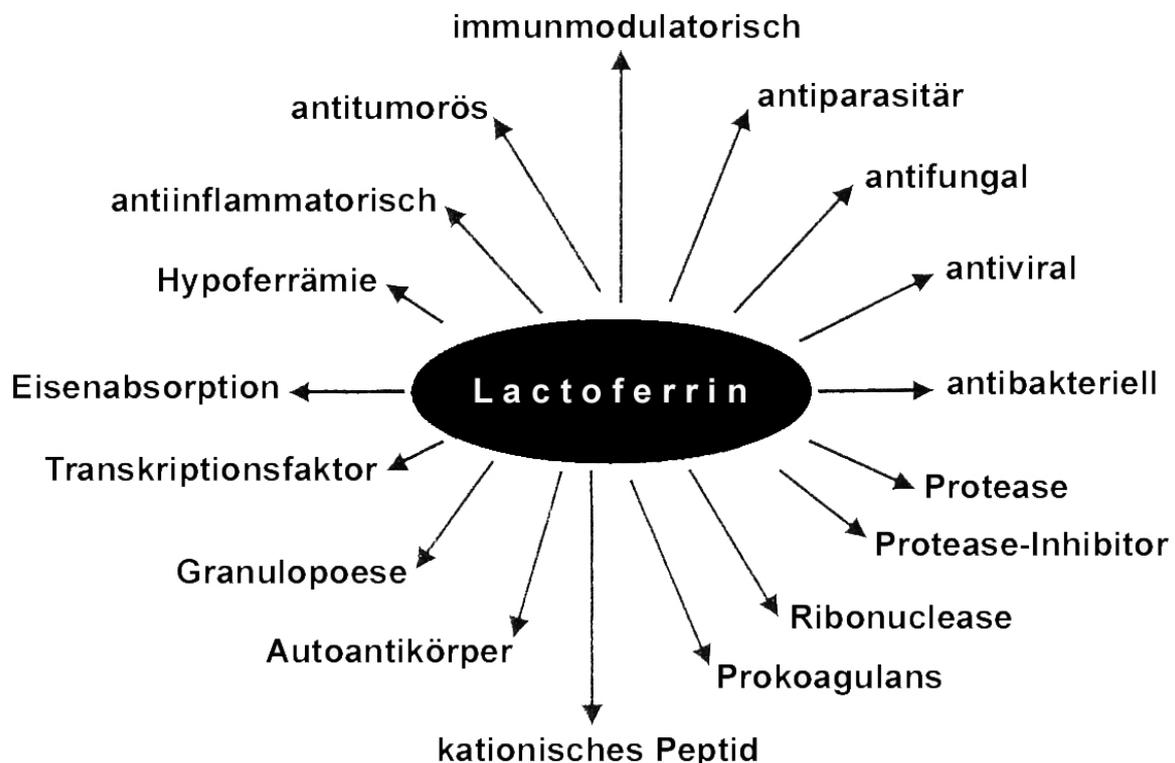


Abbildung 2: Mögliche Funktionen von Lactoferrin (nach BROCK, 2002)

2.1.7.3.1 **Beeinflussung des Eisen-Metabolismus**

Die strukturelle und biochemische Ähnlichkeit zu Transferrin legte die Vermutung nahe, dass Lactoferrin eine fundamentale Rolle im Eisen-Metabolismus als Transportmolekül spielt. Bisher ist der Nachweis dieser Theorie noch nicht hinreichend gelungen. Unter physiologischen Bedingungen findet man, wenn überhaupt, Lactoferrin nur in sehr geringen Konzentrationen im Blut und im Gewebe. Im Gegensatz dazu scheint bei Entzündungsprozessen die erhöhte Freisetzung von Lactoferrin aus neutrophilen Granulozyten den Eisenmetabolismus zu beeinflussen.

Lactoferrin wurde vor vielen Jahren ein Beitrag zum Ausgleich des bei entzündlichen Prozessen auftretenden Eisenmangels zugesprochen, indem es Eisen aus Transferrinmolekülen herauslösen und es zurück zu den Macrophagen transportieren sollte (VAN SNICK et al., 1974). Die langsame Interaktion, die unter physiologischen pH-Werten zwischen Transferrin und Lactoferrin stattfindet, spricht allerdings gegen diese Theorie. Dennoch scheint Lactoferrin zu einer lokalen Eisenanreicherung im Fall einer Entzündung beizutragen. In dieser Situation fördert der niedrigere pH-Wert den Austausch des Eisens mit Transferrin (BROCK, 2002).

Der derzeitige Stand der Forschung lässt vermuten, dass Lactoferrin zwar keine grosse Rolle beim physiologischen Eisenmetabolismus spielt, bei Entzündungsprozessen aber durchaus einen wichtigen Beitrag leistet. Sein Charakteristikum, Eisen binden zu können, legt die Vermutung nahe, dass es ebenfalls an anderen physiologischen Vorgängen beteiligt ist.

2.1.7.3.2 Antimikrobielle Wirkung

2.1.7.3.2.1 Antibakterielle Wirkung

Die Fähigkeit das Wachstum von Bakterien zu verhindern, ist eine der ersten Eigenschaften, die dem Lactoferrin zugeschrieben wurde. Es gibt verschiedene Wirkungsmechanismen auf denen diese Eigenart beruht.

2.1.7.3.2.1.1 Bakteriostatische Wirkung

Eine der ersten entdeckten Wirkungen von Lactoferrin ist seine Fähigkeit in vitro das Wachstum von Bakterien zu inhibieren (BROCK, 2002). Dies gelingt dadurch, dass Lactoferrin das Eisen, das die Bakterien für ihr Wachstum benötigen, bindet. Es hat sich gezeigt, dass die hohe Eisenbindungsaffinität des Lactoferrins das Wachstum vieler Bakterienarten hemmt oder zumindest reduziert. Durch Zugabe von Eisen kann dieser bakteriostatische Effekt aufgehoben werden. Außerdem gibt es Bakterienspezies, die in der Lage sind das gebundene Eisen mit Hilfe von Lactoferrinrezeptoren wieder herauszulösen oder durch Bildung von Chelatkomplexen die Bindung des Eisens an Lactoferrin zu verhindern und es auf diese Art selbst wieder zu verstoffwechseln (GRAY-OWEN und SCHRYVERS 1996; YU und SCHRYVERS, 2002). Apo-Lactoferrin wird von neutrophilen Granulozyten sezerniert und kann somit auch in vivo das Eisen, das die Bakterien benötigen, binden und deren metabolische Aktivität hemmen.

2.1.7.3.2.1.2 Bakterizide Wirkung

ARNOLD et al. stellten im Jahr 1977 eine bakterizide Wirkung von apo-Lactoferrin fest. Gereinigtes humanes apo-Lactoferrin wurde von ihnen mit verschiedenen Bakterienstämmen inkubiert. Streptococcus mutans und Vibrio cholerae wurden dabei abgetötet. Die Zugabe von Eisen änderte die Ergebnisse nicht. In späteren Jahren (1980/81) arbeitete die Arbeitsgruppe um ARNOLD daran, den Grund für die bakterizide Wirkung des Lactoferrins zu entschlüsseln, konnte aber keine Zusammenhänge zwischen der Morphologie der Bakterien und deren Empfindlichkeit gegenüber Lactoferrin verzeichnen (ARNOLD et al. 1980; ARNOLD et al., 1981).

Dieser Nachweis der direkten bakteriziden Wirkung konnte von anderen Arbeitsgruppen nicht nachvollzogen werden. Es liegen Hinweise vor, dass der bakterizide Effekt durch die Art der Testdurchführung von ARNOLD hervorgerufen worden sein könnte. In vitro konnte die direkte bakterizide Wirkung bisher nicht eindeutig bewiesen werden (NAIDU, 2000).

2.1.7.3.2.2 Hemmung der bakteriellen Adhäsion

Ein bedeutender Punkt bei der Entstehung einer bakteriellen Erkrankung ist in vivo das Anheften der Pathogene an Zelloberflächen. Substanzen, die diese Adhäsion der Bakterien stören sind daher prophylaktisch sowie therapeutisch sehr wertvoll.

In vitro konnte ein Inhibitionseffekt von Lactoferrin gegenüber der Anheftung von Streptococcus mutans nachgewiesen werden (VISCA et al., 1989). 1997 untersuchten ALUGUPALLI und KALFAS (1997) den Mechanismus der Adhäsionshemmung durch Lactoferrin anhand verschiedener Bakterien. Sie fanden Hinweise darauf, dass die Bindung von Lactoferrin sowohl an die Bakterien als auch an das Substrat entscheidend für seine inhibitorische Wirkung ist.

2.1.7.3.2.2.1 Lactoferricin

Lactoferricin ist eine antimikrobiell wirkende Sequenz von Lactoferrin, die in der N-terminalen Region sitzt. Es entsteht durch die im Magen mittels Pepsin stattfindende Spaltung des Lactoferrins. Seine bakterizide Aktivität ist höher als die von intaktem Lactoferrin (TOMITA et al., 1994; BELLAMY et al. 1992). Es ist gegen gramnegative und grampositive Bakterien wirksam. Die Mechanismen dieser Wirkung sind derzeit noch nicht bekannt. Vermutet wird, dass Lactoferricin nach der Bindung an die Bakterien zur Cytoplasmamembran gelangt und diese beschädigt.

Dafür wird ein Kationen-Effekt verantwortlich gemacht. Lactoferricin besteht aus 18 Aminosäureresten, die durch eine Disulfid-Brückenbindung zwischen zwei Cysteinresten zu einer Schleife geformt werden. Sie enthält viele basische Reste und scheint sich auf der Oberfläche des Moleküls zu befinden. Dadurch ist eine Interaktion mit den Zellmembranen von Bakterien möglich. Es gibt einige andere Proteine mit ähnlicher kationischer Natur wie Magainin, Cecropine, Defensine oder Indolicidin. Alle besitzen eine hohe Affinität sich an negativ geladene Elemente in der Bakterienzellmembran zu binden. Negativ geladene Elemente sind bei gramnegativen Bakterien die Lipopolysaccharide (LPS), bei grampositiven Bakterien die Teichoinsäure (VORLAND et al., 1999). Sie besitzen häufig die Fähigkeit die Zellwand von Bakterien zu penetrieren. Besonders die Zellwand von gramnegativen Bakterien kann destabilisiert werden. Dadurch kommt es zur Abgabe von Lipopolysacchariden aus den Bakterien und zur Bindung von Lactoferrin oder der anderen Kationen an die LPS und zur Erhöhung der Membranpermeabilität (ELLISON und GIEHL, 1991).

Anders als das native Protein behält Lactoferricin seine bakterizide Wirkung auch unter Zugabe von freiem Eisen bei.

2.1.7.3.2.3 Antivirale Wirkung

Lactoferrin reduziert die Infektiosität einiger Virusstämme. Die Mechanismen sind noch unklar, doch vermutlich werden die Interaktionen zwischen Virus und Zielzelle blockiert. LU et al. (1987) fanden heraus, dass holo-Lactoferrin die Überlebensrate von Mäusen, die mit SFF-Virus infiziert wurden erhöhte und den Virustiter verringerte. Lactoferrin wirkt jedoch nicht direkt antiviral, sondern, indem es die Produktion von „Natural Killerzellen“ steigert. Dieser Mechanismus ist noch nicht vollständig erfasst, fest steht jedoch, dass Lactoferrin nicht direkt sondern über die T-Zellen auf die NK-Zellen wirkt (SHIMIZU et al., 1996). Lactoferrin und Lactoferricin blockieren das Eindringen des Cytomegalievirus in Fibroblasten (ANDERSEN et al., 2001). Das Hepatitis C Virus wird hingegen lediglich vom intakten Lactoferrin inhibiert (IKEDA et al., 2000). Für eine Aktivität gegen Herpesvirus wird vor allem der N-Lappen verantwortlich gemacht (SICILIANO et al., 1999, GIANSANTI et al. 2002).

2.1.7.3.2.4 Antiprotozoische Wirkung

Die antiprotozoische Wirksamkeit des Lactoferrins ist noch nicht hinreichend untersucht. Doch konnte in Tierversuchen nachgewiesen werden, dass die Infektiosität von *Toxoplasma gondii*- und von *Eimeria stiedai*-Sporozoitien durch bovines Lactoferrin reduziert werden konnte (OMATA et al., 2001). Vermutet wird ein Effekt des Lactoferrins auf die Zellmembran der Parasiten und/oder eine Interaktion mit dem Wirtsgewebe. So vermindert in vitro die Inkubation von Fibroblasten mit Lactoferrin zum Beispiel die Fähigkeit von *Plasmodium berghei* sich an die sauren Oberflächenmoleküle der Fibroblasten zu binden (SHAKIBAEI und FREVERT, 1996). Eine weitere antiparasitäre Wirkung scheint auf der Konkurrenz von Lactoferrin und der Parasiten um Eisen zu beruhen, zum Beispiel bei *Pneumocystis carinii* (CIRIONI et al., 2000). Andere Protozoen wie *Tritrichomonas foetus* scheinen dagegen Lactoferrin als spezifischen Eisen-Donor zu nutzen (TACHEZY et al., 1996). Weitere Arbeiten auf diesem Gebiet wären sicherlich von Interesse.

2.1.7.3.2.5 Antimykotische Eigenschaften

Lactoferrin und Lactoferricin besitzen gegenüber Pilzen eine antimikrobielle Aktivität. Der Mechanismus dieser antimykotischen Wirkung ist bisher noch nicht entschlüsselt. In vitro konnte beobachtet werden, dass die Zellmembran von *Candida albicans* durch Lactoferricinzugabe zerstört wurde. Beim Meerschweinchen konnte durch Verabreichung von Lactoferrin eine eindeutige Verbesserung der Symptome einer Erkrankung mit *Trichophyton mentagrophytes* erzielt werden.

WAKABAYASHI et al. (1996) entdeckten, dass Lactoferrin synergistisch mit Antimykotika, die Azol-Struktur besitzen, wirkt. Bei Anwesenheit von Lactoferrin oder Lactoferricin konnte die minimale Hemmkonzentration von Clotrimazol und Ketokonazol auf ein Viertel bis ein Sechzehntel der sonst benötigten Menge gesenkt werden.

2.1.7.3.3 Antiinflammatorische Wirkung

Abgesehen von der möglichen Rolle Lactoferrins beim Eisenmetabolismus während eines Entzündungsprozesses gibt es einige Arbeiten, die einen direkten Einfluss Lactoferrins auf das Entzündungsgeschehen belegen. Man weiß, dass Lactoferrin an

bakterielle Endotoxine (Lipopolysaccharide = LPS) binden kann, die als wichtige Mediatoren bei bakteriellen Entzündungsprozessen dienen (MIYAZAWA et al., 1991). Eine Folge davon ist, dass die Interaktion von LPS mit den Rezeptoren gestört wird und dadurch die Freisetzung von Cytokinen reduziert wird (BAVEYE et al., 1999). Eine andere wichtige Rolle von Lactoferrin bei Entzündungsgeschehen ist die Bindung freien Eisens, was präventiv gegen die Bildung von freien Radikalen in den Phagozyten wirkt (TRIF et al., 2001; GUILLÉN et al., 2000). Des Weiteren ist Lactoferrin in der Lage Hautentzündungen zu verringern, indem es die Migration von Langerhanszellen inhibiert (GRIFFITHS et al., 2001).

Einige Studien belegen die Wirksamkeit von Lactoferrin beim Schutz vor durch *Helicobacter felis* verursachter Gastritis (DIAL et al., 2000), bei der Prävention von Endotoxämie (ZAGULSKI et al., 1989) und als Schutz der Darmflora bei der Auseinandersetzung mit LPS (KRUZEL et al., 2000).

Die Wirkung des Lactoferrins bei Entzündungen scheint auf einer Kombination aus verschiedenen Mechanismen zu beruhen: zum einen die Bindung von freiem Eisen und bakteriellen Endotoxinen, zum anderen auf der Verminderung der Produktion von Cytokinen und der Hemmung der Bildung freier Radikale.

2.1.7.3.4 Antiallergene Eigenschaften

Einige Studien belegen, dass Lactoferrin möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Prävention allergischer Entzündungen in Haut und Lunge aufweist. Nachdem Ratten metallischen Aerosolen ausgesetzt waren, zeigte sich eine erhebliche Erhöhung des Lactoferrinspiegels in der Lunge (GHIO et al., 1998). Weiter konnten von VAN DE GRAAF et al. (1991) bei Asthma erhöhte Lactoferrinlevel im Bronchialsekret festgestellt werden. In einem Modellversuch mit allergisch bedingtem Asthma bei Schafen konnte gezeigt werden, dass die Luftwegsobstruktion und Hyperresponsivität in der Spätphase der Erkrankung bei Behandlung mit Lactoferrin-Aerosol ausblieb (ELROD et al., 1997). Der Mechanismus der in vivo Wirkung des Lactoferrins wurde dabei nicht geklärt, doch zeigte die gleiche Studie, dass in vitro eine Destabilisierung der aktiven Form der Tryptase, ein hochpotenter Auslöser von Asthma, durch Lactoferrin statt fand. Auch bei allergischen Hautreaktionen ist Lactoferrin ein wichtiger Regulator. Es wird in der Epidermis der intakten Haut produziert (CUMBERBATCH et al., 2000). Bei allergischen Prozessen steigt der Lactoferrinspiegel in der Haut (LERCHE et al., 1988; ZWEIMANN et al., 1990).

Rekombiniertes Mäuse-Lactoferrin kann nach WARD et al. (1997) und CUMBERBATCH et al. (2000) die allergeninduzierte Hautentzündung bei Mäusen verhindern. Es inhibiert dosisabhängig die allergisch induzierte Migration von Langerhanszellen aus der Epidermis und die Akkumulation von dendritischen Zellen in den regionären Lymphknoten. Beides wird hervorgerufen durch Cytokine, die in den Langerhanszellen produziert werden und durch Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), das von Keratinozyten produziert wird (CUMBERBATCH und KIMBER, 1992, 1995; CUMBERBATCH et al., 1994, 1997). Die Studien zeigen, dass eine Interaktion von Lactoferrin mit den Keratinozyten vorliegt, da dadurch direkt die Reduktion von TNF- α , das der ausschlaggebende Faktor für die Migration der Langerhanszellen ist, hervorgerufen wird. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Keratinozyten spezifische Lactoferrinrezeptoren haben. Der gleiche Mechanismus konnte von GRIFFTHS et al. (2001) auch beim Menschen beobachtet werden. Es zeigte sich, dass rekombinantes humanes Lactoferrin ebenfalls protektive Effekte gegenüber allergeninduzierten Hautentzündungen aufweist. Es hemmte allergische Hautreaktionen indem es die Migration der Langerhanszellen inhibierte und die lokale entzündliche Hautreaktion verminderte.

Die Entdeckung, dass Lactoferrin die TNF- α -medierten allergischen Immunantworten in der Haut unterbricht, lässt vermuten, das Gleiches auch im Gastrointestinaltrakt oder anderen Schleimhäuten, in denen Lactoferrin produziert wird, erfolgen kann.

2.1.7.3.5 Immunmodulation

Einer der ersten Abwehrmechanismen des Säugetierkörpers bei Kontakt mit einem Antigen ist die Abwehr durch Sekrete der Schleimhautoberflächen. Diese Sekrete beinhalten eine Vielzahl von antimikrobiell wirksamen Proteinen und Peptiden, die den Wirt gegenüber mikrobiellen und anderen Umwelteinflüssen schützen (HANCOCK und DIAMOND, 2000). Aufgrund seines Vorkommens in den meisten dieser Schleimhautexkrete und seiner antimikrobiellen Eigenschaften wird die Rolle von Lactoferrin in diesem lokalen Immunsystem diskutiert.

Lactoferrin übt viele verschiedene Wirkungen auf das Immunsystem aus, die sowohl in vitro als auch in vivo nachgewiesen wurden. Einige dieser Beobachtungen sind Phänomene, deren zugrunde liegende Mechanismen absolut ungeklärt sind.

Lactoferrin scheint, durch eine Modulation der Eisenvorräte in der Milz, eine Typ 1 T-Zellantwort hervorzurufen (BROCK, 2002). Die meisten immunologischen Mechanismen sind stark von Zell-Zell Interaktionen abhängig. Die Eigenschaft von Lactoferrin an Zelloberflächen binden zu können, legt die Vermutung nahe, dass es auf diese Art diese Parameter beeinflussen kann und dadurch eine Steigerung der Immunantwort auslöst. Andere Studien belegen, dass es sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung von Immunzellen beeinflussen kann (WARD et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Lactoferrin sowohl positive als auch negative Effekte auf die Myelopoese, die Produktion eines Faktors, der das Granulozyten-Makrophagen-System stimuliert (HANGOC et al., 1991; SAWATZKI und RICH, 1989) und die Lymphozytenproliferation ausübt (BI et al., 1997; RICHIE et al., 1987). Neben den Auswirkungen auf das Zellwachstum unterstützt Lactoferrin auch die Differenzierung von unreifen B-Lymphozyten sowie T-Lymphozyten (ZIMECKI et al., 1995, 1991). In einer experimentellen Arbeit kam es unter Applikation von Lactoferrin zu einer erhöhten Produktion von „Natural Killerzellen“, CD4- und CD8-T-Zellen im Darmtrakt von gesunden sowie krebserkrankten Mäusen (LIGO et al., 1999; WANG et al., 2000; KUHARA et al., 2001). In einer weiteren Studie zeigten sowohl die Peyerschen Platten als auch die Splenozyten unter Einfluss von Lactoferrin eine erhöhte Proliferation von Immunglobulin A (IgA) und Immunglobulin G (IgG). Antikörper gegen Lactoferrin (IgA und IgG) konnten im Darmsekret nachgewiesen werden. Der Gesamt-Immunglobulintiter im Intestinalsekret war höher als in der Vergleichsgruppe, im Serum fanden sich keine Anti-Lactoferrin Antikörper (DEBBABI et al., 1998). Diese Ergebnisse legen nahe, dass Lactoferrin einen immunstimulierenden Einfluss auf das lokale Mukosa-abhängige Immunsystem des Darmtraktes ausübt, der durch die Eigenart des Lactoferrins zustande kommt, sich an die Zellen der intestinalen Schleimhaut binden zu können. WANG und KUHARA (2000, 2001) wiesen im Dünndarm von Mäusen die Steigerung der Sekretion von Interleukin (IL-18) durch Lactoferrin nach. NAKAJIAMA et al. (1999) konnten neben der erhöhten Interleukinsekretion auch eine Anregung der Interferon-gamma-Produktion beobachten.

Aufgrund der bisherigen Studien kann der Schluss gezogen werden, dass Lactoferrin die intestinale Immunabwehr verbessert und eine erhöhte Cytotoxizität im Darm erreicht. Da im adulten Organismus vermutlich nur eine geringe Menge des aufgenommenen Lactoferrins im Gastrointestinaltrakt resorbiert werden kann, geht

man davon aus, dass die in den intestinalen Epithelzellen und den GALT-Zellen (GALT = Gut Associated Lymphoid Tissue) vorhandenen Lactoferrinrezeptoren eine entscheidende Rolle spielen. Demnach könnten die durch Lactoferrin aktivierten Darmzellen mittels der Freisetzung von Cytokinen die zirkulierenden Leukozyten beeinflussen. Ein direktes Einwirken auf die Leukozyten des GALT erscheint ebenso möglich (TOMITA et al., 2002). Eine Wanderung der Leukozyten im Organismus und damit verbunden die Produktion systemischer Immunglobuline ist anzunehmen.

YAMAUCHI et al. (1998) untersuchten die Effekte von Lactoferrin auf das humane Immunsystem. Lactoferrin steigerte die Phagozytoseaktivität und die Superoxidproduktion der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten.

2.1.7.3.6 Lactoferrin und Tumorgenese

Eine ganze Reihe wissenschaftlicher Arbeiten geht davon aus, dass Lactoferrin in vitro inhibierende Eigenschaften bei der Tumorgenese aufweist. Die vermuteten Mechanismen sind verschiedener Art, doch sie beruhen alle nicht auf der Eisenbindung durch Lactoferrin. Mögliche antikarzinogene Mechanismen sind die Regulation der Aktivität von „Natural Killerzellen“ (DAMIENS et al., 1998), die Modulation der Expression von G1-Protein (DAMIENS et al., 1999), die Hemmung der VEGF(165)-medierten Angiogenese (NORRBY et al., 2001) und die Steigerung der Apoptose (YOO et al., 1997). Einige Studien belegen, dass Lactoferrin die Entstehung von experimentell hervorgerufenen Tumoren hemmt. So zeigte die Arbeit von TSUDA et al. (1999), dass die Rate der an durch Applikation von Azoxymethan hervorgerufenen Adenokarzinom erkrankten Ratten durch die Verabreichung von bovinem Lactoferrin von 44 % auf 26 % sank. Bei Mäusen wurde von IIGO et al. (1999) die Metastaserate von Lungenkarzinomen untersucht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe lag eine Reduktion der Metastasierung bei Lactoferringabe abhängig von der Dosis von bis zu 43 % vor. Auch ein protektiver Effekt bei der Entstehung von hepatozellulären Karzinomen bei Patienten, die an chronisch aktiver Hepatitis erkrankt waren konnte in einer Pilotstudie nachgewiesen werden (TSUDA et al., 2002).

2.1.7.3.7 Enzymatische Aktivität

Lactoferrin existiert in multiplen Isoformen, von denen einige Ribonuclease-Aktivität besitzen (FURMANSKI et al., 1989; DEVI et al., 1994; YE et al., 2000). Die strukturellen Unterschiede dieser Isoformen wurden bisher noch nicht untersucht. SORRENTINO et al. (1999) vermuten einen Zusammenhang zwischen der Komplexbildung von Lactoferrin mit der niedrig molekularen Ribonuclease, die in der Milch und anderen biologischen Flüssigkeiten enthalten ist. Unklar ist in jedem Fall, welche physiologische Rolle diese Aktivität spielt.

QIU et al. (1998) fanden bei Lactoferrin eine Protease-Aktivität. Diese Eigenschaft konnte sowohl bei rekombiniertem als auch nativem Lactoferrin nachgewiesen werden. Die Protease-Aktivität könnte eine weitere Erklärung für die antimikrobielle Funktion von Lactoferrin darstellen.

2.1.7.3.8 Beeinflussung des Blutbildes

ZIMECKI et al. (1998) führten eine klinische Studie am Menschen durch, bei der die Auswirkung von Lactoferrin auf verschiedene Immunparameter untersucht wurde. Es nahmen 17 gesunde Testpersonen teil, denen täglich, oral, 40 Milligramm bovines Lactoferrin über 10 Tage verabreicht wurden. Der Lymphozytengehalt im Serum nahm während dieses Untersuchungszeitraumes zu, während ein leichter Abfall der Neutrophilenzahl zu verzeichnen war. Ein signifikanter Anstieg der unreifen Zellformen war zu verzeichnen, während der prozentuale Anteil an eosinophilen Granulozyten und Monozyten signifikant abnahm. Im Gegensatz zur Lymphozytenproliferation waren diese Veränderungen eher regulatorischer Art, da die Veränderungen auf den individuellen Unterschieden des Blutbildes vor Beginn der Versuchsperiode beruhten. Die Ergebnisse zeigen, dass die orale Gabe von bovinem Lactoferrin beim gesunden Menschen einige Immunparameter regulieren und eventuell den Immunstatus verbessern kann.

2.1.7.4 Anwendungsmöglichkeiten in der Human- und Tiermedizin

Der Einsatz von Lactoferrin ist bisher noch nicht sehr verbreitet, allerdings existieren umfassende Studien über seine Wirkung, von denen die meisten am Menschen und nur wenige an Tieren durchgeführt wurden.

Beim Menschen konnte ein positiver Effekt von Lactoferrin auf die Bildung einer bifidobakterienreichen Darmflora bei untergewichtigen Neugeborenen (KAWAGUCHI et al., 1989), die Verbesserung der dermatologischen Symptome bei Tinea pedis, einer Dermatophyten-induzierten Erkrankung (YAMAMAUCHI et al., 2000), oder gar auf die Verbesserung der Serum-Leberwerte bei Patienten mit chronischer Hepatitis C (TANAKA et al., 1999), nachgewiesen werden. Eine Studie von CHIERICI et al. (1992) zeigte, dass Kinder, die ein Lactoferrin-supplementiertes Milchersatzprodukt bekamen einen signifikant höheren Ferritingehalt im Blut aufwiesen, als Kinder, die mit dem gleichen Präparat, ohne Lactoferrinzusatz, ernährt wurden. Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass Lactoferrin an der Eisenabsorption beteiligt ist.

Die meisten Ergebnisse zum Einsatz von Lactoferrin bei Tieren gibt es auf dem Gebiet der neonatalen Tiere oder der Jungtiere. JOSLIN et al. (2002) stellten zum Beispiel eine stimulierende Wirkung von Lactoferrin, auf das Wachstum und die Entwicklung bei Kälbern fest.

Aufgrund seines immunstimulierenden Effektes (DEBBABI et al., 1998) wäre es denkbar, Lactoferrin zur Verhütung von Infektionskrankheiten oder der Entstehung von Tumoren einzusetzen.

3 MATERIAL & METHODEN

3.1 Versuchsaufbau

Der Fütterungsversuch wurde am Institut für Tierernährung der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Veterinärstrasse und an dessen Außenstelle in Oberwiesenfeld durchgeführt.

Ein Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchs nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 25.5.1998 (BGBl. I S. 1105) wurde bei der Regierung von Oberbayern gestellt und die Genehmigung wurde erteilt.

Für die Studie wurden neonatale Beaglewelpen bis zum Alter von 14 Wochen mütterlos aufgezogen. Ernährt wurden sie mit selbstangemischtem Milchaustauscher, später mit einem Trockenalleinfutter. Milchaustauscher sowie Festfutter wurde in verschiedenen Konzentrationen Lactoferrin zugesetzt.

Folgende Parameter wurden während der Versuchsdauer von 14 Wochen bestimmt:

- Gewichtsentwicklung
- Futteraufnahme (LAUR, 2003)
- Kottrockensubstanz sowie pH-Wert, Laktatgehalt und Ammoniakgehalt des Kotes (LAUR, 2003)
- Rotes und weißes Blutbild
- Gesamt-IgG- und -IgA-Gehalt im Blutplasma (STRODTBECK, 2006)
- Gehalt an IgG gegen Humanes Serum Albumin
- Antioxidativer Statuts des Blutes (SCHWARZER, 2003)

Die weiteren Auswertungen der Ergebnisse von Futteraufnahme, Kottrockensubstanz, pH-Wert, Laktatgehalt und Ammoniakgehalt des Kotes erschienen in der Dissertation von LAUR (2003), während die Ergebnisse zum Gesamt-IgG- und IgA-Gehalt in der Dissertation von STRODTBECK (2006) veröffentlicht werden.

Die Versuchsanordnung zur Bestimmung dieser Parameter wird in dem Abschnitt Material und Methoden der vorliegenden Arbeit beschrieben, da diese Parameter von mir mitbestimmt wurden.

3.2 Versuchstiere

Die Studie wurde mit 32 Beaglewelpen durchgeführt, die aus neun verschiedenen Würfen stammten. Die Fütterungsgruppen bestanden aus acht Welpen pro Gruppe (Tabelle 2).

Tabelle 2: Geschlechter- und Gruppenverteilung der Welpen in vier verschiedenen Fütterungsgruppen und die Anfangsgewichte der Welpen in g KGW

Laufende Nummer	Geschlecht	Fütterungs-Gruppe	Gewicht an Tag 3 (Beginn des Versuches)
1	männlich	Kontrolle	417
2	weiblich	Kontrolle	389
3	männlich	LF 120	454
4	männlich	Kontrolle	382
5	weiblich	Kontrolle	336
6	männlich	LF 120	364
7	weiblich	LF 120	366
8	männlich	LF 30	466
9	weiblich	LF 30	428
10	weiblich	LF 30	367
11	weiblich	LF 60	526
12	männlich	LF 30	473
13	weiblich	LF 30	437
14	weiblich	LF 60	575
15	weiblich	LF 60	513
16	männlich	LF 30	570
17	weiblich	LF 30	528
18	weiblich	LF 30	470
19	männlich	LF 120	520
20	weiblich	LF 120	469
21	weiblich	LF 120	404
22	weiblich	LF 120	325
23	weiblich	LF 120	438
24	männlich	Kontrolle	554
25	weiblich	Kontrolle	533

Laufende Nummer	Geschlecht	Fütterungs-Gruppe	Gewicht an Tag 3 (Beginn des Versuches)
26	weiblich	Kontrolle	544
27	weiblich	Kontrolle	582
28	männlich	LF 60	514
29	männlich	LF 60	474
30	weiblich	LF 60	458
31	weiblich	LF 60	446
32	weiblich	LF 60	490

3.3 Aufzuchtbedingungen

Für die Zeit um die Geburt waren die Mutterhündinnen im Versuchstierbereich des Klinikums Rechts der Isar untergebracht. Die institutseigenen Hündinnen der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik verblieben für die Geburt in den Hundestallungen dieser Klinik. Am dritten Tag nach der Geburt wurden die Welpen von der Mutter getrennt. Bis zur dritten oder vierten Lebenswoche, waren die Welpen, in Wurfkisten untergebracht. Als Unterlage dienten frische Handtücher und Hundedecken (Heiland), die mindestens einmal täglich gewechselt wurden. Um die Körpertemperatur aufrecht zu erhalten wurden die Boxen mit Ferkel-Rotlichtlampen bestrahlt. Im Alter von drei bis vier Wochen wurden sie in größere Ausläufe umgesiedelt, die mit Stroh eingestreut waren. In den Ausläufen befanden sich je nach Gruppengröße eine oder zwei Kisten aus Plastik, die mit Decken (s.o.) ausgelegt waren und den Hunden als Lagerplatz zur Verfügung standen.

Ab der vierten Woche wurde den Welpen außerdem Spielzeug in Form von Bällen, Geflechttauen, Socken, Quietschtieren etc. zur Verfügung gestellt.

Regelmäßig wurde in verschiedenen Lautstärken eine Geräusch-CD von Selgian® abgespielt, um die Tiere mit unterschiedlichen Umwelt-Geräuschen, vertraut zu machen.

3.4 Fütterung

3.4.1 Einteilung der Versuchstiere in vier Fütterungsgruppen

Die Welpen wurden zufällig, nach Geburtsgewicht und Geschlecht randomisiert und in vier verschiedene Fütterungsgruppen (Tabelle 3) zu je acht Welpen eingeteilt.

Tabelle 3: Fütterungsgruppen

Gruppe 1	Kontrollgruppe	Fütterung ohne Zusatz von Lactoferrin
Gruppe 2	30 ppm LF	Fütterung unter Zugabe von 30 ppm Lactoferrin zum jeweils verwendeten Futter
Gruppe 3	60 ppm LF	Fütterung unter Zugabe von 60 ppm Lactoferrin zum jeweils verwendeten Futter
Gruppe 4	120 ppm LF	Fütterung unter Zugabe von 120 ppm Lactoferrin zum jeweils verwendeten Futter

Die Welpen wurden bis zum dritten Tag nach der Geburt bei der Mutter belassen, damit sie die Möglichkeit hatten ausreichend Kolostrum aufzunehmen. Dann wurden sie von der Mutter getrennt und mit Milchaustauscher später mit Trockenfutter gefüttert. Dem jeweiligen Futter wurde den Gruppen entsprechend Lactoferrin in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt.

3.4.2 Futterzusammensetzung

3.4.2.1 Zusammensetzung des Milchaustauschers

Tabelle 4: Zusammensetzung des Milchaustauschers pro 100 g

43 g	Magermilch, 1,5 % Fett (ultraheißerhitzt)
40 g	Speisequark, Magerstufe
10 g	Eigelb
6 g	Sonnenblumenöl
1 g	Mineral-Vitamin-Zusatzfutter, pulverisiert, je nach Fütterungsgruppe Zusatz der spezifischen Menge Lactoferrin

Tabelle 5: Zusammensetzung der Inhaltsstoffe des Milchaustauschers (in g/100 g Milchaustauscher) (Meyer et al. 1986)

in g/100 g	Ra	Rp	Rfe	NfE	Rfa	BE (MJ)
Eigelb	0,08	1,30	1,10	0,07	0	0,5-0,8
Öl	0	0	6,00	0	0	0,23
Quark	0,40	6,80	0,20	1,08	0	0,19
Milch	0,3	1,46	0,04	2,06	0	0,07

in g/100 g	Ra	Rp	Rfe	NfE	Rfa	BE (MJ)
Mineralmix	0,72	0	0	0	0	0
Summe	1,50	9,56	7,34	3,21	0	0,99-1,29

Tabelle 6: Aminosäuregehalte des Milchaustauschers
(in g/100 g Milchaustauscher) (Meyer et al. 1986)

in g/100g	Linol- säure	Ile	Leu	Lys	Met	Cys	Phe	His	Thr	Trp	Val	Arg
Eigelb	0,01	0,07	0,11	0,08	0,04	0,02	0,07	0,03	0,07	0,02	0,10	0,08
Öl	0,66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Quark	0	0,40	0,74	0,62	0,19	0,06	0,37	0,24	0,32	0,07	0,40	0,32
Milch	0	0,09	0,15	0,12	0,04	0,17	0,08	0,04	0,08	0,08	0,61	0,06
Summe	0,67	0,56	1,00	0,82	0,27	0,25	0,52	0,31	1,10	0,17	1,11	0,46

Tabelle 7: Mineralstoff- und Spurenelementgehalt des Milchaustauschers
(in 100 g Milchaustauscher) (Meyer et al. 1986)

in 100g	Ra (mg)	Ca (mg)	P (mg)	Mg (mg)	K (mg)	Na (mg)	Fe (mg)	Cu (mg)	Zn (mg)	Mn (mg)	J (µg)
Eigelb	0,17	14,00	59,00	1,50	14,00	5,00	0,55	0,03	0,46	0	1,00
Öl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Quark	0,40	28,00	76,00	4,00	38,00	14,00	0,20	0	0	0	0
Milch	0,39	49,45	40,85	6,45	43,00	43,00	0,03	0,00	0,22	0,22	0,43
Minmix	0,72	150,00	20,00	3,00	45,00	62,00	0,21	0,40	0,70	0,70	114,0
Summe	1,68	241,45	195,85	14,95	140,0	124,0	0,99	0,43	1,38	0,92	115,43

Tabelle 8: Vitamingehalt des Milchaustauschers
(in 100 g Milchaustauscher) (Meyer et al. 1986)

Pro 100ml MAT	A (IE)	D3 (IE)	E (mg)	B1 (mg)	B2 (mg)	B6 (mg)	B12 (µg)	Biotin (µg)	Nikotin- säure (mg)	Panto- thens. (mg)
Eigelb	370,00	0	0,30	0,03	0,04	0,03	0,20	6,00	0,01	0,37
Öl	0	0	14,00	0	0	0	0	0	0	0
Quark	18,00	0	0	0,02	0,12	0,01	0	0	0,04	0,08
Milch	0	0,01	0,02	0,07	0,82	0,16	1,81	12,90	0,47	1,38
Minmix	300,00	0	0	0	0,52	0,70	0	5,00	1,00	0,05
Summe	688,00	0,01	14,32	0,12	1,50	0,90	2,01	23,90	1,52	1,88

3.4.2.2 Zusammensetzung des Trockenfutters

Tabelle 9: Zusammensetzung des Trockenfutters (Weender Analyse)

in uS (Pellets)	Kontrolle	30 ppm	60 ppm	120 ppm
TS	94,43	94,43	92,70	94,69
Asche (%)	6,38	6,87	6,70	6,39
RP (%)	27,30	26,72	25,60	26,42
Rfa (%)	2,60	2,63	2,20	2,90
Rfe (%)	9,93	10,53	8,60	10,05
Nfe (%)	48,22	47,68	47,00	48,94

Tabelle 10: Mineralstoff- und Spurenelementgehalt des Trockenfutters (in der TS)

	Kontrolle	30 ppm	60 ppm	120 ppm
Ca (g/kg)	11,72	13,54	12,68	12,97
P (g/kg)	4,01	4,25	3,91	3,85
Na (g/kg)	2,56	2,62	2,65	2,47
K (g/kg)	4,17	4,83	4,31	3,87
Zn (mg/kg)	95,18	100,99	101,57	111,85
Cu (mg/kg)	10,16	11,55	12,40	9,87
Mg (mg/kg)	527,70	548,05	504,28	518,14
Fe (mg/kg)	136,96	155,90	164,49	123,06
Mn (mg/kg)	26,40	28,96	26,63	25,90

3.4.3 Fütterungszeiten

In der ersten Lebenswoche wurden die Welpen tagsüber alle drei Stunden, nachts alle vier Stunden gefüttert, so dass sie sieben Mahlzeiten über 24 Stunden verteilt bekamen.

Ab dem achten Tag wurde nachts eine sechsstündige Fütterungspause eingeführt. Tagsüber wurde sechs mal Milchaustauscher verabreicht. Ab Tag 17 wurde nur noch fünf mal täglich gefüttert und eine achtstündige Nachtruhe eingehalten.

Ab der vierten Lebenswoche wurde mit der Beifütterung von Trockenfutter begonnen und somit auf vier Fütterungen täglich reduziert. In der achten Woche wurde der Milchaustauscher abgesetzt und bis zur 14. Woche dreimal täglich gefüttert.

Frisches Wasser stand ab Beginn der Beifütterung ständig ad libitum zur Verfügung.

3.4.4 Fütterungstechnik

Die Welpen wurden die ersten zwei Tage nach der Geburt bei der Mutter belassen, um die Aufnahme des Kolostrums zu gewährleisten. Am Tag drei wurden sie von der Mutter getrennt und in die verschiedenen Gruppen aufgeteilt.

Während der ersten 21 bis 28 Tage wurden die Welpen mit einem „Karlie®Saugflaschen-Set“, 150 ml, D-Haaren gesäugt. Die Ernährung bestand aus Milchaustauscher, der jeden Tag in einem elektrischen Standmixer frisch zubereitet wurde. Er wurde im Kühlschrank gelagert und vor jeder Fütterung die entsprechende Menge im „Petra electric“- Babykostwärmer, Typ BF1 (LZ 025 106), Deutschland, auf 35°C erwärmt. Bis zum 14. Lebenstag wurden die Welpen ad libitum gefüttert. Dann wurde die Fütterungsmenge der individuellen Gewichtsentwicklung des einzelnen Welpen angepasst. Etwa in der dritten Woche wurden die Welpen daran gewöhnt den Milchaustauscher selbständig vom Teller aufzunehmen.

Ab der vierten Woche wurde Trockenfutter zugefüttert. Zuerst wurde eine geringe Menge mit dem Milchaustauscher vermischt. Bis zur achten Woche, in der die Welpen abgesetzt wurden, wurde die Trockenfuttermenge stetig erhöht, die Milchaustauschermenge proportional dazu vermindert.

3.4.5 Kot- und Urinabsatz

Nach jeder Fütterung wurden Abdomen und Geschlechtsteile mit einem weichen Tuch massiert, um den Kot- und Urinabsatz zu stimulieren. Ab der zweiten bis dritten Lebenswoche waren die Welpen in der Lage selbständig Kot und Urin abzusetzen.

3.4.6 Entwurmung

Einmal wöchentlichen wurde mit Banminth-Paste, Pfizer, sowie einmalig im Alter von acht Wochen mit Panacur® Tabletten, Hoechst Russel Vet, Unterschleißheim, entwurmt.

3.4.7 Impfung und Applikation von Humanem Serum Albumin (HSA)

Die Hunde wurden in der achten und zwölften Lebenswoche geimpft. Dazu wurde ein Kombinationsimpfstoff gegen Staupe, Hepatitis contagiosa canis und Parvovirose, SHP® der Firma Merial (Merial GmbH, 85399 Hallbergmoos, Deutschland) verwendet und subcutan an der linken Brustwand injiziert.

Außerdem wurde zusätzlich zur Impfung frisch zubereitete Humanes-Serum-Albumin-Lösung an der rechten Brustwand subcutan appliziert.

3.4.7.1 Herstellung der Humanes-Serum-Albumin-Lösung

3.4.7.1.1 Verwendete Chemikalien

- Humanes Serumalbumin (HSA), kristallin (Albumin from human serum, 97 – 99 % lyophilized powder, Firma Sigma-Aldrich, Produkt-Nr. A9511)
- PBS-Lösung ohne Tween, pH 7,2
- PCSL: Pam3Cys-Ser-(Lys)4x3HCl
- Eppendorf-Cups, Nennvolumen 1ml
- Eppendorf-Pipette
- Sartorius-Waage

3.4.7.1.2 Herstellung

10 mg kristallines HSA wurden in ein Eppendorf-Cup eingewogen und 0,250 ml PCSL und 0,750 ml PBS-Lösung dazu pipettiert. Mittels eines Vortex-Schüttlers wurde gut gemischt, bis sich die Kristalle vollständig gelöst hatten.

3.5 Futteraufnahme und Gewichtsentwicklung

Die Futteraufnahme wurde durch Differenzwägung bestimmt. Dazu wurde das Gewicht der Tiere vor und nach jeder Fütterung auf einer Mettler-Waage (SG 8001, Toledo, Schweiz) gemessen und die Differenz als Futteraufnahme festgehalten.

Des Weiteren wurde jeden Tag das Gewicht vor der ersten Fütterung dokumentiert um die Gewichtsentwicklung beurteilen zu können.

3.6 Kotuntersuchung

3.6.1 Untersuchungen

Folgende Parameter wurden bestimmt:

- Mikrobiologische Untersuchung
- Bestimmung der Trockensubstanz
- Bestimmung des Laktatgehaltes
- Bestimmung des Ammoniakgehaltes
- Messung des pH-Wertes

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden in der Dissertation von LAUR (2003) veröffentlicht.

3.6.2 Entnahmezeitpunkte

Es wurden wöchentlich Sammelkotproben der einzelnen Fütterungsgruppen entnommen. Diese wurden nativ bei – 18° C tiefgefroren. Diese Proben dienten der Bestimmung der Trockensubstanz.

Zu bestimmten Zeitpunkten (Tabelle 11) wurde von jedem einzelnen Welpen Kot gesammelt, der sofort der mikrobiologischen Untersuchung zugeführt beziehungsweise aufbereitet und im Anschluss daran bei –18° C tiefgefroren wurde.

Tabelle 11: Entnahmezeitpunkte für die verschiedenen Kotparameterbestimmungen

Kotuntersuchung	Entnahmezeitpunkte (Woche)			
mikrobiol. Untersuchung	1	4	8	14
TS-Bestimmung	wöchentlich Woche 1 bis 14			
pH-Messung	1	4	8	14
Laktatgehalt	1	4	8	14
Ammoniakgehalt	1	4	8	14

3.6.2.1 Durchführung der mikrobiologischen Untersuchung

Am Institut für Tierhygiene und Tierschutz der LMU München, Schwere-Reiter-Str. 9, unter der Leitung von Herrn Prof. M. Erhard wurde der zu den jeweiligen Zeitpunkten gesammelte Kot jedes einzelnen Welpen mikrobiologisch untersucht (LAUR, 2003).

3.6.2.1.1 Untersuchte Parameter

Bestimmt wurden

- Gesamtkeimzahl
- E. coli-Gehalt
- Enterococcen-Gehalt
- Lactobacillen- und Leuconostoc-Gehalt
- Clostridien-Gehalt.

3.6.2.1.2 Materialien und Nährböden

- Caso (Merck, Darmstadt)
- McKonkey (Merck, Darmstadt)
- CNA (Biomérieux, Nürtingen)
- Rogosa (Merck, Darmstadt; selbstgegossen)
- RCM (Merck, Darmstadt; selbstgegossen)
- Enterotube-II-BBL (Becton Dickinson, Reutlingen)
- MRS-Agar (Biomérieux, Nürtingen)
- Standard-I-Agar (Merck, Darmstadt)
- API-Strep System (Biomérieux, Nürtingen)
- API-20A-System (Biomérieux, Nürtingen)
- Anaerocult C (Merck, Darmstadt)
- Anaerocult A (Merck, Darmstadt)
- Oxidasestäbchen (Baktident Oxidase von Merck, Darmstadt)
- Kovacs-Reagenz (Merck, Darmstadt)
- VPI (KOH) (Biomérieux, Nürtingen)
- VPI2 (alpha-Naphtol) (Biomérieux, Nürtingen)

3.6.2.1.3 Probenaufbereitung und Durchführung

Aus dem frischen Kot wurde eine Verdünnungsreihe in Zehnerpotenzen von $1:10^1$ bis $1:10^{10}$ erstellt. Eine detaillierte Beschreibung zur Durchführung der Keimbestimmung findet sich in der Dissertation von LAUR (2003).

3.6.2.1.3.1 Bestimmung der Gesamtkeimzahl

Zur Untersuchung der Gesamtkeimzahlen wurden Caso-Platten verwendet. Nach aerober Bebrütung 24 Stunden lang bei 38 °C folgte eine optische Auszählung um die sich in einem Gramm Kot befindlichen Colony Forming Units zu erfassen.

3.6.2.1.3.2 Untersuchung auf E. coli, Enterococcen, Lactobacillen/ Leuconostoc, Clostridien

Detaillierte Ausführungen hierzu siehe LAUR (2003).

3.6.2.2 Bestimmung der Trockensubstanz

Einmal wöchentlich wurde von jeder Versuchsgruppe frischer Kot gesammelt und in einen Becher eingewogen. Das Bechergewicht wurde auf dem Becher notiert. Bei -18 °C wurde der Kot bis zur Weiterverarbeitung tiefgefroren.

Nach dem Auftauen wurde der Kot 36 Stunden lang in einen Heraeus-Trockenschrank gestellt. Nach 30-minütigem Abkühlen im Exsikkator wurde das Gewicht erneut bestimmt. Vom Auswaagegewicht wurde nun das Bechergewicht abgezogen und durch Dreisatz der prozentuale Anteil der Trockensubstanz am Frischkot errechnet.

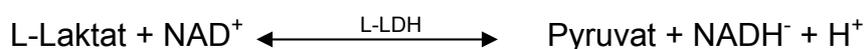
3.6.2.3 L-Laktatbestimmung

3.6.2.3.1 Vorbereitung

Der frische Kot wurde sofort verarbeitet. Dazu wurden zu einem Gramm Kot zehn Teile 0,6 molare Perchlorsäure gegeben, homogenisiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und bei -18 °C tiefgefroren.

3.6.2.3.2 Prinzip

L-Laktat (L-Milchsäure) wird durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) in Gegenwart von L-Laktat-Dehydrogenase (L-LDH) zu Pyruvat oxidiert.



Das Gleichgewicht der Reaktion liegt auf der Seite des Laktats.

Durch eine nachgeschaltete Reaktion des Pyruvats mittels des Enzyms Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) in Gegenwart von L-Glutamat kann das Gleichgewicht auf die Seite von Pyruvat und NADH verschoben werden.



Die Menge des gebildeten NADH wird photometrisch durch Absorption bei 365 nm bestimmt. Die gebildete Menge NADH ist äquivalent zur vorliegenden Menge an L-Laktat.

3.6.2.3.3 Chemikalien

- Natronlauge
- Glycylglycin-Pufferlösung (pH 10)
- Nicotinamid-adenin-dinucleotid-Lösung (NAD) Firma Böhringer
- Glutamat-Pyruvat-Transaminase-Lösung (GPT) Firma Böhringer
- L-Laktat-Dehydrogenase-Lösung (L-LDH) Firma Böhringer
- Lithium-L-Lactat Firma Fluka

3.6.2.3.4 Geräte

- Spektralphotometer, Wellenlänge 365 nm
- Messzylinder
- pH-Meter
- Meßküvetten 1 cm Schichtdicke
- Eppendorf-Pipetten
- Einweghandschuhe
- Rührspatel

3.6.2.3.5 Durchführung

Siehe LAUR (2003).

3.6.2.4 Ammoniakbestimmung

3.6.2.4.1 Materialien und Reagenzien

- 14 ml Röhrchen (REF 55.463, Sarstedt, Nürnberg)
- 2% NaOH-Lösung (10 mol/l)
- rauchende Salzsäure (HCl)

3.6.2.4.2 Geräte

- pH-Meter 325 Sen Tix 97T, WTW, Wien
- WTW-Ammoniak elektrode NH 500/2 (Wien)

3.6.2.4.3 Vorbereitung

Der frische, gesammelte Kot wurde mit Aqua tridest. im Verhältnis 1:10 versetzt, homogenisiert und zentrifugiert. Vom Überstand wurden fünf Milliliter abpipettiert und mit 0,4 Milliliter 1:4 verdünnter rauchender HCl versetzt. Anschließend wurde das Gemisch tiefgefroren.

3.6.2.5 pH-Wert-Messung

Der frische Kot wurde im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser gemischt und mittels der pH-Elektrode des pH-Meters 325 Sen Tix 97T, WTW, Wien der pH-Wert gemessen.

3.7 Blutuntersuchung

Folgende Parameter wurden bestimmt:

- Rotes und weißes Blutbild
- Bestimmung des Gehaltes von IgG gegen Humanes Serum-Albumin
- Bestimmung des Gesamt-IgA- und -IgG-Gehaltes

3.7.1 Entnahmezeitpunkte

Zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten (Tabelle 12) wurde von jedem Welpen Blut entnommen, das sofort der Untersuchung zugeführt beziehungsweise aufbereitet und im Anschluss daran bei -18° C tiefgefroren wurde.

Tabelle 12: Entnahmezeitpunkte für die verschiedenen Blutparameterbestimmungen

Blutuntersuchung	Entnahmezeitpunkte (Lebenstag)							
Rotes, weißes Blutbild				28	56	70	84	98
Gesamt-IgA	3	7	14	28	56	70	84	98
Gesamt- IgG								
spez. IgG gegen HSA					56	70	84	98

3.7.2 Probenentnahme

Die Blutentnahme erfolgte aus der Vena cephalica antebrachii, mittels Butterfly beziehungsweise einer schwarzen 22 G-Kanüle. Als Blutröhrchen wurden Microvetten und Kalium-EDTA-Röhrchen verwendet.

3.7.3 Bestimmung des roten und weißen Blutbildes

Die erste Bestimmung des roten und weißen Blutbildes konnte aus technischen Gründen erst am 28. Lebenstag vorgenommen werden. Vorher konnte keine ausreichende Blutmenge (0,5 ml) gewonnen werden.

3.7.3.1 Materialien

Butterfly (Microperfuseur, 0,7 mm, G 22, Laboratoires Pharmaceutiques, VYCON, V-creen, Ecouen, Frankreich)

sterile 22 G-Kanüle (0,7 mm, Neolus Terumo®, schwarz)

Kalium-EDTA-Röhrchen (Sarstedt AG & Co., Nürnberg)

3.7.3.2 Probenvorbereitung

Das gewonnene Blut wurde sofort in das Labor der I. Medizinischen Tierklinik verbracht und die Analyse durchgeführt.

3.7.3.3 Durchführung der Untersuchung

Das gesamte Blutbild wurde im Cell Dyn 3500 (Abott, Wiesbaden) in der I. Medizinischen Tierklinik der LMU München untersucht.

3.7.4 Untersuchung des Gehaltes von Immunglobulin G (IgG) gegen Humanes Serum Albumin (HSA)

3.7.4.1 Prinzip

Die Bestimmung der Immunglobuline wurde mittels Sandwich-ELISA vorgenommen. Es liegt kein Standard für HSA vor, deshalb konnte lediglich die Extinktion gemessen und eine relative Konzentration bestimmt werden. Hierzu wurde ein Pool aus drei Proben hergestellt. Bei einem Vorversuch wurde ermittelt, dass in diesen Proben ausreichend Antikörper gegen HSA vorlagen. Er wurde als Positivkontrolle in der Spalte 3 auf jeder Platte mitgeführt. Anhand einer gedachten Konzentration, die für die Extinktion des Pools vergeben wurde, konnte so bei den Proben eine relative Konzentration im Vergleich zur Konzentration des Pools ermittelt werden. Diese relative Konzentration lässt sich als Größe besser vergleichen als die Extinktion.

Des Weiteren wurde eine Negativkontrolle (Neg-K) in der Spalte 2 mitgeführt, die aus fünf Proben bestand, die im Vorversuch als frei von IgG gegen HSA bestimmt wurden. Auch ein Leerwert (LW) wurde ermittelt, indem reiner PBS-Tween anstelle von Proben oder Negativkontrolle in der Spalte 1 jeder Platte mitlief.

3.7.4.2 Materialien

- Butterfly (Microperfuseur, 0,7 mm, G22, Laboratoires Pharmaceutiques, VYCON, V-creeen, Ecouen, Frankreich)
- Sterile 22 G-Kanüle (0,7 mm, Neolus Terumo®, schwarz)
- Microvette®200LH-System, (Sarstedt, Nürnberg)
- Eppendorf-Cups
- Zentrifuge
- 96-Loch-ELISA-Platten aus Polystyrol (Maxisorb, Nunc®, Wiesbaden)
- Caprine IgG-Antikörper Aal gegen Hunde-IgG in PBS, 1mg IgG/ml von Serotec, Kidlington, Oxford, UK
- Parafilm
- Mechanischer Wascher (EL_x 405 Auto Plate Washer, Bio-Tek Instruments Inc)
- ELISA- Reader (EAR 400 AT, SLT-Labinstruments, Overath)

3.7.4.3 Chemikalien

Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders aufgeführt waren alle Chemikalien von der Firma Merck, Darmstadt.

PBS: Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (pH 7,2)

- Natriumchlorid (8,00 g)
- Di-Natriumhydrogenphosphat–Dihydrat (1,45 g)
- Kaliumdihydrogenphosphat (0,20 g)
- Kaliumchlorid (0,20 g)
- ad 1000 ml Aqua bidest.

Waschpuffer: PBS-Tween (pH 7,2)

- Herstellung wie PBS.
- Zusatz von 500 µl Tween 20 ad 1000 ml.

Beschichtungspuffer: Carbonatpuffer pH 9,6

- Natriumcarbonat (3,11 g)
- Natriumhydrogencarbonat (6,00 g)
- ad 1000 ml Aqua bidest.

Blockierungslösung: 0,5%ige Gelatinelösung

- Gelatine, Firma Serva Heidelberg (100 mg)
- in 20 ml PBS

Konjugat

Kaninchen-Anti-Hund-IgG (rabbit-anti-dog IgG, whole molecule, peroxidase conjugate, affinity isolated antibody, A6792) Firma Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri

TMB-Puffer: Natriumacetat-Citrat-Puffer pH 5,0

- Natriumacetat (8,20 g)
- Citronensäure (3,15 g)
- ad 1000 ml Aqua bidest.

Stammlösung: Tetramethylbenzidin-Lösung

- Tetramethylbenzidin (0,06 g)

- Dimethylsulfoxid (10 ml)

Substratlösung

- Stammlösung (332 µl)
- TMB-Puffer (10,0 ml)
- 30% H₂O₂ (3,00 µl)

Stoppreagenz: 1-molare Schwefelsäure pH 1

- Aqua bidest. (472 ml)
- 96%ige Schwefelsäure (28 ml)

3.7.4.4 Probenvorbereitung

Das in den Microvetten gewonnene Blut wurde bei 2000 G zehn Minuten lang zentrifugiert um das Plasma von den restlichen Blutbestandteilen zu trennen. Das Plasma wurde mit PBS-Puffer (siehe 3.7.4.3.) im Verhältnis 1:100 vorverdünnt, in Eppendorfcups verbracht und bei –80 °C tiefgefroren.

3.7.4.5 Durchführung

3.7.4.5.1 Beschichtung

Für die Beschichtung wurde Beschichtungspuffer angemischt. Dazu wurden pro Milliliter Puffer 5 µg Antikörper gegen Hunde-IgG gegeben.

In 96-Loch ELISA-Platten wurden in jede Kavität 100 µl der Lösung pipettiert. Die Platten wurden mit Parafilm abgedeckt und über Nacht (mindestens 18 Stunden) im Kühlschrank bei +4°C inkubiert. Dabei hefteten die Antikörper sich an die freien Bindungsstellen am Boden der Kavitäten an.

3.7.4.5.2 Waschvorgang

Die Platten wurden nach dem Inkubieren im mechanischen Wascher zweimal gewaschen und anschließend zum Entfernen der Flüssigkeitsreste ausgeklopft.

3.7.4.5.3 Blockierung

Um die eventuell noch freien Bindungsstellen der Kavitäten zu Blockieren wurden pro Kavität 200 µl der Blockierungslösung pipettiert und die Platte mit Parafilm bedeckt für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.7.4.5.4 Waschvorgang

Siehe 3.7.4.5.2

3.7.4.5.5 Zugabe der Proben

Die aufgetauten, 1:100 vorverdünnten Proben, wurden nochmals mit PBS-Tween verdünnt, um eine endgültige Verdünnung von 1:1000 zu erhalten. Ebenso wurden der Pool und die Negativkontrolle im Verhältnis 1:1000 verdünnt. Von den Proben wurde in die Kavitäten A 4 bis A 12 jeweils 100 µl gegeben. Die Spalten 1 bis 3 blieben jeweils für Leerwert, Negativkontrolle und Pool vorbehalten.

In der Spalte 1 A bis H und den Spalten 2 bis 12 Reihe B bis H wurden jeweils 50 µl PBS-Tween vorgelegt. In die Kavität A2 wurden 100 µl Negativkontrolle und in die Kavität A3 100 µl Pool pipettiert. Auf der gesamten Platte, ausgenommen der Spalte 1, wurde dann eine log₂-Verdünnungsreihe angelegt: aus der Reihe A2 bis A12 wurden jeweils 50 µl entnommen und in die Reihe B2 bis B12 verbracht, gemischt und das Ganze so weitergeführt, bis die letzten 50 µl aus der Reihe H verworfen wurden, wie im Pipettierschema in Abbildung 3 dargestellt.

Die Platte wurde wiederum mit Parafilm bedeckt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

	Leerwert	Negativ-Kontrolle	Pool	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	50 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
B	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
C	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
D	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
E	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
F	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
G	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
H	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Abbildung 3: Pipettierschema auf einer 96-Loch-ELISA-Platte

In Spalte 1 und in Spalte 2 bis 3 Reihe B bis H wurden 50 µl PBS-Tween vorgelegt.
 In Kavität A2 wurden 100 µl Negativkontrolle pipettiert.
 In Kavität A3 wurden 100 µl Positiv-Pool pipettiert.
 In die Kavitäten A4 bis A12 wurden jeweils 100 µl der jeweiligen Proben pipettiert.

3.7.4.5.6 Waschvorgang

Siehe 3.7.4.5.2

3.7.4.5.7 Konjugat-Zugabe

Das Konjugat wurde in einer Verdünnung von 1:20 000 verwendet. In jede Kavität wurden 100 µl gegeben, die Platte mit Parafilm überzogen und 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.7.4.5.8 Waschvorgang

Siehe 3.7.4.5.2

3.7.4.5.9 Zugabe des Substrats

In jede Kavität wurden 100 µl der Substratlösung pipettiert. Im Anschluß wurde exakt zehn Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

3.7.4.5.10 Stoppreagenz

Pro Kavität wurden schließlich 50 µl Stoppreagenz zugegeben. Dadurch kamen die Reaktionen zum Erliegen.

3.7.4.5.11 Auswertung

Im ELISA- Reader wurde bei 450 nm die Extinktion gemessen.

Das verwendete Computerprogramm MikroWin 2000, Version 4.0 erstellte automatisch eine Standardkurve für den Pool. Anhand der Extinktionen des Pools wurde eine relative Konzentration festgelegt. Das Programm errechnet automatisch unter Einbeziehung des Leerwertes und der Verdünnungsstufen die relativen Konzentrationen der Proben. Im linearen Bereich der „Standardkurve“ wurde mit Microsoft Excel 2000 der Mittelwert aus den relativen Konzentrationen errechnet. Diese Mittelwerte der einzelnen Proben wurden miteinander verglichen und es konnte eine Aussage über das Vorhandensein von spezifischen IgG gegen Humanes Serumalbumin in der jeweiligen Probe gemacht werden und ein relativer Konzentrationsvergleich im Bezug auf den Positiv-Pool vorgenommen werden.

3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der in diesem Versuch gewonnenen Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm SigmaStat 3.0.

Es wurde jeweils der Mittelwert (MW) zur Zusammenfassung der Einzelwerte gebildet, sowie die Standardabweichung (Stabw) zur Erfassung der Streuung der Einzelwerte berechnet.

Die Stichprobenzahl (n) betrug jeweils 8 pro Gruppe. Die Vergleichsuntersuchung auf Unterschiede zwischen den einzelnen Messungen beziehungsweise zwischen den einzelnen Gruppen erfolgte mit dem Rangsummentest nach Mann-Whitney.

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Probenzeitpunkten wurden jeweils mit unterschiedlichen Buchstaben (a,b,c) gekennzeichnet.

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Lactoferringruppen und der Kontrollgruppe zum jeweiligen Probenzeitpunkt wurde jeweils mit * gekennzeichnet.

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Lactoferringruppen zum jeweiligen Probenzeitpunkt wurden jeweils mit verschiedenen Buchstaben (x,y,z) gekennzeichnet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Versuchsverlauf

Am Modell der mutterlosen Aufzucht wurde der Einfluss von oral verabreichtem Lactoferrin untersucht. Der Versuch erstreckte sich vom dritten Lebenstag bis zur 14. Lebenswoche der Welpen. Zu Beginn der Studie bekamen die Hunde selbst angefertigten Milchaustauscher, ab der vierten Woche wurde Trockenfutter zugefüttert und schließlich, ab der achten Woche, die Welpen ausschließlich mit diesem ernährt (Kapitel 3.4). Zu sieben Zeitpunkten wurde Blut entnommen (Kapitel 3.7.1), zweimal wurden die Hunde geimpft und bekamen gleichzeitig Humanes Serumalbumin (HSA) injiziert (Kapitel 3.4.7). Zum Abschluss des Versuchs wurde der Gastrointestinaltrakt aller Welpen endoskopisch untersucht und Biopsieproben von Magen- und Darmschleimhaut entnommen. Die Ergebnisse der Biopsie werden in der Dissertation von HANDL (2006) veröffentlicht.

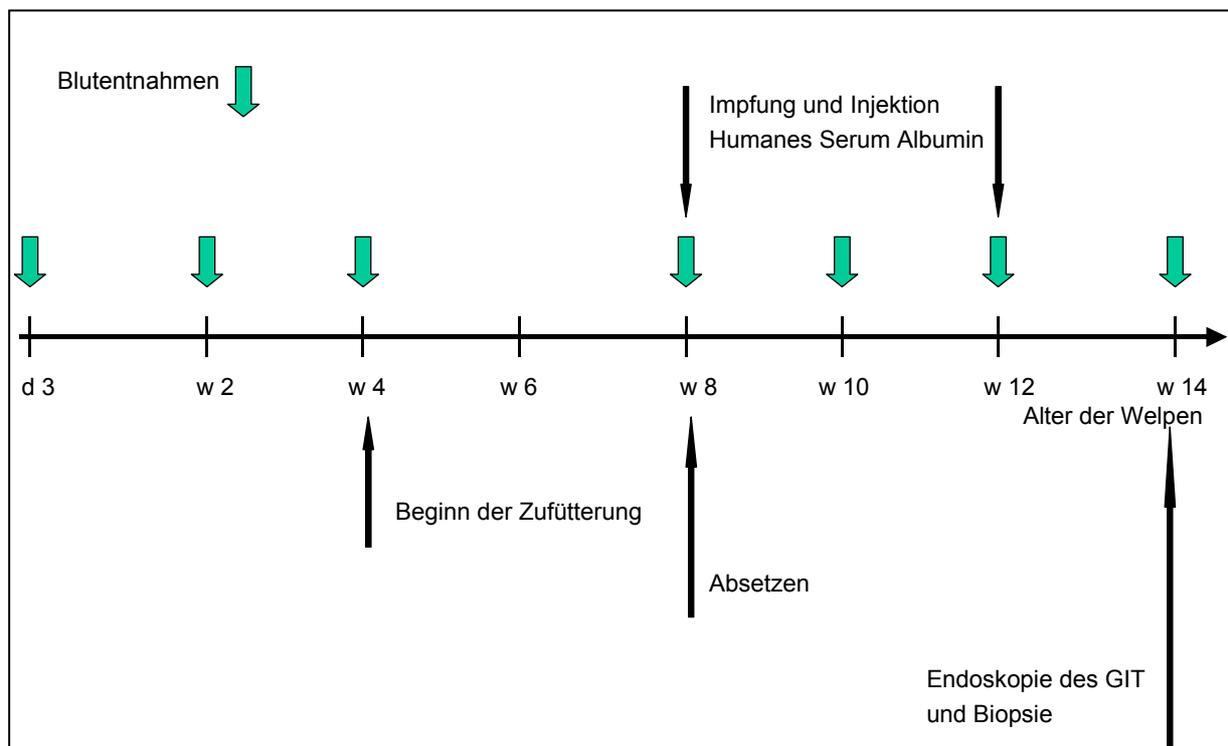


Abbildung 4: Schematische Anordnung des Versuchsverlaufs

Insgesamt wurden 32 Tiere untersucht, wobei sich in jeder Versuchsgruppe acht Welpen befanden. Die Geschlechterverteilung ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Zahl und Geschlecht der Welpen in den einzelnen Versuchsgruppen

Gruppe	Anzahl der Tiere gesamt	Zahl der weiblichen Tiere	Zahl der männlichen Tiere
Kontrolle	8	5	3
LF 30	8	5	3
LF 60	8	6	2
LF 120	8	5	3

Die Welpen aller Versuchsgruppen entwickelten sich physiologisch und ihr Allgemeinbefinden war während der Versuchsdauer ungestört.

4.2 Gewichtsentwicklung

Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Tiere täglich gewogen und die Gewichtsentwicklung festgehalten.

Bei Versuchsbeginn (Tag 3) wogen die Hunde durchschnittlich 460 Gramm, im Alter von 14 Wochen hatten sie ein Durchschnittsgewicht von 7036 Gramm.

Im Folgenden wird ein Überblick über die Anfangs- und Endgewichte (Tabelle 14) und die wöchentliche Gewichtsentwicklung der verschiedenen Versuchsgruppen (Tabelle 15) gegeben. Dabei wurden die Tiere immer am Morgen des letzten Tages der jeweiligen Lebenswoche gewogen.

Das Anfangsgewicht der Welpen schwankte am Tag 3 von 325 Gramm bis 582 Gramm, wobei die Gruppe LF 120 mit 415 Gramm das niedrigste und die Gruppe LF 60 mit 505 Gramm das höchste durchschnittliche Gewicht aufwies. In allen Gruppen ist ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen Anfangs- und Endgewicht zu verzeichnen. Zwischen den verschiedenen Gruppen sind keine statistisch signifikanten Unterschiede zu ermitteln.

Tabelle 14: Durchschnittliche Anfangs- und Endgewichte der Welpen jeder Gruppe (n = 8) in g (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Gruppe	Durchschnittliches Anfangsgewicht Tag 3	Durchschnittliches Endgewicht Tag 98
Kontrolle	456 \pm 96 ^a	7223 \pm 813 ^b
LF 30	463 \pm 61 ^a	6891 \pm 1010 ^b
LF 60	505 \pm 38 ^a	6857 \pm 710 ^b
LF 120	415 \pm 61 ^a	7172 \pm 957 ^b

a, b, c, d: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Messzeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Messzeitpunkt

x, y, z: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Lactoferringruppen zum jeweiligen Messzeitpunkt

Tabelle 15 verdeutlicht die Gewichtsentwicklung der einzelnen Gruppen während der gesamten Versuchsphase. Zu Versuchsbeginn in Woche 1 gab es signifikante Gruppenunterschiede zwischen den Lactoferringruppen (siehe Tabelle), jedoch nicht im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Die Standardabweichungen innerhalb der einzelnen Gruppen waren bei den Anfangsgewichten gering.

Am Ende des Versuchs wiesen die Gruppen LF 60 mit durchschnittlich 6857 Gramm und LF 30 mit durchschnittlich 6891 Gramm ein geringeres Gewicht auf, als die Gruppe LF 120 und die Kontrollgruppe, deren mittlere Gewichte bei 7172 Gramm beziehungsweise 7223 Gramm lagen. Die Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant.

Bereits innerhalb der ersten Woche veränderte sich die Gewichtsverteilung zwischen den Gruppen (Tabelle 15) im Vergleich zum Tag 3 (Tabelle 14). In der ersten Versuchswoche wurde die Gruppe LF 30 zum Spitzenreiter. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden immer geringer und wiesen keine Signifikanzen auf.

Tabelle 15: Durchschnittsgewichte der Hunde der einzelnen Versuchsgruppen (n = 8) wochenweise in g/Hund (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Lebenswoche	Gruppe	Durchschnittliches Gewicht
Woche 1	Kontrolle	639 \pm 114
	LF 30	685 \pm 88 ^x
	LF 60	676 \pm 94 ^x
	LF 120	549 \pm 84 ^y
Woche 2	Kontrolle	982 \pm 184
	LF 30	1001 \pm 85
	LF 60	1002 \pm 96
	LF 120	883 \pm 126
Woche 3	Kontrolle	1315 \pm 299
	LF 30	1295 \pm 122
	LF 60	1403 \pm 122
	LF 120	1175 \pm 183
Woche 4	Kontrolle	1717 \pm 250
	LF 30	1616 \pm 191
	LF 60	1739 \pm 164
	LF 120	1551 \pm 183
Woche 5	Kontrolle	2222 \pm 267
	LF 30	2067 \pm 189
	LF 60	2142 \pm 191
	LF 120	2066 \pm 292
Woche 6	Kontrolle	2693 \pm 280
	LF 30	2609 \pm 278
	LF 60	2683 \pm 290
	LF 120	2551 \pm 347
Woche 7	Kontrolle	3256 \pm 295
	LF 30	3106 \pm 380
	LF 60	3105 \pm 319
	LF 120	3116 \pm 394
Woche 8	Kontrolle	3730 \pm 349
	LF 30	3446 \pm 380
	LF 60	3589 \pm 272

	LF 120	3560±491
Woche 9	Kontrolle	4348±392
	LF 30	3954±488
	LF 60	4184±468
	LF 120	3997±527
Woche 10	Kontrolle	4797±482
	LF 30	4391±667
	LF 60	4607±380
	LF 120	4709±565
Woche 11	Kontrolle	5415±590
	LF 30	5011±811
	LF 60	5385±607
	LF 120	5193±548
Woche 12	Kontrolle	5953±659
	LF 30	5558±865
	LF 60	5865±604
	LF 120	5764±665
Woche 13	Kontrolle	6589±678
	LF 30	6196±952
	LF 60	6407±570
	LF 120	6557±883
Woche 14	Kontrolle	7223±813
	LF 30	6891±1010
	LF 60	6857±710
	LF 120	7172±957

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Messzeitpunkt

x, y, z: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Lactoferringruppen zum jeweiligen Messzeitpunkt

Aus den wöchentlichen Gewichtsdaten wurden die mittleren wöchentlichen Zunahmen, die aus der folgenden Tabelle 16 zu entnehmen sind, errechnet.

Tabelle 16: Durchschnittliche wöchentliche Gewichtszunahmen in g je Hund und Gruppe (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Lebenswoche	Gruppe	Durchschnittliches Gewicht
Woche 1	Kontrolle	183 \pm 139
	LF 30	221 \pm 136
	LF 60	171 \pm 112
	LF 120	134 \pm 99
Woche 2	Kontrolle	343 \pm 230
	LF 30	317 \pm 184
	LF 60	326 \pm 191
	LF 120	334 \pm 201
Woche 3	Kontrolle	333 \pm 295
	LF 30	294 \pm 183
	LF 60	401 \pm 232
	LF 120	293 \pm 214
Woche 4	Kontrolle	402 \pm 338
	LF 30	321 \pm 227
	LF 60	336 \pm 223
	LF 120	375 \pm 262
Woche 5	Kontrolle	505 \pm 361
	LF 30	452 \pm 297
	LF 60	403 \pm 270
	LF 120	515 \pm 355
Woche 6	Kontrolle	471 \pm 359
	LF 30	542 \pm 362
	LF 60	541 \pm 366
	LF 120	486 \pm 399
Woche 7	Kontrolle	563 \pm 402
	LF 30	497 \pm 412
	LF 60	659 \pm 516
	LF 120	564 \pm 463

Woche 8	Kontrolle	474±397
	LF 30	340±407
	LF 60	484±381
	LF 120	444±489
Woche 9	Kontrolle	618±480
	LF 30	508±497
	LF 60	595±482
	LF 120	437±543
Woche 10	Kontrolle	449±485
	LF 30	437±608
	LF 60	422±468
	LF 120	713±645
Woche 11	Kontrolle	618±612
	LF 30	620±786
	LF 60	778±634
	LF 120	484±595
Woche 12	Kontrolle	538±667
	LF 30	547±858
	LF 60	480±639
	LF 120	571±660
Woche 13	Kontrolle	636±727
	LF 30	639±939
	LF 60	542±636
	LF 120	793±861
Woche 14	Kontrolle	634±796
	LF 30	695±1014
	LF 60	450±668
	LF 120	615±947

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Messzeitpunkt

x, y, z: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Lactoferringruppen zum jeweiligen Messzeitpunkt

Die Übersicht über die Gewichtszunahmen zeigt, dass die durchschnittlichen Zunahmen der verschiedenen Gruppen leichten Schwankungen unterlagen. Die absoluten Zunahmen lagen anfänglich bei etwa 200 bis 300 Gramm und stiegen am

Versuchsende auf über 600 Gramm wöchentlich. Relativ zum aktuellen Körpergewicht waren diese jedoch in der zweiten Lebenswoche mit rund 34 % am höchsten und in der 14. Woche mit rund 9 % am geringsten.

Zwischen Woche 8 und Woche 10, mit dem Beginn des Absetzens, kam es in allen Gruppen vorübergehend zu einem leichten Rückgang der Zunahmen.

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen konnten nicht ermittelt werden.

4.3 Rotes und weißes Blutbild

4.3.1 Rotes Blutbild

4.3.1.1 Erythrozyten

In Tabelle 17 sind die Erythrozytenmengen als Mittelwerte (\pm Standardabweichung) der einzelnen Gruppen zu den verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten dargestellt. Die Daten zeigen den Anstieg der Erythrozytenzahlen aller Gruppen ab Woche 4 bis Woche 10 von rund $4 \times 10^6/\mu\text{l}$ auf rund $6 \times 10^6/\mu\text{l}$. Bis zur Woche 14 konnte in den Gruppen LF 30 und LF 60 ein leichter Rückgang der Erythrozytenmenge verzeichnet werden. Zu Beginn des Versuchs wurden bei der Gruppe LF 60 etwas höhere Werte als bei den anderen Gruppen ermittelt. Dagegen war die Erythrozytenmenge bei der Gruppe LF 120 etwas geringer als bei den übrigen Gruppen. Signifikante Unterschiede konnten in der Kontrollgruppe zwischen dem ersten und zweiten Entnahmezeitpunkt und im Vergleich zu allen anderen Entnahmezeitpunkten verzeichnet werden (siehe Tabelle 17). Bei den Gruppen LF 30 und LF 120 gab es signifikante Unterschiede, wenn man die Werte der ersten Entnahme mit denen der restlichen Entnahmezeitpunkte vergleicht (siehe Tabelle 17). In der Woche 4 unterschied sich die Kontrollgruppe zu der LF 60 Gruppe signifikant. Die Gruppe LF 120 wies signifikante Unterschiede zu den Gruppen LF 30 und LF 60 auf (Tabelle 17). Dennoch waren im weiteren Verlauf des Versuchs keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Lactoferringruppen oder innerhalb der Lactoferringruppen zu verzeichnen.

Tabelle 17: Durchschnittliche Erythrozytenmenge im Welpenblut in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert \pm Standardabweichung) in $10^6/\mu\text{l}$

Gruppe	Woche 4	Woche 8	Woche 10	Woche 12	Woche 14
Kontrolle	4,03 \pm 0,31 ^a	5,40 \pm 0,32 ^b	5,73 \pm 0,32 ^c	5,95 \pm 0,35 ^c	5,94 \pm 0,29 ^c
LF 30	4,23 \pm 0,34 ^{a; x}	5,56 \pm 0,38 ^b	6,19 \pm 1,21 ^b	5,72 \pm 0,26 ^b	5,74 \pm 0,38 ^b
LF 60	4,49 \pm 0,26 ^{*; x}	5,69 \pm 0,36	6,26 \pm 1,18	5,84 \pm 0,35	5,67 \pm 0,35
LF 120	3,83 \pm 0,33 ^{a; y}	5,68 \pm 0,53 ^b	5,52 \pm 0,18 ^b	5,76 \pm 0,12 ^b	5,85 \pm 0,44 ^b

a, b, c, d: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Blutentnahmezeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

x, y, z: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Lactoferringruppen zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

4.3.1.2 Hämatokrit

Der mittlere Hämatokrit aller Welpen lag in der vierten Woche bei rund 25 % und stieg bis zur Woche 14 auf rund 37 % an. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Lactoferringruppen ermittelt werden. Lediglich in der vierten Woche waren signifikante Unterschiede zwischen den Lactoferringruppen sichtbar (Tabelle 18). Der Hämatokritwert aller Versuchsgruppen stieg während der Versuchsphase. Zu Beginn war der Anstieg steiler als gegen Ende des Versuchs. Eine Ausnahme bilden die Gruppen LF 30 und LF 60, die ihren Peak in der Woche 10 erreichten und deren Hämatokritwerte anschließend wieder sanken. In der Gruppe LF 120 gab es zwischen den verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten signifikante Unterschiede (siehe Tabelle 18). Bei den übrigen Gruppen konnten keine Signifikanzen ermittelt werden.

Tabelle 18: Durchschnittlicher Hämatokritwert im Welpenblut in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert \pm Standardabweichung) in %

Gruppe	Woche 4	Woche 8	Woche 10	Woche 12	Woche 14
Kontrolle	25,9 \pm 2,0	34,1 \pm 1,8	36,1 \pm 2,0	37,4 \pm 2,0	37,8 \pm 1,9
LF 30	23,6 \pm 1,4 ^x	33,9 \pm 2,6	37,7 \pm 7,8	35,6 \pm 1,6	36,6 \pm 2,1
LF 60	26,5 \pm 1,6 ^y	35,5 \pm 2,2	39,6 \pm 7,1	37,3 \pm 2,1	37,2 \pm 1,9
LF 120	23,3 \pm 3,8 ^{a; x}	33,6 \pm 1,5 ^b	34,0 \pm 1,1 ^{bc}	35,7 \pm 1,4 ^{bc}	37,2 \pm 2,7 ^d

a, b, c, d: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Blutentnahmezeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

x, y, z: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Lactoferringruppen zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

4.3.1.3 Hämoglobin

Der durchschnittliche Hämoglobingehalt lag in der vierten Lebenswoche bei 5,04 mmol/l und stieg bis zur 14. Woche kontinuierlich bis auf 7,97 mmol/l an. Bei der ersten Blutentnahme konnte ein signifikanter Unterschied zwischen dem Hämoglobinwert der Gruppe LF 120 und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Des Weiteren lagen Signifikanzen zwischen den einzelnen Lactoferringruppen vor. Innerhalb der Kontrollgruppe konnten signifikante Unterschiede zwischen den ersten beiden Entnahmen und zwischen der zweiten Entnahme und den restlichen Entnahmezeiten festgestellt werden. Ähnliches konnte in der Gruppe LF 120 beobachtet werden. Signifikanzen konnten hier zwischen den ersten beiden Untersuchungszeitpunkten sowie zwischen der Woche 8 und 10 im Vergleich mit der Woche 12 und 14 ermittelt werden (Tabelle 19).

Tabelle 19: Durchschnittlicher Hämoglobinwert im Welpenblut in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert ± Standardabweichung) in mmol/l

Gruppe	Woche 4	Woche 8	Woche 10	Woche 12	Woche 14
Kontrolle	5,21±0,41 ^a	7,24±0,42 ^b	7,76±0,41 ^c	8,07±0,45 ^c	8,08±0,44 ^c
LF 30	4,73±0,23 ^x	7,06±0,44	8,11±1,47	7,71±0,33	7,83±0,45
LF 60	5,38±0,51 ^y	7,41±0,38	8,39±1,33	8,10±0,44	7,91±0,32
LF 120	4,60±0,80 ^{*,xz; a}	7,11±0,40 ^b	7,27±0,30 ^b	7,84±0,37 ^c	8,07±0,62 ^c

a, b, c, d: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen den einzelnen Blutentnahmezeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied (p<0,05) zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

x, y, z: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen den einzelnen Lactoferringruppen zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

4.3.2 Weißes Blutbild

4.3.2.1 Leukozyten

Tabelle 20 zeigt die Unterschiede der Leukozytenzahlen zwischen der Kontrollgruppe und den Lactoferringruppen auf. In Woche 14 war die Leukozytenzahl der Lactoferringruppe LF 30 signifikant höher als die der Kontrollgruppe. Ein Anstieg der Leukozytenzahl konnte bei allen Gruppen, außer der LF 30-Gruppe zwischen den ersten beiden Entnahmezeitpunkten verzeichnet werden. Im Anschluss sanken die Zahlen wieder bis sie in Woche 14 in den Gruppen LF 30 und LF 120 erneut anstiegen. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten innerhalb der Kontrollgruppe beziehungsweise

der Gruppe LF 30 ermittelt werden. Die Gruppen LF 60 und LF 120 weisen dagegen Signifikanzen auf (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Leukozyten in $10^9/l$ in vier Gruppen ($n = 8$) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert \pm Standardabweichung) in mmol/l

Gruppe	Woche 4	Woche 8	Woche 10	Woche 12	Woche 14
Kontrolle	12,26 \pm 1,95	17,21 \pm 6,04	13,51 \pm 2,78	13,43 \pm 4,01	13,28 \pm 3,11
LF 30	14,70 \pm 4,82	14,61 \pm 3,80	12,16 \pm 2,95	14,08 \pm 2,53	15,24 \pm 3,12*
LF 60	12,05 \pm 2,01 ^{ab}	13,99 \pm 1,37 ^a	11,54 \pm 3,00 ^b	13,43 \pm 1,25 ^a	11,33 \pm 1,36 ^b
LF 120	11,30 \pm 3,00 ^a	15,34 \pm 2,62 ^b	12,58 \pm 1,58 ^a	11,06 \pm 1,55 ^a	13,43 \pm 3,08 ^{ab}

a, b, c, d: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Blutentnahmezeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

x, y, z: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Lactoferringruppen zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

4.3.2.2 Neutrophile

4.3.2.2.1 Absolute Werte

Die absoluten Werte der neutrophilen Granulozyten der Kontrollgruppe (im Mittel $7,98 \times 10^9/l$) und der Lactoferringruppen (im Mittel $8,11 \times 10^9/l$) waren nahezu identisch. Die Unterschiede innerhalb der Lactoferringruppen waren gering. Bei diesem Parameter konnten ähnliche Beobachtungen wie bei den Leukozyten gemacht werden. Zwischen erster und zweiter Blutentnahme stieg die Neutrophilenzahl, um anschließend wieder zu sinken und zum letzten Entnahmezeitpunkt, zwei Wochen nach der zweiten Impfung in Woche 12, bei den Gruppen LF 30 und LF 120 erneut leicht anzusteigen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant. Lediglich innerhalb der LF 120-Gruppe gab es eine statistische Signifikanz zwischen Woche 4 und Woche 10 zu verzeichnen.

Tabelle 21: Durchschnittlicher Gehalt an neutrophilen Granulozyten im Welpenblut in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert \pm Standardabweichung) in $10^9/l$

Gruppe	Woche 4	Woche 8	Woche 10	Woche 12	Woche 14
Kontrolle	6,30 \pm 1,20	9,65 \pm 3,29	7,43 \pm 1,58	7,49 \pm 1,16	7,15 \pm 1,46
LF 30	8,26 \pm 4,63	8,70 \pm 3,78	7,35 \pm 1,87	8,16 \pm 2,14	9,20 \pm 2,95
LF 60	6,50 \pm 1,73	8,33 \pm 0,96	6,52 \pm 1,69	7,62 \pm 1,04	6,97 \pm 1,37
LF 120	5,15 \pm 2,32 ^a	9,30 \pm 2,86 ^{ab}	7,46 \pm 1,16 ^b	6,36 \pm 0,63 ^{ab}	8,53 \pm 3,06 ^{ab}

a, b, c, d: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Blutentnahmezeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

x, y, z: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Lactoferringruppen zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

4.3.2.2 Relative Werte

Betrachtet man den relativen Anteil der Neutrophilen an der Gesamtleukozytenzahl, so erkennt man in der Gruppe LF 120 einen signifikanten Anstieg zwischen der Woche 4 und den übrigen Entnahmezeitpunkten (siehe Tabelle 22). Die Kontrollgruppe wies im Versuchsmittel einen Prozentanteil neutrophiler Granulozyten von etwa 56,2 % auf, die Lactoferringruppen von rund 57,6 %. Besonders große Unterschiede waren in Woche 4 und in Woche 10 zu verzeichnen. Bei allen Gruppen wurde in der Woche 14 im Vergleich zur Woche 4 ein höherer prozentualer Anteil neutrophiler Granulozyten an der Gesamtleukozytenzahl gemessen. Zwischen den verschiedenen Gruppen gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Tabelle 22: Anteil der neutrophilen Granulozyten in % an der Gesamtleukozytenzahl in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert \pm Standardabweichung) in mmol/l

Gruppe	Woche 4	Woche 8	Woche 10	Woche 12	Woche 14
Kontrolle	52,0 \pm 8,9	59,2 \pm 16,9	55,7 \pm 9,1	58,2 \pm 11,8	55,8 \pm 8,1
LF 30	53,5 \pm 13,7	58,5 \pm 16,9	61,6 \pm 10,5	58,1 \pm 10,3	59,7 \pm 9,0
LF 60	53,5 \pm 7,0	59,5 \pm 4,8	57,1 \pm 5,9	56,8 \pm 5,5	61,2 \pm 7,9
LF 120	44,5 \pm 12,1 ^a	59,7 \pm 7,7 ^b	59,3 \pm 5,5 ^b	58,0 \pm 5,9 ^b	62,5 \pm 8,8 ^b

a, b, c, d: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Blutentnahmezeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

x, y, z: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Lactoferringruppen zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

4.3.2.3 Lymphozyten

4.3.2.3.1 Absolute Werte

Die Daten in Tabelle 23 zeigen, dass die Lymphozytenzahl in Woche 8 in den Lactoferringruppen im Vergleich zur Kontrolle vorübergehend anstieg, im Anschluss, ab dem Alter von zehn Wochen, wieder sank. Im Mittel lagen die Werte der Kontrollgruppe bei $4,1 \times 10^9/l$, die der Lactoferringruppen um $3,8 \times 10^9/l$. Dies bedeutet eine mittlere Reduktion der Lymphozytenzahl der Lactoferringruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe um rund 7 %, in Woche 10 sogar um 21 %. In der Kontrollgruppe waren die niedrigsten Werte in Woche 8 zu beobachten. Zu keinem Zeitpunkt konnten statistisch signifikante Unterschiede festgestellt werden.

Tabelle 23: Durchschnittlicher Gehalt an Lymphozyten im Welpenblut in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert \pm Standardabweichung) in $10^9/l$

Gruppe	Woche 4	Woche 8	Woche 10	Woche 12	Woche 14
Kontrolle	4,41 \pm 1,81	3,17 \pm 0,91	4,39 \pm 2,41	4,43 \pm 3,36	4,23 \pm 2,12
LF 30	4,14 \pm 1,26	3,91 \pm 1,75	3,45 \pm 1,89	4,31 \pm 2,07	4,22 \pm 1,45
LF 60	3,88 \pm 0,69	4,10 \pm 1,00	3,43 \pm 1,33	4,35 \pm 0,84	3,08 \pm 0,83
LF 120	4,85 \pm 1,64	4,08 \pm 0,91	3,50 \pm 1,11	3,16 \pm 1,26	3,29 \pm 1,21

a, b, c, d: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Blutentnahmezeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

x, y, z: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Lactoferringruppen zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

4.3.2.3.2 Relative Werte

Tabelle 24 verdeutlicht nochmals die Lymphozytenzahlen in Bezug auf die Gesamtleukozytenzahl im Plasma. Die mittleren Lymphozytengehalte in den Lactoferringruppen lagen bei knapp 30 %, die der Kontrollgruppe um 31 %.

Zwischen den Fütterungsgruppen konnten keine statistischen Signifikanzen erhoben werden. In der Gruppe LF 120 war ein signifikanter Unterschied zwischen dem prozentualen Lymphozytenanteil der Woche 4 und den Werten der übrigen Untersuchungszeitpunkte festzustellen.

Tabelle 24: Lymphozytenanteil in % an der Gesamtleukozytenzahl im Welpenblut in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Gruppe	Woche 4	Woche 8	Woche 10	Woche 12	Woche 14
Kontrolle	34,5 \pm 11,2	30,9 \pm 19,3	35,9 \pm 12,4	36,0 \pm 13,2	38,5 \pm 9,5
LF 30	31,4 \pm 15,6	27,9 \pm 14,5	27,5 \pm 11,8	30,5 \pm 11,6	28,0 \pm 11,6
LF 60	32,7 \pm 5,9	29,3 \pm 6,9	29,0 \pm 7,9	32,4 \pm 6,1	27,3 \pm 6,5
LF 120	43,5 \pm 11,8 ^a	27,1 \pm 6,3 ^b	27,7 \pm 7,1 ^b	27,9 \pm 7,3 ^b	25,2 \pm 8,9 ^b

a, b, c, d: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Blutentnahmezeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

x, y, z: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Lactoferringruppen zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

4.4 Immunglobulin G gegen Humanes Serum Albumin

Der spezifische Immunglobulin G-Gehalt (IgG) gegen Humanes Serumalbumin (HSA) von Kontrollgruppe, LF 30- und LF 120-Gruppe stieg zwischen erster und zweiter Entnahme leicht an. Die Konzentration erhöhte sich von durchschnittlich 223 ng/ml Plasma in Woche 8 auf durchschnittlich 288 ng/ml Plasma in Woche 10. In Woche 12 fällt der Gehalt an IgG gegen HSA wieder auf rund 223 ng/ml Plasma, um in Woche 14 auf einen Level von durchschnittlich 3693 ng/ml anzusteigen.

Die jeweiligen Mittelwerte der Immunglobulingehalte der einzelnen Fütterungsgruppen, mit Ausnahme der LF 60-Gruppe in Woche 8, unterscheiden sich nicht signifikant. In der Gruppe LF 60 liegen bei zwei Hunden in Woche 8 die Werte derart hoch, dass sich der Mittelwert deutlich, jedoch nicht signifikant, von den Mittelwerten der anderen Gruppen unterscheidet. Signifikante Unterschiede konnten in allen Gruppen zwischen den Werten, die in der 8. Woche und der 14. Woche gemessen wurden, ermittelt werden (Tabelle 25).

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Lactoferringruppen und der Kontrollgruppe ermittelt werden.

Tabelle 25: Mittlerer Gehalt an IgG gegen HSA im Blut in ng/ml Plasma in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Gruppe	Woche 8	Woche 10	Woche 12	Woche 14
Kontrolle	3,1 \pm 8,7 ^a	252,3 \pm 249,3 ^{ab}	222,1 \pm 192,2 ^{ab}	3370,8 \pm 1905,4 ^b
LF 30	7,0 \pm 19,4 ^a	287,8 \pm 198,6 ^{ab}	279,2 \pm 220,8 ^{ab}	3766,0 \pm 2126,5 ^b
LF 60	476,1 \pm 1235,9 ^a	411,3 \pm 298,3 ^{ab}	368,3 \pm 347,0 ^{ab}	3262,1 \pm 1810,2 ^b
LF 120	0,2 \pm 0,5 ^a	237,6 \pm 89,4 ^{ab}	307,3 \pm 212,3 ^{ab}	4197,4 \pm 1411,7 ^b

a, b, c, d: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Blutentnahmezeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

x, y, z: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Lactoferringruppen zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

In Woche 8 lag der Gehalt an IgG gegen HSA bei den meisten Welpen bei null. Nur einzelne wiesen geringe Gehalte auf, wie Welpen Nummer 8 der Kontrollgruppe, Hund Nummer 5 und 6 der Gruppe LF 30, Welpen Nummer 2, 6, 8 der Gruppe LF 60 und Hund Nummer 4 und 5 der Gruppe LF 120. Zum Zeitpunkt dieser ersten Blutentnahme fand die erste Impfung mit SHP und HSA statt. In der 10. Lebenswoche, zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme, war in allen Gruppen ein Gehalt von Immunglobulin G gegen HSA im Plasma festzustellen. Bei den meisten Welpen lag der IgG-Gehalt zwischen rund 100 und 400 ng/ml. Nur einige lagen oberhalb dieses Bereiches. Hund Nummer 4 der Kontrollgruppe und Hund Nummer 1 der Gruppe LF 60 wiesen die höchsten IgG-Spiegel auf (841,7 ng/ml, 887,7 ng/ml), gefolgt von Hund Nummer 2 der Gruppe LF 60 (782,5 ng/ml) und Welpen Nummer 5 der Gruppe LF 30 (702,3 ng/ml). In der Woche 12 blieben die IgG-Gehalte im Vergleich zur Woche 10 relativ konstant. Es wurde die Booster-Impfung mit SHP und HSA durchgeführt. In der 14. Woche waren die IgG-Spiegel gegen HSA in allen Versuchsgruppen auf das rund Zwölfwache der Werte in Woche 10 und 12 angestiegen.

Signifikante Unterschiede konnten zu keinem Zeitpunkt errechnet werden.

Tabelle 26: Gehalt an IgG gegen HSA im Blut in ng/ml Plasma der einzelnen Welpen in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert ± Standardabweichung)

Hund Nr.	Gruppe	Woche 8	Woche 10	Woche 12	Woche 14
1	Kontrolle	0,0±0,0	74,7±12,3	82,4±7,6	2401,9±425,5
2		0,0±0,0	165,4±33,6	524,7±61,5	3903,1±897,7
3		0,0±0,0	269,4±138,2		6137,0±2714,6
4		0,0±0,0	841,7±317,1		4915,3±2879,2
5		0,0±0,0	104,9±25,1	129,7±15,9	1438,5±366,4
6		0,0±0,0	280,3±58,8	403,1±58,5	5157,9±2145,1
7		0,0±0,0	116,7±18,6	113,4±21,7	1134,7±162,1
8		24,7±26,9	165,5±19,7	79,2±13,3	1878,2±412,5
1	LF 30	0,0±0,0	212,8±73,0	225,1±31,4	5026,3±2820,1
2		0,0±0,0	433,6±84,3	624,2±46,2	6349,2±3289,5
3		0,0±0,0	150,9±58,8	474,7±208,6	6868,3±4135,0
4		0,0±0,0	211,0±30,9		2751,3±823,4
5		54,9±18,5	702,3±364,8		3702,4±1333,3
6		0,7±0,4	329,5±11,9	172,0±23,0	2410,2±755,7
7		0,2±0,1	164,7±13,7	95,2±15,6	910,5±124,2
8		0,0±0,0	98,0±20,6	83,8±19,1	2110,1±518,8
1	LF 60		887,7±411,6	1048,8±237,1	7350,7±4536,1
2		46,1±28,5	782,5±319,3		4416,9±1751,0
3		3278,5±1731,1	445,1±230,0		2586,7±1048,3
4		0,0±0,0	118,6±49,4	164,6±17,7	2484,7±1207,4
5		0,0±0,0	97,6±44,7	138,3±69,7	2711,8±1540,4
6		1,9±1,7	486,5±89,9	314,8±31,3	2253,4±319,7
7		0,0±0,0	182,0±56,6	163,9±15,9	2056,0±390,7
8		6,1±8,8	290,5±77,5	379,1±52,1	2236,5±260,6
1	LF 120	0,0±0,0		107,1±13,2	2689,8±688,6
2		0,0±0,0	340,7±36,6		3143,2±782,0
3		0,0±0,0	370,2±41,2	534,6±25,5	3828,5±1371,7
4		1,3±0,6	252,2±15,0	473,7±25,7	4667,1±1832,1
5		0,2±0,1	144,1±41,2	51,1±20,8	2282,6±777,9
6		0,0±0,0	156,2±24,8	207,3±45,0	5683,4±3317,1
7		0,0±0,0	225,3±47,0	212,3±51,0	5359,5±3065,2
8		0,0±0,0	174,4±39,1	564,9±129,2	5925,1±3032,5

5 DISKUSSION

5.1 Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung

Das Ziel des Versuchs war die Untersuchung der Wirkung von Lactoferrin, einer prebiotischen Substanz, auf den Organismus neonataler Beaglewelpen. Dazu sollten durch die mutterlose Aufzucht standardisierte Versuchsbedingungen für alle Welpen geschaffen werden, sodass Faktoren wie Wurfgröße und Milchleistung des Muttertieres oder eine individuell unterschiedliche Milchaufnahme der Welpen die Ergebnisse nicht beeinflussen konnten. Eine ausreichend lang gewählte Versuchsdauer von 14 Wochen ermöglichte es, die Wirkungen von Lactoferrin sowohl bei Saug- als auch bei Absatzwelpen zu bestimmen.

Von besonderem Interesse, war der Frage nachzugehen, ob Lactoferrin auch extraintestinale Auswirkungen auf das Blutbild und die Produktion von spezifischen Antikörpern auf die zweimal erfolgte Impfung sowie auf die Gewichtsentwicklung zeigt. Da es bisher noch keine diesbezügliche Studie an Hundewelpen gab, war ein weiteres Anliegen, die wirksame Lactoferrinkonzentration herauszufinden. Die Unbedenklichkeit der oralen Verabreichung von Lactoferrin konnte bereits von TOMITA et al. (2002) nachgewiesen werden.

Der Versuch wurde mit 32 neonatalen Beaglewelpen durchgeführt. Die relativ kleine Gruppengröße von je acht Welpen und die ungleiche Geschlechterverteilung resultiert aus den Bemühungen, die Zahl der notwendigen Würfe so gering wie möglich zu halten. Nach LAHRSEN und ZENTEK (2002) kann die geringe Gruppengröße bei Versuchen zur Wirksamkeit von probiotischen Mikroorganismen durch ein geeignetes Versuchsdesign kompensiert werden, was für die Untersuchung der Effekte einer prebiotisch wirksamen Substanz ebenfalls sinnvoll erscheint.

Die Applikation von Lactoferrin erfolgte über das Futter, wozu das Mineralfutter, das dem Milchaustauscher beigefügt wurde, bereits mit drei verschiedenen Konzentrationen von Lactoferrin versehen wurde, was eine problemlose und einfache Verabreichung ermöglichte. Das Folgefutter in Form eines Trocken-Fertigfutters war bereits mit Lactoferrin angereichert.

Für die Versuchsphase wurden die Welpen am dritten Lebenstag von der Mutter getrennt, nach Geschlecht und Gewicht randomisiert, und in vier Fütterungsgruppen, eine Kontrollgruppe und drei verschiedene Lactoferringruppen (LF 30, LF 60, LF 120), eingeteilt. Die Gewichtsentwicklung wurde täglich festgehalten und zur Bestimmung des weißen und roten Blutbildes wurde in zweiwöchigen Abständen (außer in der sechsten Lebenswoche) aus der Vena cephalica antebrachii Blut entnommen. Zur Untersuchung der Auswirkungen von Lactoferrin direkt auf den Gastrointestinaltrakt durch LAUR (2002) und HANDL (2006) wurden außerdem in regelmäßigen Abständen Kotproben gesammelt und in der 14. Lebenswoche zum Abschluss des Versuches eine Endoskopie des GIT durchgeführt und dabei Biopsieproben entnommen.

5.2 Zusammensetzung des Milchaustauschers

Die Zusammensetzung des verwendeten Milchaustauschers orientierte sich an den physiologischen Nähr- und Mineralstoffgehalten von Hundemilch; Protein- und Fettgehalt waren geringgradig höher als bei natürlicher Hundemilch. Durch den Zusatz von Pflanzenöl konnte der hohe Bedarf der Welpen an Linolsäure gedeckt werden. Um ausreichend Arginin zur Verfügung zu stellen, erwies sich die Verwendung von Eigelb als sinnvoll. Allerdings wies der Milchaustauscher höhere Gehalte an Methionin und Cystin als natürliche Hundemilch auf. Der Lactosegehalt wurde durch Magerquark gedeckt, um die Verdaulichkeit zu fördern und ein Gerinnen, das bei Verabreichung von unfermentierter Kuhmilch im Magen der Welpen vorkommen kann, zu vermeiden. Das Calcium-Phosphor-Verhältnis lag wie in natürlicher Hundemilch bei 1,2 : 1, der Gehalt an Eisen und Kupfer lag dagegen etwas höher als physiologisch, um einer bei Neugeborenen häufig auftretenden Eisenmangelanämie vorzubeugen.

Die Dosierungen von 30, 60 und 120 Milligramm Lactoferrin pro Kilogramm Futter-Trockensubstanz ist im Vergleich zu einer Studie von JOSLIN et al. (2002) an Kälbern, die diesen 1 Gramm beziehungsweise 10 Gramm Lactoferrin pro Kalb und Tag verabreichten, relativ gering. Die Milchaustauscheraufnahme der Welpen im vorliegenden Versuch betrug am Tag drei im Durchschnitt 50 Gramm, die Trockenfutteraufnahme am Tag 98 durchschnittlich 250 Gramm. Es stellt sich somit die Frage, ob die Ergebnisse bei höheren Dosierungen anders ausgefallen wären.

Bei den vorliegenden Ergebnissen lässt sich allerdings kein Zusammenhang zwischen der Lactoferrin-Dosis und dem Grad der erzielten Wirkung herstellen.

5.3 Gewichtsentwicklung

Um zu klären, welchen Einfluss Lactoferrin auf den Stoffwechsel der Tiere nimmt, wurde die Gewichtsentwicklung der Versuchsgruppen verglichen. Bis zur dritten Lebenswoche wurden die Welpen ad libitum gefüttert, danach bekam jeder Hund eine seinem Alter und Gewicht angepasste Ration. Bei der Gruppeneinteilung der Welpen wurde durch Randomisierung versucht, Gewichtsschwankungen zwischen den Gruppen auszugleichen, da die Geburtsgewichte der Welpen, die aus unterschiedlichen Würfen stammten, erheblich waren.

Die teilweise unterschiedliche Geschlechterverteilung in den Gruppen hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Gewichtsentwicklung, ebenso wenig der Einsatz von Lactoferrin. Die vier Versuchsgruppen zeigten eine sehr ähnliche Gewichtsentwicklung. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Abbildung 5 gibt einen Überblick über die durchschnittliche Gewichtsentwicklung der Welpen der unterschiedlichen Versuchsgruppen.

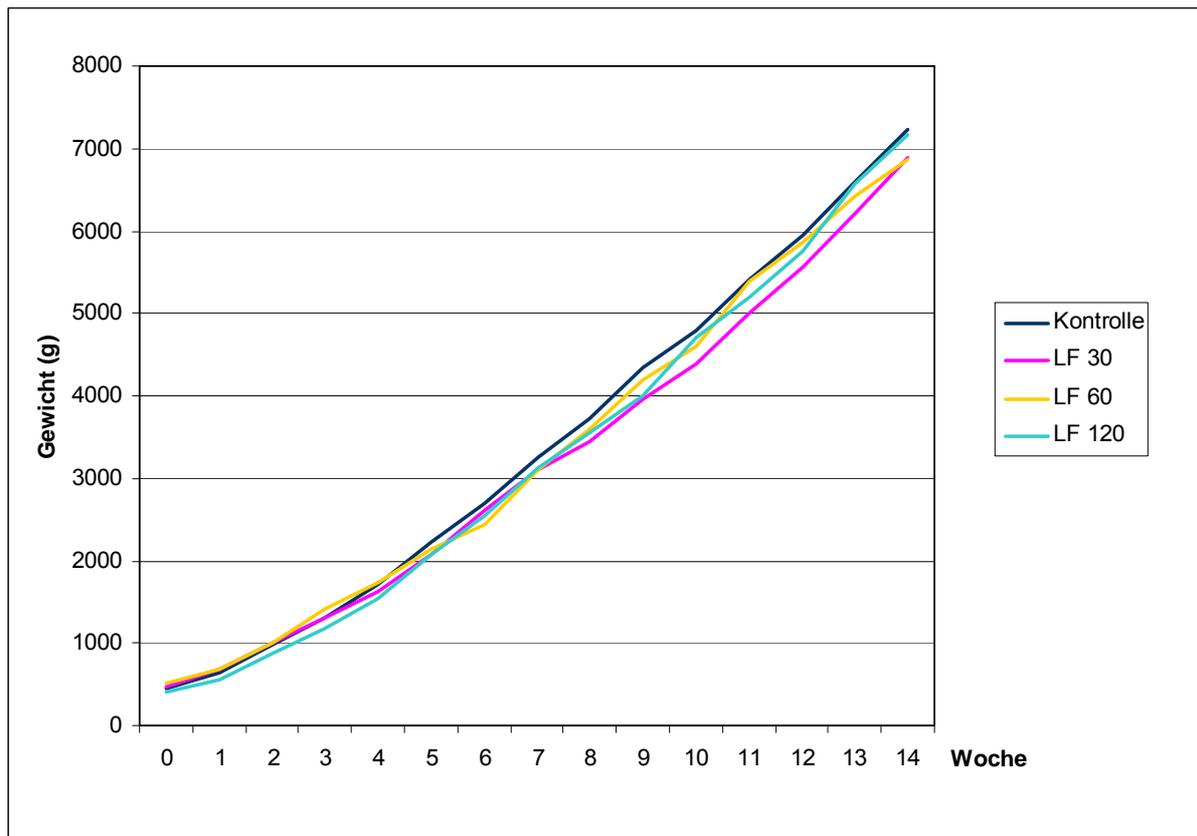


Abbildung 5: Gewichtsentwicklung der vier Versuchsgruppen (n = 8) wochenweise in g KGW (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Anders als in diversen Studien bei Nutztieren, wo verschiedene Pre- und Probiotika zur Wachstumsförderung eingesetzt wurden (siehe Tabelle 27), konnte dieser Aspekt bei der Aufzucht der Beaglewelpen nicht beobachtet werden. Die bereits erwähnte Untersuchung von JOSLIN et al. (2002) an Kälbern ergab eine gesteigerte Zunahme der beiden Lactoferringruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe und zusätzlich eine schnellere Absetzreife der lactoferrinsupplementierten Gruppen. Allerdings sind dies keine Eigenschaften, die bei der Aufzucht von Hundewelpen erwünscht sind. Ein schnelles Wachstum wirkt sich bei Hundewelpen, besonders größerer Rassen, sogar nachteilig auf die Skelettentwicklung und die Gesundheit der Tiere aus. Beim Einsatz von Lactoferrin bei Hunden steht vor allem die gesundheitsfördernde Wirkung im Vordergrund.

Tabelle 27: Einfluss verschiedener Probiotika auf die Leistung einiger landwirtschaftlicher Nutztiere (nach Busch et al. 1999)

Produktionszweig	tägliche Zunahme (% zur Kontrolle)	Futtermittelverbrauch (% zur Kontrolle)
Ferkelaufzucht	+ 4,8 (-8,1 bis +24,3)	- 1,5 (+3,1 bis -9,3)
Kälberaufzucht	+ 5,4 (-5,3 bis +21,7)	- 2,5 (+3,6 bis -7,9)
Schweinemast	+ 3,7 (-0,3 bis +6,7)	- 5,1 (-1,4 bis -7,1)
Rindermast	+ 3,4 (-4,3 bis +7,2)	- 2,7 (+7,6 bis -4,7)

Vergleicht man die Gewichtszunahme der Welpen im vorliegenden Versuch mit mutterloser Aufzucht zu Studien an Welpen, die beim Muttertier heranwuchsen (KIENZLE et al., 1985), so wiesen die mutterlos aufgezogenen Welpen bei fast gleicher Milchmengenaufnahme in den ersten vier Wochen eine geringere Zunahme auf. Der Grund dafür liegt vermutlich an dem, im Vergleich zur Muttermilch (0,65 MJ Bruttoenergie/ 100 g), um rund 25 % geringeren Energiegehalt des Milchaustauschers (0,49 MJ Bruttoenergie/100 g).

5.4 Rotes und weißes Blutbild

Da zur Erstellung eines Blutbildes mittels Cell Dyn mindestens ein halber Milliliter Blut benötigt wird, konnte es erst ab einem Welpenalter von vier Wochen bestimmt werden, da es zuvor nicht möglich war, eine ausreichend große Blutmenge zu gewinnen.

Die Angaben über physiologische Blutwerte bei Jungtieren variieren in der Literatur sehr stark. Besonders bei domestizierten Tieren sind die Werte stark abhängig von den äußeren Haltungsbedingungen, der Fütterung und der rassebedingten Wachstumsgeschwindigkeit. Dennoch kann bei den verschiedenen Autoren die gleiche Tendenz der Veränderungen beobachtet werden (WALSER, 1990).

5.4.1 Rotes Blutbild

Die Erythrozytenzahlen neonataler Hundewelpen unterliegen wie alle Blutwerte der Neugeborenen, starken Schwankungen. Während der Fetalzeit herrschen die hepatische und lienale Erythropoese vor. Bereits zum Zeitpunkt der Geburt ist das Knochenmark der Hauptort der Erythropoese während Leber und Milz nur noch marginal beteiligt sind; postnatal ist dann das Knochenmark das alleinige erythropoetische Organ. Der neugeborene Welpen weist im Vergleich zum adulten Hund niedrige Erythrozytenzahlen, einen niedrigen Hämoglobingehalt und niedrige Hämatokritwerte auf. Diese Werte sinken in den ersten drei Lebenswochen weiter, bedingt, durch einen physiologischen Abbau der pränatalen, großen Erythrozyten und die noch geringe myeloische Erythropoese sowie den Anstieg des Blutvolumens durch das rasche Wachstum in diesem Alter. Anschließend steigen die Zahl der roten Blutkörperchen, der Hämoglobingehalt und der Hämatokrit kontinuierlich an, bis im Alter von etwa sechs Monaten die endgültigen Werte eines adulten Hundes erreicht sind.

In dem vorliegenden Versuch lässt sich der Anstieg der Erythrozytenzahl und des Hämoglobingehaltes (Abbildung 6) ab der vierten Lebenswoche erkennen. Die Applikation von Lactoferrin hatte auf diese Parameter keinen Einfluß. Lediglich in der vierten Lebenswoche konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Erythrozytenzahlen und dem Hämoglobinspiegel der Lactoferringruppen LF 60 und LF 120 nachgewiesen werden, der Hämoglobinwert der Gruppe LF 120 unterschied sich außerdem signifikant zum Wert der Kontrollgruppe und zum Wert der Gruppe LF 60. Diese Tendenz setzte sich jedoch nicht weiter fort und ist anscheinend ein Zufallsbefund. Ab der zwölften Woche gleichen sich die Werte der einzelnen Gruppen immer mehr an und die Kontrollgruppe, die in Woche vier noch die niedrigsten Zahlen aufwies, zeigt dann sogar die höchsten Werte, was wiederum nicht für einen Zusammenhang mit der Lactoferrinfütterung spricht. Es lassen sich lediglich die physiologischen Schwankungen mit einem erst schnellen, dann immer langsameren Anstieg der Werte des roten Blutbildes erkennen (Abbildung 6).

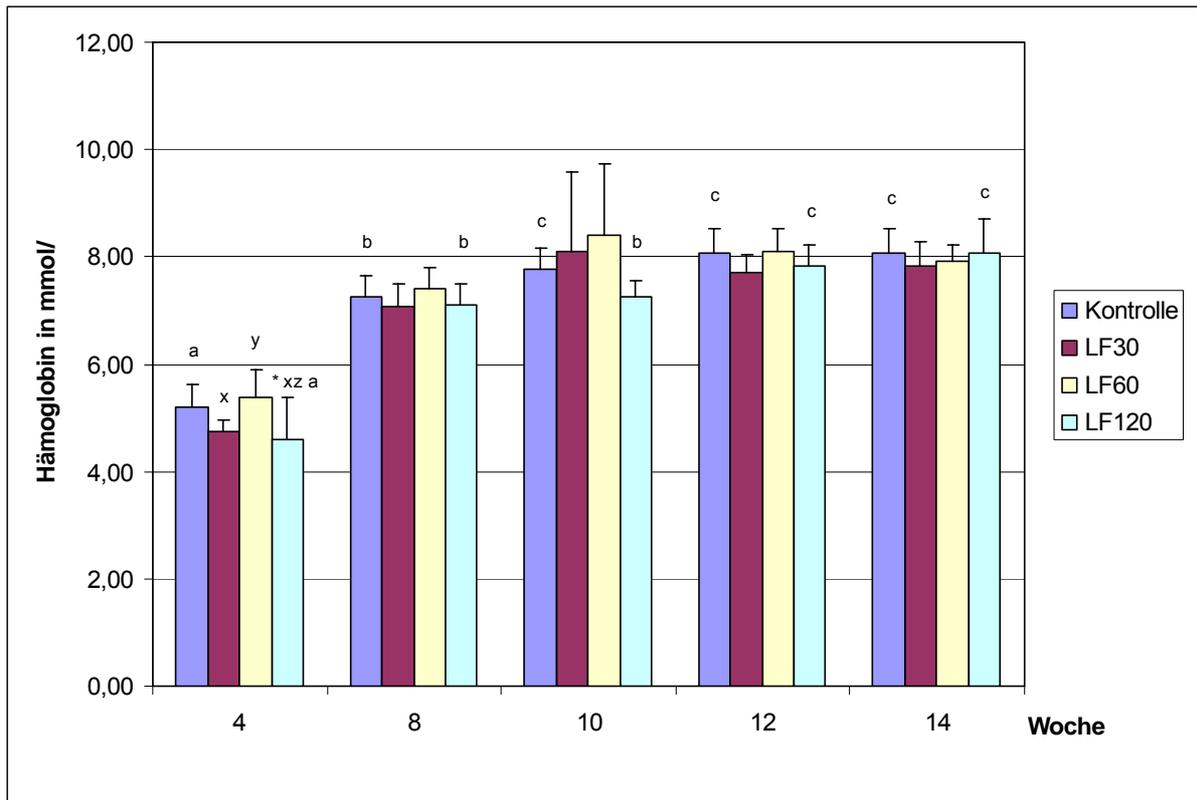


Abbildung 6: Durchschnittlicher Hämoglobinwert im Welpenblut der vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert \pm Standardabweichung) in mmol/l

a, b, c, d: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Blutentnahmezeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

x, y, z: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Lactoferringruppen zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

Im Gegensatz dazu haben SAZAWAL et al. (2004) in einer Studie an 634 gesunden Kindern, im Alter zwischen einem und drei Jahren, das präventive Potential von Milch, die mit *Bifidobacterium lactis* HN019 und Galacto-Oligosacchariden angereichert war, untersucht und haben neben der Verringerung der Inzidenz und Prävalenz von Dysenterien eine signifikante Zahl von Kindern mit erhöhten Hämoglobinleveln verzeichnet. Dieses Ergebnis könnte daraus resultieren, dass zusammen mit dem Prebiotikum auch ein Probiotikum eingesetzt wurde. Die Hämoglobinerhöhung könnte also entweder durch das Probiotikum erzielt und möglicherweise sogar noch durch den synbiotischen Effekt der beiden Stoffe potenziert worden sein. Denkbar ist aber auch, dass die beim Menschen erzielten Ergebnisse, nicht auf Hunde übertragbar sind oder aber Lactoferrin, eine prebiotisch wirksame Substanz, nicht die gleiche Wirkung wie ein „echtes“ Prebiotikum zeigt.

Zur Entwicklung des Hämoglobinwertes bei neonatalen Kälbern gibt es eine Untersuchung von KUME und TANABE (1994), die herausfanden, dass im Gegensatz zum physiologischen Absinken des Hämoglobinwertes bei Kälbern zwischen dem ersten und zehnten Lebenstag, durch Zufütterung von Eisen in Form von FeSO_4 beziehungsweise Fe^{2+} der Hämoglobinspiegel anstieg. Bei der Supplementierung mit eisengesättigtem Lactoferrin blieb er dagegen nahezu konstant, das heißt im Vergleich zur unsupplementierten Kontrollgruppe war er erhöht. Diese Ergebnisse beruhen jedoch auf der Eisensupplementierung und dem Einsatz von Lactoferrin als Eisen-Carrier und lassen sich auf den vorliegenden Versuch nicht direkt übertragen. Allerdings stellt sich die Frage, ob Lactoferrin bei den Beaglewelpen die Eisenaufnahme nicht auch hätte verbessern können und somit eine Erhöhung des roten Blutbildes hätte erreichen können.

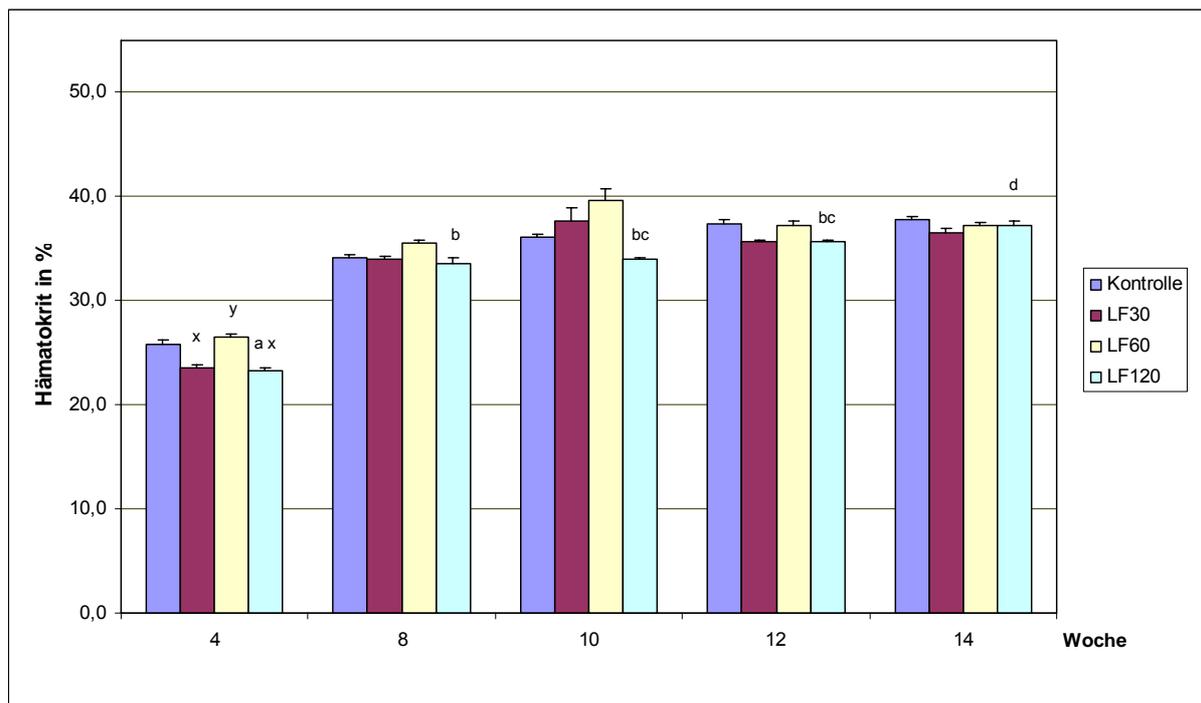


Abbildung 7: Durchschnittlicher Hämatokritwert im Welpenblut in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert \pm Standardabweichung) in %

a, b, c, d: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Blutentnahmezeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

x, y, z: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Lactoferringruppen zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

Der Hämatokrit (Abbildung 7) zeigt einen ähnlichen Verlauf, wie Erythrozytenmenge und Hämoglobingehalt, da er den gleichen physiologischen Mechanismen unterworfen ist und die Lactoferrinzufütterung auch hier keine Auswirkungen zeigte. Er stieg während der gesamten Versuchszeit an, zu Beginn steiler als gegen Ende des Versuchs. Signifikante Unterschiede zwischen den drei Lactoferringruppen traten lediglich in Woche 4 zu Tage, scheinen aber nicht mit der Lactoferrinfütterung in Zusammenhang zu stehen. Auch JOSLIN et al. (2002) können bei ihrer Untersuchung an neugeborenen Kälbern, die sich über 56 Tage erstreckte, keine Beeinflussung des Hämatokritwertes durch die orale Applikation von Lactoferrin nachweisen.

5.4.2 Weißes Blutbild

Bei der Bewertung des Leukozytengehaltes läßt sich kein eindeutiger Trend erkennen. In Woche 8 und 10 liegt die Gesamtkonzentration der Leukozyten der Kontrollgruppe höher, als die der Lactoferringruppen. Für dieses Phänomen gibt es keine logische Erklärung.

Der Lymphozytengehalt (Abbildung 8) zeigt einen anderen Verlauf. In der achten Lebenswoche liegt er, im Vergleich zwischen Kontrolle und Lactoferringruppen, bei der Kontrolle niedriger, in der zehnten Woche kann man dafür den gegenteiligen Effekt beobachten. Der Anstieg der Lymphozyten wäre mit dem Impftermin in der achten Lebenswoche erklärbar, da die Injektion von attenuierten Viren eine lymphozytäre Reaktion hervorrufen sollte, die möglicherweise durch Lactoferrin gemindert sein könnte. Allerdings müsste sich der gleiche Kurvenverlauf dann auch zwischen Woche 12 und 14, nach dem zweiten Impftermin wiederholen, was nicht der Fall ist.

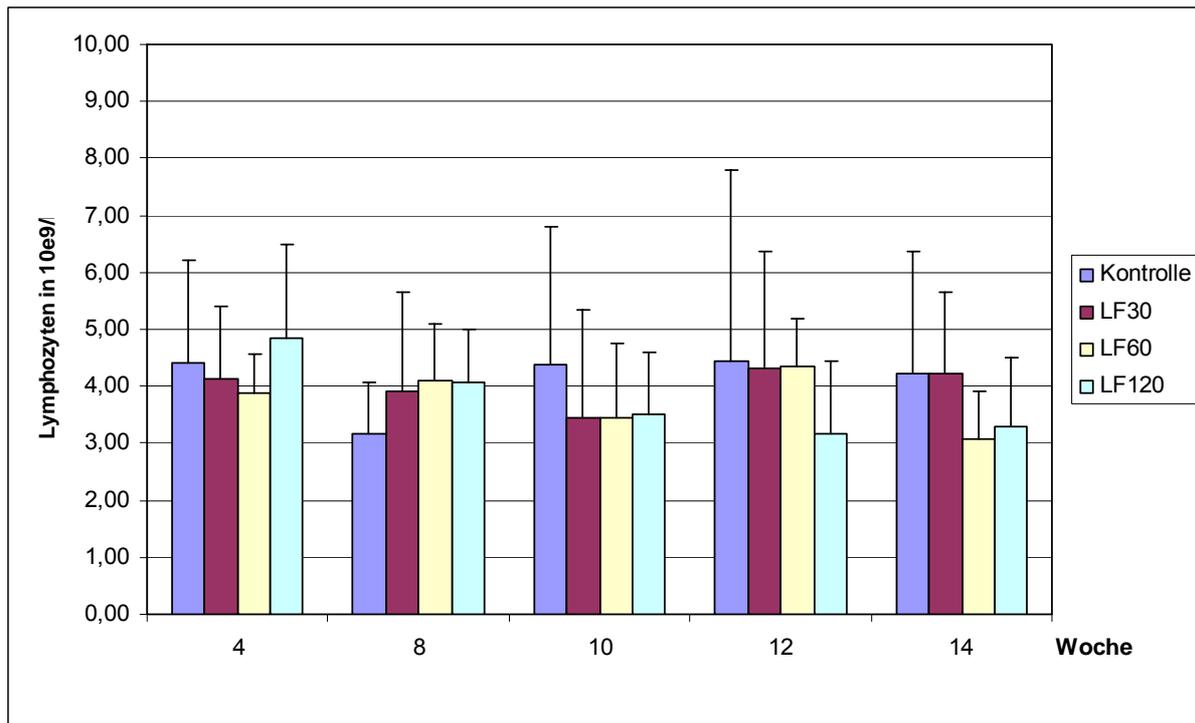


Abbildung 8: Durchschnittlicher Gehalt an Lymphozyten im Welpenblut in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert \pm Standardabweichung) in $10^9/l$

a, b, c, d: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Blutentnahmezeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

x, y, z: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Lactoferringruppen zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

Allerdings zeigt sich bei Betrachtung des relativen Anteils der Lymphozyten am Gesamtleukozytengehalt, dass von Woche 8 bis zum Ende des Versuchs die Kontrollgruppe den höchsten prozentualen Gehalt aufweist, während alle Lactoferringruppen darunter liegen. In Woche 4 liegt lediglich der prozentuale Lymphozytengehalt der Gruppe LF 120 höherer als der der Kontrollgruppe. Abbildung 9 verdeutlicht die relativen Lymphozytenzahlen und zeigt, dass die mittleren Lymphozytengehalte in den Lactoferringruppen unter 30 %, die der Kontrollgruppe um 37 % lagen. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei GRIESHOP et al. (2004), die die Wirkung von Oligosacchariden an 35 älteren Hunden verschiedener Rassen untersuchten. Es zeigte sich, dass die Gruppe, deren Futter 1 % Mannan-Oligosaccharid zugesetzt wurde, erniedrigte periphere Lymphozytenzahlen im Vergleich zur unsupplementierten Kontrollgruppe aufwies.

Dieses Phänomen lässt vermuten, dass die Lactoferrinapplikation auf die Zusammensetzung des weißen Blutbildes eine Wirkung gezeigt hat.

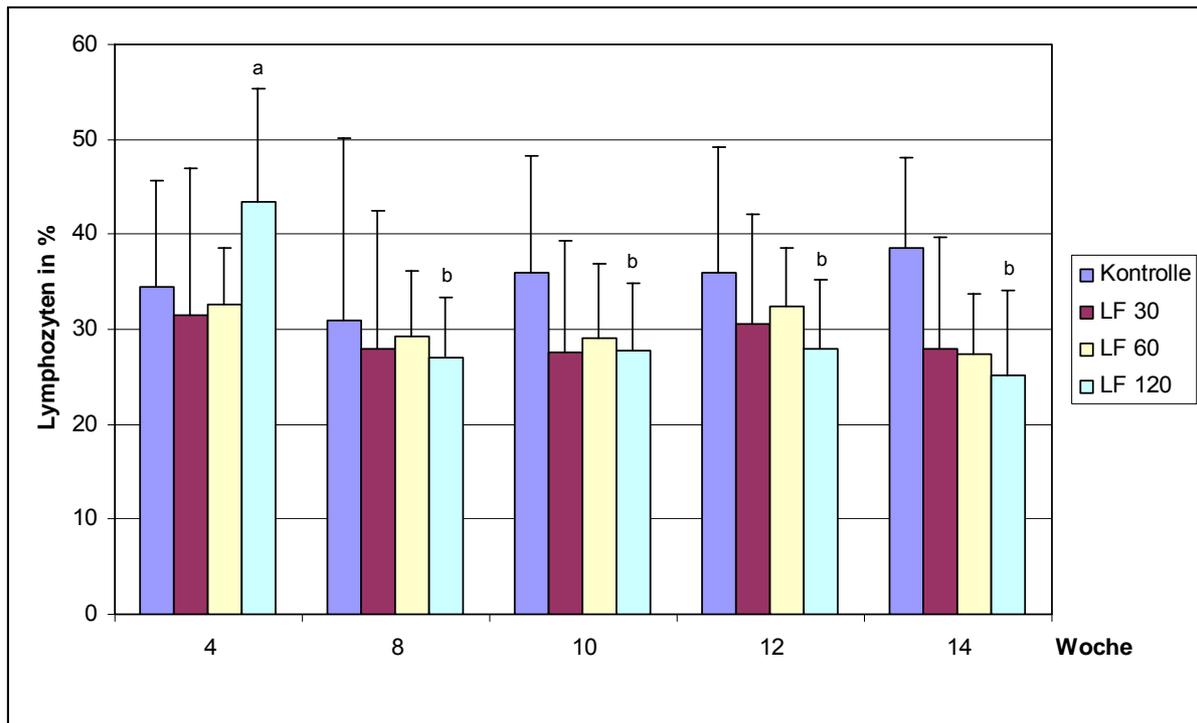


Abbildung 9: Lymphozytenanteil in % an der Gesamtleukozytenzahl im Welpenblut in vier experimentellen Gruppen zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert \pm Standardabweichung)

a, b, c, d: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Blutentnahmezeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

x, y, z: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Lactoferringruppen zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

Sieht man sich den prozentualen Anteil der neutrophilen Granulozyten an, so fällt auf, dass die Tendenz, die bei den Lymphozyten erkennbar ist, bei den Neutrophilen in milder Form umgekehrt zu beobachten ist, das heisst, es liegt ab der achten Woche ein gleich hoher beziehungsweise leicht erniedrigter prozentualer Gehalt an neutrophilen Granulozyten der Kontrollgruppe, im Vergleich mit den Lactoferringruppen, vor.

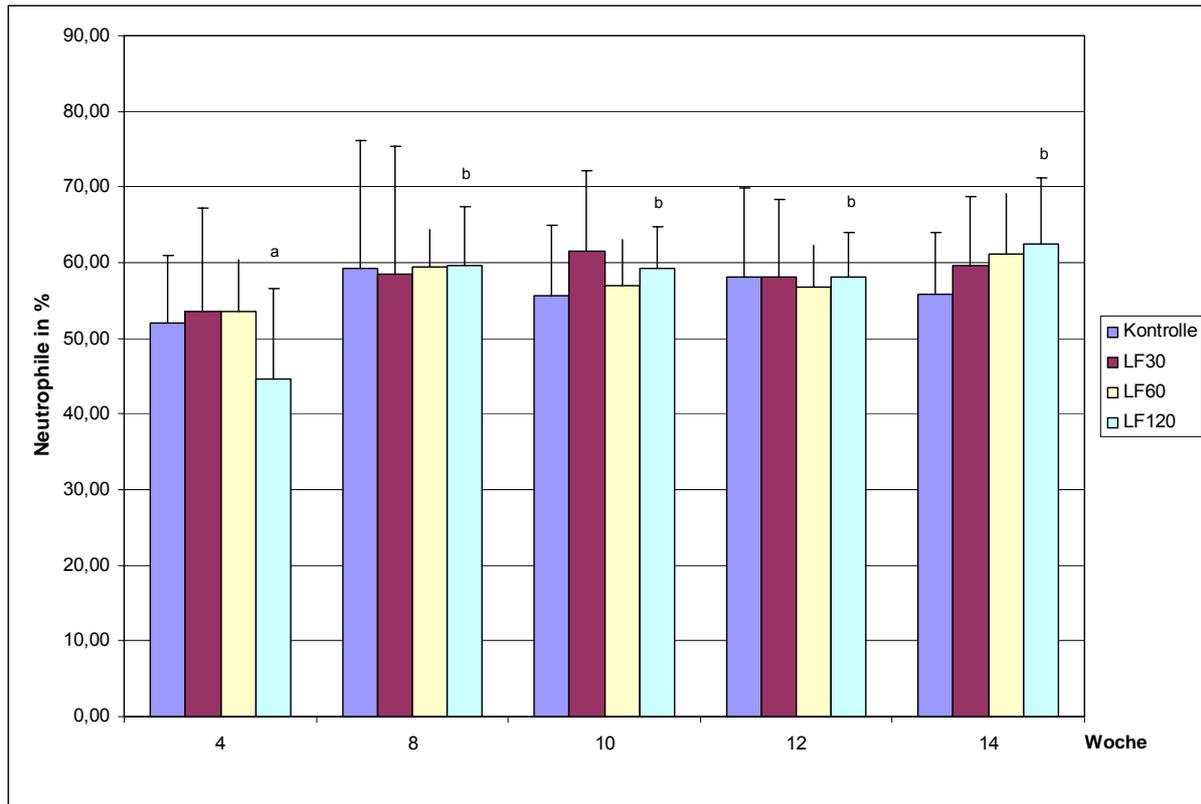


Abbildung 10: Anteil der neutrophilen Granulozyten in % an der Gesamtleukozytenzahl in vier Gruppen (n = 8) zu fünf Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwert \pm Standardabweichung)

a, b, c, d: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Blutentnahmezeitpunkten innerhalb einer Gruppe

*: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

x, y, z: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Lactoferringruppen zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

Da die Welpen aller Gruppen während der gesamten Versuchsdauer gesund waren, kommt eine krankheitsbedingte relative Lymphozytose der Welpen der Kontrollgruppe nicht als Ursache in Frage. Möglicherweise übt Lactoferrin, wie in mehreren Studien bereits konstatiert, auf die immunologischen Vorgänge der Welpen einen Einfluß aus. Welche genauen Mechanismen dieser Tatsache zugrunde liegen, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse und der Ergebnisse anderer Studien nicht klar dargestellt werden.

Bekanntermaßen spielen die Lymphozyten eine Rolle bei der Abwehr von Infektionskrankheiten, besonders solcher mit viraler Genese. Es wird angenommen, dass die orale Aufnahme von Lactoferrin über intestinale Zellen und GALT-Zellen in der Lage ist, auch systemische Wirkung auf das Immunsystem zu entfalten, beziehungsweise die Leukozyten im GALT, die anschließend systemisch aktiv werden, direkt zu stimulieren (TOMITA et al., 2002).

Frühere Untersuchungen am Menschen (ZIMECKI et al., 1998) und an Mäusen (Zimecki et al., 1991; Iigo et al., 1999, Wang et al., 2000; Kuhara et al., 2001) zeigten, im Gegensatz zu den hier vorliegenden Ergebnissen, einen stimulierenden Einfluß von Lactoferrin auf die Produktion von Lymphozyten im Darm und im Blut. Alle erwähnten Studien waren auf wesentlich kürzere Zeiträume als die vorliegende Untersuchung beschränkt. Es scheint daher möglich, dass Lactoferrin zu Beginn einer Studie, beziehungsweise bei einem kurzen Applikationszeitraum, zu einer gesteigerten Proliferation der Lymphozyten führt, bei Langzeitbehandlung aber den gegenteiligen Effekt ausübt.

Da die Lymphozytenzahlen bei Jungtieren sehr starken Schwankungen unterliegen (WALSER, 1990) und die Standardabweichung besonders in der Kontrollgruppe hoch ist, ist die Möglichkeit eines Zufallsbefundes jedoch nicht auszuschließen.

5.5 Immunglobulin G gegen Humanes Serum Albumin

Der Verlauf der Konzentration von spezifischem Immunglobulin G (IgG) gegen Humanes Serum Albumin (HSA) scheint durch die Supplementierung von Lactoferrin nicht beeinflusst worden zu sein.

Wie zu erwarten, sind bei der Blutentnahme in der achten Lebenswoche, vor der ersten Injektion von HSA, keine spezifischen Antikörper vorhanden. Lediglich bei einem Hund der Gruppe LF 60 wurde ein hoher Gehalt gemessen, was allerdings als Messfehler zu werten ist. Die physiologischen Vorgänge, die sich bei einer Impfung abspielen, lassen sich an den Kurven sehr gut nachvollziehen. So stieg die Konzentration der spezifischen Anti-HSA-Antikörper nach der ersten subcutanen Applikation von HSA bereits in einem moderaten Bereich auf im Mittel 296 ng/ml an, blieb dann, bis zur zweiten Applikation von HSA in Woche 10, konstant, um danach deutlich den sogenannten Booster-Effekt von Impfungen erkennen zu lassen und auf Werte von durchschnittlich 3650 ng/ml anzusteigen.

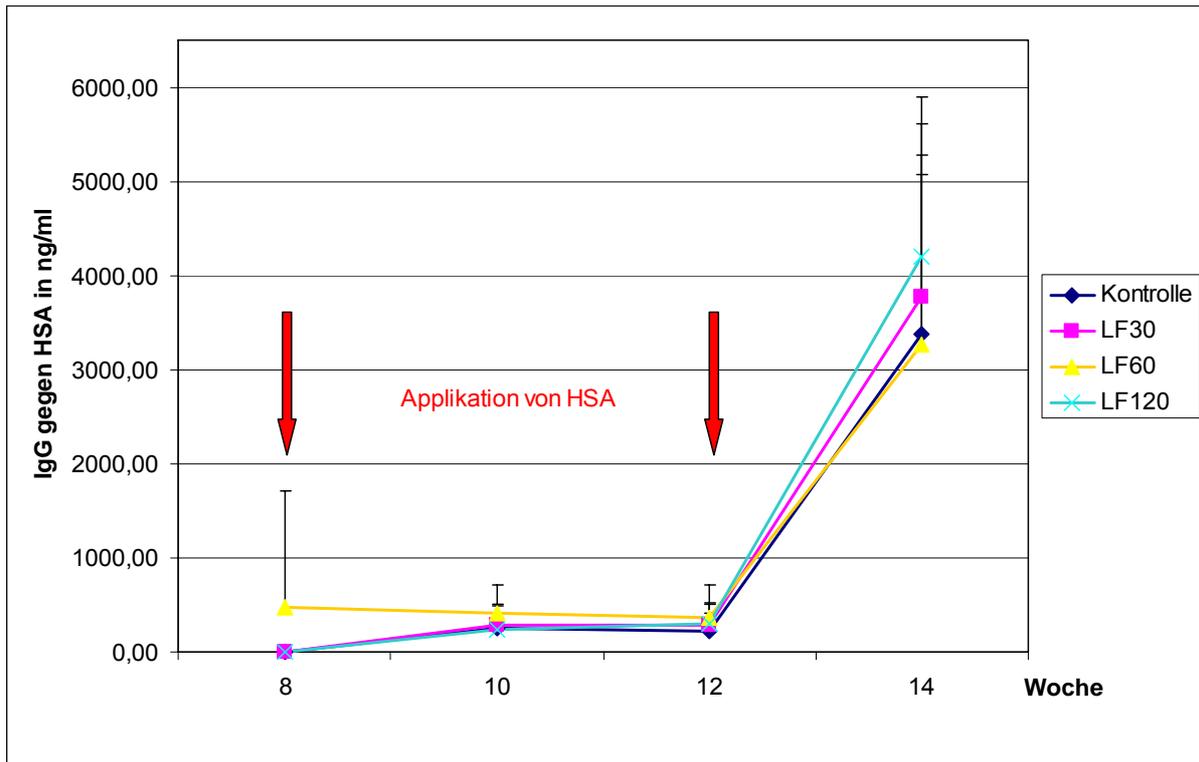


Abbildung 11: IgG gegen HSA in ng/ml Plasma in vier Gruppen (n = 8) zu vier Entnahmezeitpunkten in ng/ml Plasma (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Statistische Signifikanzen siehe Tabelle 25, S. 84)

Abbildung 12 zeigt am Beispiel der Gruppe LF 120, dass der Anti-HSA-Antikörpergehalt der einzelnen Hunde, besonders in Woche 14, sehr stark variiert. Die gemittelten Werte der vier Versuchsgruppen lagen allerdings sehr nahe beieinander und lassen keine Auswirkungen von Lactoferrin erkennen (Abbildung 11).

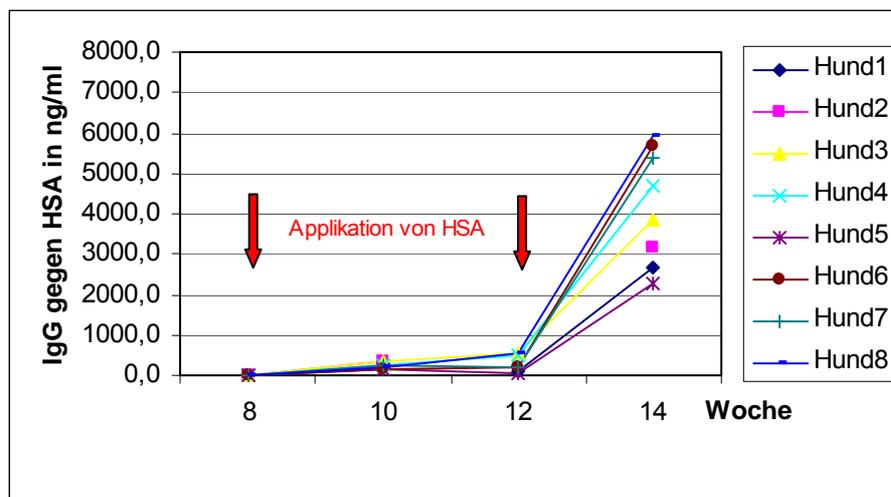


Abbildung 12: IgG gegen HSA in ng/ml Plasma in der Gruppe LF 120 zu vier Entnahmezeitpunkten in ng/ml Plasma (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Statistische Signifikanzen siehe Tabelle 26, S. 84)

Eine Studie von BUNOUT et al. (2002) bestätigt diese Feststellung. Sie untersuchte die Effekte, die die orale Aufnahme einer prebiotischen Mischung (70 % Raftilose und 30 % Raftilin) durch alte Menschen über 28 Wochen erzielte. Hauptpunkt dieser Studie war die Untersuchung eines Effektes dieser prebiotischen Substanzen auf die Immunreaktion, die die Personen auf die einmalige Impfung gegen Influenza und Pneumokokken in Woche 2 des Versuches zeigten. Auch BUNOUT et al. (2002) konnten keinen Unterschied der spezifischen Immunglobulinkonzentration gegen die Impfviren und dem Titer an sekretorischen IgA zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe nachweisen. Eine weitere Studie von DUGGAN et al. (2003) wurde mit Kindern in Peru durchgeführt, deren Nahrung im ersten Versuch mit dem Prebiotikum Oligofructose, im zweiten Versuch mit einer Kombination aus Zink und Oligofructose angereichert wurde. Bei beiden Versuchen gab es eine Kontrollgruppe ohne Supplementierung. Der spezifische Antikörpergehalt nach einer Impfung gegen *Haemophilus influenzae* Typ B war in allen vier Gruppen gleich, was verdeutlicht, dass auch Oligofructose keinen Einfluß auf die systemische Antikörperproduktion zeigt.

Andere Untersuchungen, die sich mit immunologischen Effekten von Prebiotika beschäftigen, zeigen eine lokale Steigerung der sekretorischen IgA im Darm von Ratten (ROLLER et al., 2004) und Mäusen (DEBBABI et al., 1998). Systemische Wirkungen von Lactoferrin oder Prebiotika auf das Immunsystem konnten bisher noch nicht nachgewiesen werden. SCHLEY und FIELD (2002) vermuten eine Modulation von Immunparametern im GALT, sekundären lymphoiden Geweben und auch der peripheren Zirkulation durch die Aufnahme von Prebiotika.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Lactoferrin, einer prebiotisch wirksamen Substanz, auf das Blutbild sowie die spezifische Immunantwort am Modell der mutterlosen Aufzucht von neonatalen Beaglewelpen untersucht. Lactoferrin ist ein eisenbindendes Glykoprotein, das in der Milch sowie in diversen Sekreten verschiedener Säugetierspezies vorkommt. Es zeigte in bisherigen Studien, neben vielen anderen Wirkungen, stoffwechselfördernde und immunmodulatorische Eigenschaften.

Die vorliegenden Untersuchungen, die sich über 14 Wochen erstreckten, wurden mit 32 Welpen in vier Versuchsgruppen ($n=8$), die verschiedene Lactoferrindosierungen (0, 30, 60, 120 mg Lactoferrin/kg Milchaustauscher bzw. Trockenalleinfutter) erhielten, durchgeführt. Bis zum Absetzalter von acht Wochen wurden sie mit selbst hergestelltem, bilanziertem Milchaustauscher, anschließend mit einem kommerziellen, bilanzierten Trockenalleinfuttermittel ernährt.

Die Lactoferringabe hatte keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung der Welpen. Bei der Beurteilung der Blutwerte fielen beim weißen Blutbild positive Tendenzen in den Lactoferringruppen auf. So zeigten die Lactoferringruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe ab der achten Lebenswoche niedrigere relative Lymphozytenghalte, was eine antiproliferative Wirkung von Lactoferrin auf die Bildung der Lymphozyten vermuten lässt. Die Proliferation von neutrophilen Granulozyten wurde durch Lactoferrin eher gefördert, da die Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe einen etwas erhöhten Gehalt aufwiesen. Es konnte jedoch keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

Am roten Blutbild zeigte sich der typische Verlauf, der bei der Entwicklung neonataler Hundewelpen im Allgemeinen beobachtet werden kann; die orale Aufnahme von Lactoferrin veränderte die Ergebnisse nicht.

Als Parameter für die Immunantwort wurde die Bildung von Anti-Humanes-Serum-Albumin-Antikörpern bestimmt. Auf die Bildung spezifischer Antikörper, hervorgerufen durch die zweimalige subcutane Applikation von Humanem Serum

Albumin, zeigte Lactoferrin keinen Einfluss. Daher konnte kein direkter Zusammenhang zwischen Lactoferringabe und Immunantwort beobachtet werden.

Es zeigte sich, dass eine orale Gabe von Lactoferrin bei gesunden Beaglewelpen keine Verbesserung der spezifischen Immunantwort bewirkt. Jedoch kann über eine antiproliferative Wirkung von Lactoferrin auf die Lymphozytenbildung spekuliert werden.

7 SUMMARY

Silke Regulski

Lactoferrin-supplementation to newborn beagle puppies – effects on immune system and blood parameters

In this study the effects of the prebiotic acting substance lactoferrin on blood parameters and the specific immune reaction were investigated in the model of orphan-reared neonatal beagle-puppies. Lactoferrin is an iron-binding glycoprotein that can be detected in milk and other external secretions of various mammals. In addition to many other functions it has shown stimulating effects on metabolism and immune system in previous trials.

For this 14-week trial 32 beagle-puppies were split in four groups (n = 8) with different lactoferrin inclusion levels (0, 30, 60, 120 mg Lactoferrin/kg milk replacer or dog food). The dogs were fed self-made, balanced milk replacer until weaning during week 8, followed by a commercial dry dog food.

Application of Lactoferrin to the puppies had no influence on the increase of body weight. Looking at blood parameters some tendencies of the lactoferrin-supplemented groups within the white blood cell parameters could be detected. Treatment groups showed a decrease of relative lymphocyte numbers compared to those of the control group, what could be due to an anti-proliferating activity of lactoferrin on lymphocytes. Proliferation of neutrophil granulocytes was stimulated by lactoferrin, shown by the slightly increased levels of neutrophils in the treatment groups. No statistical significance could be detected.

The typical physiological pattern of the development of red blood cell parameters during the first weeks of newborn puppies could be seen, while oral lactoferrin admission did not change any of these results.

The production of anti human serum albumine antibodies was chosen as a parameter for the investigation of the effect of lactoferrin on the immune status. Lactoferrin did not show any influence on the proliferation of specific antibodies,

induced by the subcutaneous application of human serum albumine for two times during week 8 and 12. Therefore, no direct association between lactoferrin-supplementation and immune response could be observed.

It could be shown, that the application of lactoferrin did not increase the immune response in healthy beagle-puppies, but it can be discussed whether it induces an antiproliferative effect on the production of lymphocytes.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Andersen J.H., Osbakk S.A., Vorland L.H., Traavik T., Gutteberg T.J. (2001)

Lactoferrin and cyclic lactoferricin inhibit the entry of human cytomegalovirus into human fibroblasts.

Antiviral Res 51: 141-149

Anderson B.F., Baker H.M., Dodson E.J., Norris G.E., Rumball S.V., Waters J.M., Baker E.N. (1987)

Structure of human lactoferrin at 3.2-Å resolution.

Proc Natl Acad Sci USA 84: 1769-1773

Anderson B.F., Baker H.M., Norris G.E., Rice D.W., Baker E.N. (1989)

Structure of human lactoferrin: crystallographic analysis and refinement at 2.8 Å resolution.

J Mol Biol 209: 711-734

Anderson R., Lukey P.T. (1987)

A biological role for ascorbate in the selective neutralization of extracellular phagocyte-derived oxidants.

Annals of the New York Academy of Sciences 498: 229-247

Arnold R. R., Cole M. F., McGhee J. R. (1977)

A bactericidal effect for human lactoferrin.

Science 197: 281-286

Baker E.N. (1994)

Structure and reactivity of transferrins.

Adv Inorg Chem 41: 389-463

Baker E.N., Baker H.M., Kidd R.D. (2002)

Lactoferrin and transferrin: Functional variations on a common structural framework.

Biochem Cell Biol 80: 27-34

Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K., Tomita M. (1992)

Identification of the bactericidal domain of lactoferrin.

Biochim Biophys Acta 1121: 130-136.

Bi B.Y., Levebvre A.M., Dus D., Spik G., Mazurier J. (1997)

Effect of lactoferrin on proliferation and differentiation of the Jurkat human lymphoblastic T-cell line.

Arch Immunol Ther Exp 45: 315-320

Bielecka M., Biedrzycka E., Majkowska A (2002)

Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness.

Food Res Int 35: 125-131

Blaut M. (2003)

Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora.

European Journal of Nutrition 41

Brady L.J., Gallaher D.D., Busta F.F. (2000)

The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer.

J Nutr 130: 410-414

Brock J.H. (2002)

The physiology of lactoferrin.

Biochem Cell Biol 80: 1-6

Bullen J.J. (1981)

The significance of iron in infection.

Rev Infec. Dis 3: 1127-1138

Bunout D., Hirsch S., Pia de la Maza M., Munoz C., Haschke F., Steenhout P., Klassen P., Barrera G., Gattas V., Petermann M. (2002)

Effects of prebiotics on the immune response to vaccination in the elderly.

J Parenter Enteral Nutr (JPEN) 26 (6): 372-376

Busch A., Herrmann H.H., Kühn I., Simon O., Struck J., Süphke E. (1999)

Probiotika in der Tierernährung.

Agri Media, Bonn (Arbeitsgemeinschaft für Wirkstoffe in der Tierernährung e. V.)

Cabell C.A., Ellis N.R. (1942)

The vitamin E content of certain varieties of wheat, corn, grasses and legumes.

The Journal of Nutrition 23: 633-644

Cervený C., Chew B.P., Cha N., Wong T.S., Park J.S., Weng B.C., Hayek M.G., Reinhart G.A. (1998)

Lutein uptake by blood, and leukocytes in the dog.

FASEB Journal 12: A.857 (4964)

Chandra R.K., Sudhakaran L. (1990)

Regulation of immune response by vitamin B6.

Annals of the New York Academy of Sciences 585: 404-423

Chew B.P. (1995)

Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health.

The Journal of Nutrition 125 (6 Suppl.): 1804S-1808S

Chierici R., Sawatzki G., Tamisari L., Volpato S., Vigi V. (1992)

Supplementation of an adapted formula with bovine lactoferrin. 2. Effects on serum iron, ferritin and zinc levels.

Acta Paediatr 81 (6-7): 475-479

Christensen H.R., Frokiaer H., Pestka J.J. (2002)

Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells.

J Immunol 168: 171-178

Coburn S.P., Mahuren J.D. (1987)

Identification of pyridoxine 3-sulfate, pyridoxal 3-sulfate and N-methylpyridoxine as major urinary metabolites of vitamin B-6 in domestic cats.

The Journal of Biochemical 262: 2642-2644

Conway P.L., Gorbach S.L. Goldin B.R. (1997)

Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells.

J Dairy Sci 70: 1-12

Cox T.M., Mazurier J., Spik G., Montreuil J., Peters T.J. (1979)

Iron-binding proteins and influx of iron across the duodenal brush border.

Evidence for specific lactotransferrin receptors in the human small intestine.

Biochim Biophys Acta 588: 120-128

Crittenden R.G., Morris L.F., Harvey M.L., Tran L.T., Mitchell H.L., Playne M.J. (2001)

Selection of a Bifidobacterium strain to complement resistant starch in a synbiotic yoghurt.

J Appl Microbiol 90: 268-278

Cumberbatch M., Dearman R.J., Uribe-Luna S., Headon D.R., Ward P.P., Conneely O.M., Kimber I. (2000)

Regulation of epidermal Langerhans cell migration by lactoferrin.

Immunology 100: 21-28

Debbabi H., Dubarry M., Rautureau M., Tome D. (1998)

Bovine lactoferrin induces both mucosal and systemic immune response in mice.

J Dairy Res 65: 283-293

Delzenne, N.M. (2003)

Oligosaccharides: state of the art.

Proc Nutr Soc 62 (1): 177-182

De Simone C., Vesely R., Bianchi Salvadori B., Jirillo E. (1993)

The role of probiotics in modulation of the immune system in man and in animals.

J Immunol 9: 23-28

Devi A.S., Das M.R., Pandit M.W. (1994)

Lactoferrin contains structural motifs of ribonuclease.

Biochim Biophys Acta 1205: 275-281

Dhur A., Galan P., Hercberg S. (1991)

Folate status and the immune system.

Progress in Food and Nutrition Science 15 (1-2): 43-60

Dial E.J., Hall L.R., Serna H., Romero J.J., Fox J.G., Lichtenberger L.M. (1998)

Antibiotic properties of bovine lactoferrin on *Helicobacter pylori*.

Dig Dis Sci 43: 2750-2756

Dial E.J., Lichtenberger L.M. (2002)

Effect of lactoferrin on *Helicobacter felis* induced gastritis.

Biochem Cell Biol 80: 113-117

Drevon C.A. (1991)

Absorption, transport and metabolism of vitamin E.

Free Radical Research Communications 14 (4): 229-246

Duggan C., Penny M.E., Hibberd P., Gil A., Huapaya A., Cooper A., Coletta F., Emenhiser C., Kleinman R.E. (2003)

Oligofructose-supplemented infant cereal: 2 randomized, blinded, community-based trials in Peruvian infants.

Am J Clin Nutr 77 (4): 937-942

Erickson K.L., Hubbard N.E. (2000)

Probiotic Immunomodulation in Health and Disease.

Symposium Probiotic Bacteria: Implications for Human Health

American Society for Nutritional Sciences

Filho-Lima J.V., Vieira E.C., Vicoli J.R. (2000)

Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* combinations against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* subsp. *Typhimurium* in gnotobiotic mice.

J Appl Microbiol 88: 365-370

Fuller R. (1989)

Probiotics in man and animals.

J Appl Bacteriol 66: 365-378

Furmanski P., Li Z.P., Fortuna M.B., Swamy C.V., Das M.R. (1989)

Multiple molecular forms of human lactoferrin. Identification of a class of lactoferrins that possess ribonuclease activity and lack iron-binding capacity.

J Exp Med 170: 415-429

Gedek B.R. (1993)

Probiotika zur Regulierung der Darmflora.

Tierärztl Umsch 48: 97-104

Gibson G.R., Roberfroid M. (1995)

Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics.

J Nutr 125: 1401-1412

Giochetti P., Rizello F., Venturi A., Brigidi P., Matteuzzi D., Bazzocchi G., Poggioli G., Miglioli M., Camperi M. (2000)

Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial.

Gastroenterology 119: 305-309

Goldin B.R. (1990)

Intestinal microflora: metabolism of drugs and carcinogens.

Ann Med 22: 43-48

Gorissen S. (2004)

Der Einsatz von Lactoferrin und Epigallocatechingallat in der Prophylaxe parodontaler Erkrankungen der Katze.

Diss med vet, LMU München

Groves M. L. (1960)

The isolation of a red protein from milk.

J Am Chem Soc 8: 3345-3350

Grieshop C.M., Flickinger E.A., Bruce K.J., Patil A.R., Czarnecki-Maulden G.L., Fahey G.C. Jr. (2004)

Gastrointestinal and immunological responses of senior dogs to chicory and mannan-oligosaccharides.

Arch Anim Nutr 58 (6): 483-493

Gu J.Y., Wakizono Y., Sunada Y., Hung P., Nonaka M., Sugano M., Yamada K. (1999)

Dietary effect of tocopherols and tocotrienols on the immune function of spleen and mesenteric lymph node lymphocytes in Brown Norway rats.

Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 63 (10): 1697-1702

Gupta P., Andrew H., Kirschner B.S., Guandalini S. (2000)

Is lactobacillus GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study.

Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 31: 453-457.

Hamm M. (2000)

Biostoffe für den Darm: Pre- und Probiotika.

Mosaik-Verlag, München

Hancock, R.E., Diamond G., (2000)

The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences.

Tds Microbiol 8: 402-410

Handl S. (2006)

Effekte einer Zufütterung von Laktoferrin auf die Lymphozyten- und Plasmazellproliferation im Darm.

Diss med vet, Uni Wien

Hangoc G., Falkenburg J.H., Broxmeyer H.E. (1991)

Influence of T-Lymphocytes and lactoferrin on the survival-promoting effects of IL-1 and IL-6 on human bone marrow granulocyte-macrophage and erythroid progenitor cells.

Hematol 19: 697-703

Harmsen H.J.M., Wildeboer-Veloo A.C.M., Raangs G.C., Wagendorp A.A., Klijn N., Bindels J.G., Welling G.W. (2000)

Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods.

J Pediatr Gastroenterol Nutr 30: 61-67

Hemilä H. (1992)

Vitamin C and the common cold.

The British Journal of Nutrition 67 (1): 3-16

Hopkins M.J. (2003)

Nondigestible oligosaccharides enhance bacterial colonization resistance against *Clostridium difficile* in vitro.

Appl Environ Microbiol 69 (4)

Hoskins J. D. (1990)

The hematopoietic system.

In: Veterinary pediatrics

W.B. Saunders Company: 293-325

How K.L., Hazewinkel H.A.W., Mol J.A. (1994)

Dietary vitamin D dependence of cat and dog due to inadequate cutaneous synthesis of vitamin D.

General and Comparative Endocrinology 96: 12-18

Humphries A.L.Jr., Harms W.S., Moretz W.H. (1961)

Skin homografts in dogs deficient in pyridoxine.

The Journal of the American Medical Association 178: 490-492

Hutchens T.W. et al. (1994)

Lactoferrin: Structure and Function.

Plenum Press, New York

Iigo M., Kuhara T., Ushida Y., Sekine K., Moore M. A., Tsuda H. (1999)

Inhibitory effects of bovine lactoferrin on colon carcinoma 26 lung metastasis in mice.

Clin Exp Metastasis 17: 35-40

Inoue H., Sakai M., Kaida Y., Kaibara K. (2004)

Blood lactoferrin release induced by running exercise in normal volunteers: antibacterial activity.

Clin Chim Acta 341: 165-172

Isolauri E., Joensuu J., Suomalainen H., Luomala M., Vesikari T. (1995)

Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by Lactobacillus casei GG.

Vaccine 13: 310-312

Isolauri E., Arvola T., Sutas Y., Moilanen E., Salminen S. (2000)

Probiotics in the management of atopic eczema.

Clin Exp Allergy 30: 1604-1610

Johansson B. (1960)

Isolation of an iron-containing red protein from human milk.

Act Chem Scan 14:510-512

Joslin R.S., Erickson P.S., Santoro H.M., Whitehouse N.L., Schwab C.G., Rejman J.J., (2002)

Lactoferrin supplementation of dairy calves.

J Dairy Sci 85 (5): 1237-1242

Jung L. (1999)

Lactobacillus GG augments the immune response to typhoid vaccination: a double-blinded, placebo-controlled study.

FASEB Journal 13: A872

Kalliomaki M., Salminen S., Arvilommi H., Kero P., Koskinen P., Isolauri E. (2001)

Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial.

Lancet 357: 1076-1079

Kawaguchi S., Hayashi T., Masano H., Okuyama K., Suzuki T., Kawase K., (1989)

Effect of Lactoferrin-enriched infant formula on low birth weight infants.

Shuusankiigaku 19: 125-130

Kawakami H., Dosako S., Lönnnerdal B. (1991)

Iron uptake from transferrin and lactoferrin by rat intestinal brush-border membrane vesicles.

Am J Physiol 258: 535-541

Kim Y.I., Hayek M., Mason J.B., Meydani S.N. (2002)

Severe folate deficiency impairs natural killer cell-mediated cytotoxicity in rats.

The Journal of Nutrition 132 (6): 1361-1367

Kim H.W., Chew B.P., Wong T.S., Park J.S., Weng B.B., Byrne K.M., Hayek M.G., Reinhart G.A. (2000a)

Modulation of humoral and cell-mediated immune responses by dietary lutein in cats.

Veterinary Immunology and Immunopathology 73 (3-4): 331-341

Kim H.W., Chew B.P., Wong T.S., Park J.S., Weng B.B., Byrne K.M., Hayek M.G., Reinhart G.A. (2000b)

Dietary lutein stimulates immune response in the canine.

Veterinary Immunology and Immunopathology 74 (3-4): 315-327

Kimber I., Cumberbatch M., Dearman R.J., Headon D.R., Bhushan M., Griffiths C.E.M. (2002)

Lactoferrin: influences on Langerhans cells, epidermal cytokines, and cutaneous inflammation.

Biochem Cell Biol 80: 103-107

Krammer S. (2001)

Lactoferrin – a new support in Pet Nutrition.

VFA Project Meeting: Bioactive Proteins, 25. Juli 2001

Konjufca V.K., Bottje W.G., Bersi T.K., Erf G.F. (2004)

Influence of dietary vitamin E on phagocytic functions of macrophages in broilers.

Poult Sci 83(9):1530-1534

Kuhara T., Iigo M., Ito T., Ushida Y., Sekine K., Terada N., Okamura H., Tsuda H. (2001)

Orally administered lactoferrin exerts an antimetastatic effect and enhances production of IL-18 in the intestinal epithelium.

Nutr Cancer 38: 192-199

Kume S., Tanabe S. (1994)

Effect of twinning and supplemental iron-saturated lactoferrin on iron status of newborn calves.

J Dairy Sci 77 (10): 3118-3123

Lahrssen M., Zentek J. (2002)

Wirksamkeit von probiotischen Mikroorganismen als Futterzusatzstoff: Leitlinien zur Prüfung der Wirksamkeit von Mikroorganismen bei den Tierkategorien Hund, Katze und Pferd.

Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 109: 22-25

Lange E. (1997)

Bakterien für die Gesundheit. Probiotics.

Südwest Verlag, München

Laur P. (2003)

Wirkung von Lactoferrin auf den Organismus neonataler Hundewelpen.

Diss med vet, LMU München

Lawson D.E., Sedrani S.H., Douglas J. (1986)

Interrelationships in rats of tissue pools of cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol formed in u.v. light.

The Biochemical Journal 233 (2): 535-540

Lederer W.H., Kumar M., Axelrod A.E. (1975)

Effects of pantothenic acid deficiency on cellular antibody synthesis in rats. *The Journal of Nutrition* 105 (1): 17-25

Loesenbeck G. (2004)

Diagnostik bei Katzen- und Hundewelpenverlusten.

Laboklin aktuell, Laboklin GmbH&Co.KG, Bad Kissingen

Madsen K. et al. (2001)

Probiotic Bacteria Enhance Murine and Human Intestinal Epithelial Barrier Function.

Gastroenterology 121: 580-591

Manolagas S.C., Provvedini D.M., Tsoukas C.D. (1985)

Interactions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and the immune system.

Molecular and Cellular Endocrinology 43 (2-3): 113-122

Marcos A., Nova E., Montero A. (2003)

Changes in the immune system are conditioned by nutrition.

European Journal of Clinical Nutrition 57, Suppl. 1: S66-S69

Markwell P.J., Bauer J.E., Rawlings J.M, Senior D.F. (1998)

The impact of dietary fat and polyunsaturated fatty acids on renal disease: a short review of data from clinical and experimental studies.

J Anim Physiol Anim Nutr 80: 234-238

Marti del Moral, A., Morengo-Alianga M.J., Martinez Hernandez J.A. (2003)

The effect of prebiotics of lipid metabolism.

Nutr Hosp 18 (4): 181-188

Marteau P., Seksik P., Jian R. (2002)

Probiotics and health : new facts and ideas.

Curr Opin Biotechnol 13 (5): 486-489

Marteau P.R., Vrese M.D., Cellier C.J., Schrezenmeir J. (2001)

Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics.

Am J Clin Nutr 73: 430S-436S

Masson P.L., Heremans J.F., Schonke E. (1969)

Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes.

J Exp Med 130: 643-658

Masson P.L., Heremans J. (1971)

Lactoferrin in milk from different species.

Comp Biochem Physiol B 39: 119-129

McCarthy, Rakowski (1996)

Institut of BioNutritional Research, Norwalk, Connecticut

McAbee D.D., Esbensen K. (1993)

Binding and endocytosis of apo- and holo-lactoferrin by isolated rat hepatocytes.

J Biol Chem 266: 23624-23631

Metchnikoff E. (1908)

The prolongation of life.

New York, Putnam and Sons

Molitor D. (1996)

In vitro- und in vivo-Effekte eines Probiotikums (*Enterococcus faecium*) als Futterzusatz bei Hunden.

Diss med vet TiHo Hannover

Moriguchi S., Itoh T. (1997)

Vitamin E enhances T cell differentiation through increased epithelial cell function in rat thymus.

Nutrition Research 17: 873-883

Moriguchi S., Muraga M. (2000)

Vitamin E and immunity.

Vitamins and Hormones 59: 305-336

Nagasako Y., Saito H., Tamura Y., Shimamura S., Tomita M.

Iron-binding properties of bovine lactoferrin in iron-rich solution.

J Dairy Sci 76: 1876-1881

Naidu A.S. (2000)

Lactoferrin: Natural, Multifunctional, Antimicrobial.

CRC Press, Boca Raton, Florida, USA

Naidu A.S., Arnold R.R. (1994)

Lactoferrin interaction with salmonellae potentiates antibiotic susceptibility in vitro.

Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 20: 69-75.

Nakano K., Suzuki S. (1984)

Stress-induced change in tissue levels of ascorbic acid and histamine in rats.

The Journal of Nutrition 114 (9): 1602-1608

Neumüller O.A. (1987)

Römpps, Chemie Lexikon.

Franckh'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, Bd. 4: 2624, Bd. 5: 3938-3939, 4534-4547

Norris G.E., Anderson B.F., Baker E.N., Baker H.M., Gartner A.L., Ward J., Rumbull S.V. (1986)

Preliminary crystallographic studies on bovine Lactoferrin.

J Mol Biol 191: 143-145

Okano T., Mizuno K., Kobayashi T. (1978)

Identification and determination of 25-hydroxyvitamin D₃ in the blood and liver of vitamin D-deficient rats irradiated with ultraviolet light.

J Nutr Sci Vitaminology 24 (5): 511-518

Ouwehand A.C.; Salminen S. (1998)

The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria.

International Dairy Journal 8: 749-758

Ouwehand A.C.; Kirjavainen P.V.; Shortt C.; Salminen S. (1999)

Probiotics: mechanisms and established effects.

International Dairy Journal 9: 43-52

Padh H. (1991)

Vitamin C: newer insights into its biochemical functions.

Nutrition Reviews 49 (3): 65-70

Park J.S., Chew B.P., Wong T.S., Weng B.C., Kim H.W., Hayek M.G., Reinhart G.A. (1999)

Dietary lutein uptake by blood and leukocytes in domestic cats.

The FASEB Journal 13: A.552 (441.4)

Parker R.B. (1974)

Probiotics: the other half of the antibiotic story.

Animal Nutrition and Health 29: 4-8

Patterson J.A., Burkholder K.M. (2003)

Application of prebiotics and probiotics in poultry production.

Poultry Science 82 (4): 627-631

Plat J., Mensink R.P. (2005)

Food components and immune function.

Curr Opin Lipidol 16(1):31-37

Politis I., Bizelis I., Tsiaras A., Baldi A. (2004)

Effect of vitamin E supplementation on neutrophil function, milk composition and plasmin activity in dairy cows in a commercial herd.

J Dairy Res 71(3):273-278

Qiu J., Hendrixson D.R., Baker E.N., Murphy T.F., St. Geme J.W., Plaut A.G. (1998)

Human milk lactoferrin inactivates two putative colonization factors expressed by *Haemophilus influenzae*.

Proc Natl Acad Sci 95: 12641-1264

Rachmilewitz D., Karmeli F., Takabayashi K., Hayashi T., Leider-Trejo L., Lee J., Leoni L.M., Raz E. (2002)

Immunostimulatory DNA ameliorates experimental and spontaneous murine colitis.
Gastroenterology 122: 1428-1441

Rahman MJ, Sarker P, Roy SK, Ahmad SM, Chisti J, Azim T, Mathan M, Sack D, Andersson J, Raqib R. (2005)

Effects of zinc supplementation as adjunct therapy on the systemic immune responses in shigellosis.
Am J Clin Nutr. 81(2):495-502

Rall L.C., Meydani S.N. (1993)

Vitamin B6 and immune competence.
Nutrition Reviews 51: 217-225

Rambeck W.A. (2001)

Einführung zum Thema funktionelle Futtermittel.
Forum functional food, Frankfurt, 7.5.2001

Rayman M.P. (2004)

The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up?
Br J Nutr 92(4):557-573

Reddy M.B., Cook J.D. (1991)

Assesment of dietary determinants of nonheme-iron absorption in human and rats.
The American Journal of Clinical Nutrition 54: 723-728

Richie E.R., Hilliard J.K., Gilmore R., Gillespie D.J. (1987)

Human milk-derived lactoferrin inhibits mitogen and alloantigen induced human lymphocyte proliferation.

J Reprod Immunol 12: 137-148

Roberfroid M.B. (1998)

Probiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties.

Br J Nutr 80: 197-202

Robson L.C., Schwarz M.R. (1980)

The effects of vitamin B6 deficiency on the lymphoid system and immune response. in: Tryfiates, G.P.: Vitamin B6. Metabolism and role in growth.

Food & Nutrition Press Inc. 205-222

Römpps (1987)

Neumüller O.-A. (Hrsg.)

Chemie Lexikon.

Franck'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart

Rogerson G.A. (1979)

Vitamin A requirement of young cats on a low fat purified diet.

Nutrition Reports International 19 (1): 57-67

Roller M., Rechkemmer G., Watzl B. (2004)

Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics Lactobacillus rhamnosus and Bifidobacterium lactis modulates intestinal immune function in rats.

J Nutr 134 (1): 153-156

Sakai S., Moriguchi S. (1997)

Long-term feeding of high vitamin E diet improves the decreased mitogen response of rat splenic lymphocytes with aging.

Journal of Nutritional Sciences and Vitaminology 43 (1): 113-122

Sawatzki G., Rich I.N. (1989)

Lactoferrin stimulates colony stimulating factor production in vitro and in vivo.

Blood Cells 15: 371-385

Sazawal S., Dhingra U., Sarkar A., Dhingra P., Deb S., Marwah D., Menon V.P., Kumar J., Black R.E. (2004)

Efficacy of milk fortified with a probiotic *Bifidobacterium lactis* (DR-10TM) and prebiotic galacto-oligosacchrides in prevention of morbidity and on nutritional status.

Asia Pac J Clin Nutr 13 (Suppl): S28

Schley P.D., Field C.J. (2002)

The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics.

Br J Nutr 87 Suppl 2: S221-S230

Schroedl W., Jaekel L., Krueger M. (2003)

C-Reactive Protein and Antibacterial Activity in Blood Plasma of Colostrum-Fed Calves and the Effect of Lactulose.

J Dairy Sci 86: 3313-3320

Schwarzer J. (2004)

Einfluss probiotischer Substanzen auf den antioxidativen Status von neugeborenen Hundewelpen.

Diss med vet, LMU München

Schweigert F.J., Thomann E., Zucker H. (1991)

Vitamin A in the urine of carnivores.

International Journal for Vitamin and Nutrition Research 61 (2): 110-113

Senger Valerie (2003)

Wissenschaftliche Bewertung des Einsatzes von Vitaminen und ausgewählten Antioxidanzien in der Ernährung von Hunden, Katzen und Pferden: Anspruch und Wirklichkeit

Diss med vet, LMU München

Siddiqui F.Q., Ahmad M.M., Kakar F., Akhtar S., Dil A.S. (2001)

The role of vitamin A in enhancing humoral immunity produced by antirabies vaccine.

East Mediterr Health J 7(4-5):799-804

Sies H., Stahl W., Sundquist A.R.(1992)

Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene and other carotenoids.

Annals of the New York Academy of Sciences 669: 7-20

Silva A.M., Bambirra E.A., Oliveira A.L., Souza P.P., Gomess D.A., Vieira E.C., Vicoli J.R. (1999)

Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella enteritidis* subsp. *Typhimurium* in conventional and gnotobiotic mice.

J Appl Microbiol 86: 331-336

Sorrentino S., D'Alessandro A.M., Maras B., Di Ciccio L., D'Andrea G., De Prisco R., Bossa F., Libonati M., Oratore A. (1999)

Purification of a 76-kDa iron-binding protein from human seminal plasma by affinity chromatography specific for ribonuclease: structural and functional identity with milk lactoferrin.

Biochim Biophys Acta 1430: 103-110

Steijns J.M., van Hooijdonk A.C.M., (2000)

Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin.

Br J Nutr 84, Suppl.: S11-S17

Sütas Y., Hurme M., Isolauri E. (1996)

Downregulation of antiCD3 antibody-induced IL-4 production by bovine caseins hydrolysed with Lactobacillus GG-derived enzymes.

Scand J Immunol 43: 687-689

Sumi Y., Miyakawa M., Kanzaki M., Kotake Y. (1977)

Vitamin B-6 deficiency in germfree rats.

The Journal of Nutrition 107 (9): 1707-1714

Tanaka K., Ikeda M., Nozaki A., Kato N., Tsuda H., Saito S., Sekihara H. (1999)

Lactoferrin inhibits hepatitis C virus viremia in patients with chronic hepatitis C: a pilot study.

Jpn J Cancer Res 90: 367-371

Tannock G.W. (Hrsg.) (1999)

Probiotics: a critical review.

Horizon Scientific Press, Norfolk, England

Tomita M., Wakabayashi H., Yamauchi K., Teraguchi S., Hayasawa H. (2002)

Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: Production and applications.

Biochem Cell Biol 80: 109-112

Topping D.L., Fukushima M., Bird A.R. (2003)

Resistant starch as a prebiotic and synbiotic: state of the art.

Proc Nutr. Soc 62 (1): 171-176

Tsuge H., Hotta N., Hayakawa T. (2000)

Effects of vitamin B-6 on (n-3) polyunsaturated fatty acid metabolism. The Journal of Nutrition 130 (2 Suppl): 333S-334S

Tvedten H.W., Whitehair C.K. (1977)

Torulopsis glabrata and vitamin A deficiency in dogs.

American Journal of Veterinary Research 38 (12): 1941-1948

Unsöld E. (2003)

Modell der mutterlosen Aufzucht von Hundewelpen zur Wirksamkeitsprüfung probiotischer Substanzen.

Diss med vet, LMU München

Walser, K. (Hrsg.) (1990)

Buschmann H., Hoffmann B., Kamphues J., Meyer H., Wagner W.C., Walser K.

Anatomische und physiologische Grundlagen des Neugeborenen.

In: Neugeborenen- und Säuglingskunde der Tiere.

Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 1-37

Wang W.P., Iigo M., Sato J., Kazuhiro K., Adachi I., Tsuda H. (2000)

Activation of intestinal mucosal immunity in tumorbearing mice by lactoferrin.

Jpn J Cancer Res 91: 1022-1027

Wang Y.W., Sunwoo H., Cherian G., Sim J.S.

Maternal dietary ratio of linoleic acid to alpha-linolenic acid affects the passive immunity of hatching chicks.

Poult Sci 83(12):2039-2043

Ward P.P., Uribe-Luna S., Conneely O.M. (2002)

Lactoferrin and host defense.

Biochem Cell Biol 80: 95-102

Watkins B.A., Turek J.J., Lepine A.J., Seifert M.F., Reinhart G.A. (2000)

Influence of polyunsaturates on bone modeling and health.

Proceedings of the 2000 IAMS Nutrition Symposium

Orange Frazer Press, Ohio: 467-480

Wehr U., Kern S., Rambeck W.A. (2004)

Influence of phytoestrogens, polyunsaturated fatty acids, vitamin D and K on bone metabolism: investigations on intact and ovariectomized beagle dogs.

Proc Soc Nutr Physiol 13

Weinberg E.D. (2001)

Human lactoferrin: a novel therapeutic with broad spectrum potential.

J Pharm Pharmacol 53: 1303-1310

World Health Organisation (WHO), Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO)

Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria

Weinberg E.D. (2001)

Human lactoferrin: a novel therapeutic with broad spectrum potential.

J Pharm Pharmacol 53: 1303-1310

Wienk K.J., Marx J.J., Santos M., Lemmens A.G., Brink E.J., Van der Meer R., Beynen A.C. (1997)

Dietary ascorbic acid raises iron absorption in anaemic rats through enhancing mucosal iron uptake independent of iron solubility in the digesta.

The British Journal of Nutrition 77 (1): 123-131

Wiesner E., Ribbeck R. (Hrsg.) (1991)

Wörterbuch der Veterinärmedizin

Gustav Fischer Verlag Jena – Stuttgart

Williams J.H. (1988)

The use of gamma linolenic acid, linoleic acid and natural vitamin E for the treatment of multicentric lymphoma in two dogs.

J S Afr Vet Assoc 59 (3): 141-144

Wittwer C.T., Beck S., Peterson M., Davidson R., Wilson D.E., Hansen R.G. (1990)

Mild pantothenate deficiency in rats elevates serum triglyceride and free fatty acid levels.

The Journal of Nutrition 120 (7): 719-725

Worden A.N., Bungan J., Davies A.W., Waterhouse C.E. (1955)

Urinary excretion of vitamin A by the dog.

The Biochemical Journal 59: 527-528

Yamauchi K., Tomita M., Giehl T.J., Ellison R.T. (1993)

Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment.

Infect Immun 61: 719-728

Yamauchi K., Wakabayashi H., Hashimoto S., Teraguchi S., Hayasawa H., Tomita M. (1998)

Effects of orally administered bovine lactoferrin on the immune system of healthy volunteers.

Adv Exp Med Biol 443: 261-265

Yamauchi K., Hiruma M., Yamazaki N., Wakabayashi H., Kuwata H., Teraguchi S., Hayasawa H., Suegara N., Yamauchi H. (2000)

Oral administration of bovine Lactoferrin for treatment of tinea pedis. A placebo-controlled double-blind study.

Mycoses 43: 197-202

Ye X.Y., Wang H.X., Liu F., Ng T.B. (2000)

Ribonuclease, cell-free translation-inhibitory and superoxide radical scavenging activities of the iron-binding protein lactoferrin from bovine milk.

Int Biochem Cell Biol 32: 235-241

Yeum K.-J., Wang X.-D., Liu C., Smith D., Russell R.M. (1999)

Lutein absorption is minimal in ferrets and in rats.

The FASEB Journal 13: A.552 (441.5)

Young R.J., Huffman S. (2003)

Probiotic Use in Children.

Journal of Pediatric Health Care Vol. 17 Number 6: 277-283

Yu R.-H., Schryvers A.B., 2002

Bacterial lactoferrin receptors: insight from characterizing the *Moraxella bovis* receptors.

Biochem Cell Biol 80: 81-90

Zentek J., Molitor D., Kamphues J. (1998)

Prüfung intestinaler Effekte eines Probiotikums (*Enterococcus faecium*) bei Hunden.
Kleintierpraxis 43: 149-197

Zhang P., Sawicki V., Lewis A. Hanson L., Nuijens J.H., Neville M.C. (2001)

Human lactoferrin in the milk of transgenic mice increases intestinal growth in ten-day-old suckling neonates.

Adv Exp Med Biol 501: 107-113

Zhao Z., Ross A.C. (1995)

Retinoic acid repletion restores the number of leukocytes and their subsets and stimulates natural cytotoxicity in vitamin A-deficient rats.

The Journal of Nutrition 125 (8): 2064-2073

Zimecki M., Mazurier J., Machnicki M., Wieczorek Z., Monteuil J., Spik G. (1991)

Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4-CD8⁻ murine thymocytes.

Immunol Lett 30: 119-123

Zimecki M., Mazurier J., Spik G., Kapp J.A. (1995)

Human lactoferrin induces phenotypic and functional changes in murine splenic B cells.

Immunology 86: 122-127

Zimecki M., Wlaszczyk A., Cheneau P., Brunel A.S., Mazurier J., Spik G., Kubler A. (1998)

Immunoregulatory effects of a nutritional preparation containing bovine lactoferrin taken orally by healthy individuals.

Arch Immunol Ther Exp 46: 231-240

9 DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. W. A. Rambeck danke ich für die Überlassung des Themas und für seine tolle, motivationsspendende Betreuung.

Mein nächstes großes Dankeschön gilt meinem Betreuer, Herrn Dr. Ulrich Wehr, der mir jederzeit mit viel Geduld bei allen Fragen mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Erhard des Instituts für Tierschutz, Verhaltenskunde und Tierhygiene für die Hilfe bei der Auswertung der ELISA-Ergebnisse und die Möglichkeit, das ELISA-Labor benutzen zu dürfen, bedanken.

Meiner Mitdotorandin Sophie Strodtbeck danke ich für die gute Zusammenarbeit und ihre Freundschaft.

Außerdem möchte ich mich bei Josef, Carmen und Klaus für ihre Mithilfe bei der Welpenaufzucht bedanken.

Großer Dank gebührt Christian Strobl für die vielen Überstunden, die er für die mikrobiologischen Untersuchungen leisten musste und Herrn Hermann Kuchler, ohne den wir bei der Durchführung der ELISAs verloren gewesen wären.

Ausserdem danke ich Frau Nicole Bucher und Frau Katrin Schuster für ihre Hilfe bei allen weiteren Fragen zum Thema ELISA.

Ein weiteres Dankeschön an Frau Dr. Britta Dobenecker für ihre Hilfe bei Problemen während der Welpenaufzucht und ihren Einsatz bei der Welpenvermittlung.

Danke an Frau Stadler für ihr offenes Ohr bei allen Problemen während der Welpenaufzucht- und Laborphase und für ihre Hilfe bei allen Fragen zur Laborarbeit.

Ein großer Dank auch an die Tierpfleger in der Außenstelle Oberwiesenfeld, Walter Bunge, Uli Gindhart, Gabi Reder, Nadja Al-Tokmaschi und Adrian Frille, die uns bei der Unterbringung und anderen Belangen während der Welpenaufzucht stets geholfen haben.

Herrn Werner Hesselbach, Frau Antje Wetzel und Frau Jelena Lazic möchte ich für ihre Unterstützung bei Fragen zur Laborarbeit. danken

Frau Prof. Dr. Katrin Hartmann danke ich für die Möglichkeit, die Laboreinrichtungen der I. MTK benutzen zu dürfen.

Ein riesiges Dankeschön an meine Chefin, Frau Dr. Birgit Kraus, für ihre Bereitschaft meine Arbeitszeitgestaltung flexibel zu handhaben, um mir ein reibungsloses Arbeiten an der Promotion zu ermöglichen.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern für den Rückhalt und die finanzielle Unterstützung, die sie mir in jeder Phase meiner langwierigen Arbeit gegeben haben.

Meinen herzlichen Dank auch an Thies für die Hilfe bei allen Dingen, die mit dem Computer zu tun hatten, und Robert, dass er mir in der heißen Phase seinen Computer zur Verfügung gestellt hat und mich immer wieder motiviert und mir meine gute Laune zurückgegeben hat.

10 LEBENS LAUF

Name: Silke Regulski
Geburtsdatum / -ort: 25.03.1973 in München

SCHULBILDUNG

07.1992 Abitur am Gymnasium Ottobrunn

WEITERE AUSBILDUNG

10. 1992 – 03. 1994 Studium der Germanistik/ Komparatistik/ Völkerkunde
an der LMU München

09. 1993 – 09. 1994 Ausbildung zur VMTA am Landesuntersuchungsamt
Südbayern in München-Oberschleißheim

10. 1994 – 09. 2000 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität München

09. 2000 3. Staatsexamen

10. 2000 Approbation als Tierärztin

seit 11. 2002 Beginn der Arbeiten an der vorliegenden Dissertation

PRAKTISCHE TIERÄRZTLICHE TÄTIGKEIT

04. 2001 bis 03. 2002 Beschäftigung als Assistentin in der Kleintierpraxis
Dr. B. Moser/ Dr. H. Holzknecht in Meran/Italien

seit 04. 2002 Tätigkeit als Assistentin in der Kleintierpraxis
Dr. B. Kraus in Neubiberg bei München