(19) Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 22 024 T3** 2012.10.11

(12) Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 179 984 B2**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 22 024.9**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/14690**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 94 1153.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/072698**
(86) PCT-Anmeldetag: **26.05.2000**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **07.12.2000**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **20.02.2002**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **17.08.2005**
(97) Veröffentlichungstag des geänderten Patents beim EPA: **05.10.2011**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.10.2012**

(51) Int Cl.: ***A23K 1/16*** (2006.01)
A23K 1/18 (2006.01)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:
136176 P **27.05.1999** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
The Iams Company, Dayton, Ohio, US

(72) Erfinder:
HAYEK, Michael, G., Dayton, US

(74) Vertreter:
OFFICE ERNEST T. FREYLINGER S.A., Strassen, LU

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON PRODUKT ZUR ERHÖHUNG DER IMMUNANTWORT IN HAUSTIEREN MIT VERWENDUNG EINER KOMBINATION VON ANTIOXIDANTIEN**

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

ALLGEMEINER STAND DER TECHNIK

[0001] Diese Erfindung betrifft eine Zusammensetzung zum Verbessern der Immunabwehr von Hunden.

[0002] In den zurückliegenden Jahren hat das Interesse am gesundheitlichen Nutzen von Antioxidationsmitteln ständig zugenommen. Antioxidationsmittel sind Nährstoffe, die der Wirkung reaktiver Sauerstoffverbindungen (auch als freie Radikale bezeichnet) entgegenwirken. Diese schädlichen Moleküle sind normale Nebenprodukte des Stoffwechsels. Antioxidative Nährstoffe wirken freien Radikalen entgegen, indem sie sich an diese Moleküle anlagern, sie neutralisieren und aus dem Körper entfernen. Die unzureichende Beseitigung freier Radikale wird damit in Verbindung gebracht, Schäden im menschlichen Körper hervorzurufen, von denen man annimmt, dass sie zu bestimmten Krankheiten wie der Alzheimer-Krankheit, Autoimmunerkrankungen, Krebs, Herzgefäßerkrankungen, grauem Star, Diabetes, Rückbildung der Makula, multipler Sklerose, muskulärer Dystrophie, Entzündung der Bauchspeicheldrüse, Parkinson-Krankheit und rheumatischer Arthritis führen. Die von der Ansammlung dieser freien Radikale verursachten Schäden sind möglicherweise für den Alterungsprozess verantwortlich, da die Ansammlung dieser freien Radikale im Laufe der Zeit eine im Alter auftretende Unterdrückung der Immunreaktion verursacht, wodurch unter der älteren Bevölkerung vermehrt Krankheiten auftreten.

[0003] „Antioxidative Nährstoffe" ist eine Bezeichnung für eine Reihe von Verbindungen, die in ähnlicher Weise für die Neutralisierung schädlicher freier Radikale sorgen. Dazu gehören solche allgemein bekannten Vitamine wie Vitamin A, Vitamin C und Vitamin E. Dazu gehören auch andere Verbindungen, die als Carotinoide bezeichnet werden. Zu Beispielen für Carotinoide gehören β-Carotin, Lutein, Astaxanthin, Canthaxanthin und Lycopin. Diese Verbindungen sind für die Ausbildung der grünen, gelben, orange- und pinkfarbenen Pigmentierung in Obst, Blumen und Gemüse verantwortlich. Von diesen Carotinoiden weiß man, dass sie eine wichtige Rolle bei der Anpassung des Immunsystems spielen (zum Beispiel hat sich gezeigt, dass Canthaxanthin eine bei Mäusen auf chemischem Wege ausgelöste Krebszellenbildung verhindert und bei Ratten die Proliferation von Lymphozyten erhöht). Bei Astaxanthin und β-Carotin hat sich gezeigt, dass sie außerhalb des lebenden Organismus die Antikörperreaktion von Maus-Splenozyten auf T-abhängige Antigene steigern. Lutein in der Nahrung stärkt die Proliferation von Lymphozyten in Maus-Splenozyten.

[0004] Obwohl es sich bei allen diesen Verbindungen um Antioxidationsmittel handelt, ist deutlich geworden, dass sie nicht alle in gleicher Weise funktionieren. Zum Beispiel zeigen historische Studien am Menschen, dass bei Populationen, die eine Nahrung mit einem hohen Gehalt an Antioxidationsmitteln zu sich nehmen (d. h. hohe Aufnahme an Früchten und Gemüse) Krebs seltener auftritt als bei anderen Gruppen. Klinische Studien mit einer Ergänzung durch Antioxidationsmittel wie Vitamin E oder β-Carotin allein zeigen jedoch nicht dieselbe Größenordnung des Schutzes. Gegenwärtig wird angenommen, dass der Nutzen antioxidativer Nährstoffe für die menschliche Gesundheit möglicherweise durch eine Kombination mehrerer unterschiedlicher und in geringen Mengen vorhandener Antioxidationsmittel entsteht und nicht durch ein Antioxidationsmittel, das in großer Menge vorhanden ist.

[0005] Obwohl der Hund sich nicht durch eine Nahrung mit einem hohen Gehalt an Obst und Gemüse entwickelt hat, so hat er doch kleine Pflanzenfresser gejagt und gefressen, die ihrerseits Pflanzen mit hohen Konzentrationen dieser Verbindungen fraßen. Es ist daher möglich, dass sich der Bedarf des Hundes an Antioxidationsmitteln auf natürliche Weise entwickelt hat. Dementsprechend gibt es in dem Fachgebiet einen Bedarf, in der Nahrung von Hunden nützliche Antioxidationsmittel bereitzustellen, um einen gesundheitlichen Nutzen zu erzielen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0006] Die in der Erfindung verwendete Zusammensetzung enthält eine Kombination aus Vitamin E. Lutein und β-Carotin. Dieses Antioxidationsmittel-Paket versorgt das Tier mit etwa 175 bis etwa 400 IE an Vitamin E pro Kilogramm der Nahrung, mit etwa 1 bis etwa 50 mg Lutein/Tag und mit etwa 1 bis etwa 50 mg β-Carotin/Tag. Eine derartige Nahrung hat sich als geeignet gezeigt, die Immunzellen von Hunden zu optimieren und die Erkennung von Impfstoffen bei Hunden zu verbessern.

[0007] Die Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung gehen aus der nachfolgenden ausführlichen Beschreibung, den beigefügten Zeichnungen und den beiliegenden Ansprüchen hervor.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0008] Fig. 1 ist ein Diagramm der Antikörper-Konzentration bei Hunden (mg/dl) im Verhältnis zur Aufnahme von Beta-Carotin in mg/kg; und

[0009] Fig. 2 ist eine grafische Darstellung der Wirkung von Lutein in der Nahrung auf die Erkennung von Impfstoffen bei Hunden.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0010] Die Kombination von Antioxidationsmitteln kann dem Hund entweder als Ergänzung oder als Bestandteil der Nahrung verabreicht werden, mit der der Hund gefüttert wird. Eine derartige Ergänzung kann in Form einer Tablette oder Kapsel, eines Snacks oder Biskuits oder in jeder anderen essbaren Form vorliegen. Mit „Nahrung" ist die feste oder flüssige Kost gemeint, die dem Tier regelmäßig verabreicht wird. Es wird angenommen, dass durch den Einsatz einer Kombination von Antioxidationsmitteln für viele Bereiche des Immunsystems ein gesundheitlicher Nutzen erzielt wird, z. B. eine optimierte Aktivierung von Immunzellen, ein erhöhtes Antikörperniveau und eine verbesserte Impfstofferkenung.

[0011] Die Nahrung kann aus einer geeigneten Tierfutterformel bestehen, die auch eine angemessene Ernährung des Hundes gewährleistet. Eine Hundenahrung zum Gebrauch nach Ansprüchen 1 und 5 der vorliegenden Erfindung enthält insgesamt 18–40% Rohprotein, 4–30% Fett und 4–20% Ballaststoff. Jedoch sind keine speziellen Verhältnisse oder Prozentsätze dieser oder andere Nährstoffe im Hinblick auf die Verwendung einer Tiernahrung nach Ansprüchen 3 und 4 erforderlich. Die Kombination der Antioxidationsmittel kann mit derartiger Nahrung vermischt werden, um die benötigten nützlichen Mengen bereitzustellen.

[0012] Zur leichteren Verständnis der Erfindung wird auf die folgenden Beispiele Bezug genommen, die zur Veranschaulichung der Erfindung bestimmt sind, ohne jedoch deren Schutzumfang einzuschränken.

Beispiel 1

Vitamin E

[0013] Zwanzig junge (Durchschnittsalter 2 Jahre) und 20 alte (Durchschnittsalter 9,2 Jahre) Hunde der Rasse Beagle wurden vor Beginn des Experiments zur Stabilisierung des Vitamin-E-Niveaus der Hunde einen Monat lang mit einer handelsüblichen Nahrung auf Huhn/Mais-Basis gefüttert, die so umformuliert würde, dass sie 27 IE Vitamin E/kg Nahrung (NRC-Empfehlung) (Kontrollnahrung) enthielt. Nach den Zufallsprinzip wurde dann den jungen und alten Hunden acht Wochen lang die Nahrung mit 27 IE Vitamin E/kg Nahrung oder mit 280 IE Vitamin E/kg Nahrung zugeteilt. Zur Messung des Vitamin-E-Niveaus im Blutplasma wurde vor und nach den acht Wochen der Nahrungsbehandlung Blut abgenommen, um die mitogene Reaktion der Lymphozyten auf Con A (Concanavalin A) und PHA (Phytohämagglutinin) zu ermitteln. Vor der Nahrungsbehandlung und ähnlich wie andere Spezies wiesen alte Hunde eine deutlich niedrigere mitogene Reaktion auf PHA und Con A als junge Hunde auf. Überraschenderweise wurde eine deutliche Abnahme des Vitamin-E-Niveaus im Blutplasma bei jungen und alten Hunden festgestellt, die mit 27 IE Vitamin E/kg der Nahrung gefüttert wurden, wobei die jungen Hunde eine höhere prozentuale Abnahme zeigten (35% bei alten gegenüber 50% bei jungen Hunden, P = 0,12). Eine Überprüfung des Vitamin-E-Gehalts in handelsüblichem Futter, das den an der Studie teilnehmenden Hunden vor ihrer Ankunft in der Versuchseinrichtung verabreicht wurde, ergab, dass das handelsübliche Futter durchschnittlich 60 IE Vitamin E/kg der Nahrung enthielt. Somit kann die Abnahme des Vitamin-E-Niveaus im Blutplasma dem im Vergleich zum handelsüblichen Hundefutter niedrigeren Vitamin-E-Niveau zugeschrieben werden. Sowohl alte als auch junge Hunde, denen zusätzliches Vitamin E verabreicht wurde, zeigten eine deutliche Zunahme des Vitamin-E-Niveaus im Blutplasma, wobei die jungen Hunde eine höhere prozentuale Zunahme zeigten als alte Hunde (20% Zunahme bei alten gegenüber 50% bei jungen Hunden, P = 0,02). Während des achtwöchigen Fütterungszeitraums wiesen die mit 27 IE Vitamin E/kg der Nahrung gefütterten jungen Hunde eine höhere Abnahme der Con A- und PHA-stimulierten Proliferation auf. Bei den mit 280 IE Vitamin E/kg der Nahrung gefütterten Hunden wurde keine derartige Abnahme beobachtet. Die mit 27 oder 280 IE Vitamin E/kg der Nahrung gefütterten Hunde zeigten keine wesentliche Änderung bei der mitogenstimulierten Proliferation von Lymphozyten.

β-Carotin

[0014] Weibliche Beagles (18 bis 19 Monate alt, 7 bis 9 kg Körpergewicht) wurden mit einer Basisnahrung (The Iams Co., Lewisburg, OH) gefüttert, deren Gehalt an notwendigen Nährstoffen den Anforderungen entsprach oder sie übertraf. Die Tiere waren in licht- (14 Stunden Licht, 10 Stunden dunkel) und temperaturgeregelten Räumen untergebracht. Es wurde ein Test durchgeführt, um das Aufnahmeprofil von β-Carotin nach einer einzelnen, oral verabreichten Dosis β-Carotin zu bestimmen.

[0015] Zur Bestimmung der Aufnahme von oral zugeführtem β-Carotin bei Hunden, denen eine einzelne Dosis β-Carotin oral verabreicht wurde, erhielten die Hunde (n = 6/Behandlung) in peroraler Verabreichung je einmal 0, 50, 100 oder 200 mg β-Carotin (10% kaltwasserlöslich, BASF AG, Ludwigshafen, Deutschland). Die entsprechende Dosis an β-Carotin wurde in 5 ml Wasser aufgelöst und mithilfe einer Fütterungsspritze oral verabreicht. Zur Festlegung geeigneter Probennahmezeiten wurde mit zwei Hunden eine Vorstudie durchgeführt. Diesen Hunden wurden einmal 50 mg β-Carotin verabreicht und Blut nach 0 (unmittelbar vor der Verabreichung des β-Carotins), 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 und 24 Stunden entnommen.

[0016] Das Blutplasma wurde durch Zentrifugieren abgetrennt, und die β-Carotin-Konzentrationen wurden mithilfe der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) wie folgt bestimmt: Alle Abläufe fanden bei abgedunkeltem Licht statt. Mithilfe einer 1:1-Mischung aus Diethylether und Petroleumether wurden unter Anwesenheit von BHT zwei Aliquoten des Plasmas erzeugt, bei denen es sich um Leukozyt-Homogenate handelte und jeder Leukozyt in subzellularer Fraktion vorlag. Die Etherphase wurde entfernt und unter einem Stickstoffffluss getrocknet. Zur HPLC-Bestimmung des β-Carotins wurde der Rückstand in die mobile Phase zurückversetzt. Die Proben (50 µl) wurden auf eine sphärische 5-µm-Umkehrphasensäule C-18 (3,9 × 150 mm; Resolve) injiziert und mit einer Mischung aus Acetonitril, Methanol und Chloroform im Volumenverhältnis 47:47:6 und einer Fließgeschwindigkeit von 1,0 ml/min eluiert.

[0017] Die Ergebnisse aus diesem Beispiel zeigten Maximalkonzentrationen an β-Carotin zwischen 3 und 6 h nach der Verabreichung, und diese waren nach 24 h nicht mehr erkennbar. Anschließend wurde in denselben Zeiträumen Blut von den übrigen Hunden abgenommen. Das Plasma wurde in gleicher Weise abgetrennt und mittels HPLC analysiert.

[0018] In allen untersuchten Zeiträumen waren bei den Hunden ohne Ergänzung β-Carotin-Tonzentrationen im Plasma feststellbar. Jedoch war eine dosisabhängige β-Carotin-Zunahme ($P < 0,01$) im Plasma der Hunde feststellbar, denen eine orale Dosis an β-Carotin verabreicht worden war. Sechs Stunden nach der Dosierung waren bei allen Testgruppen Maximalkonzentrationen festzustellen. Danach gab es bei allen Hunden, die eine β-Carotin-Ergänzung erhalten hatten, eine schnelle eile Abnahme ($P < 0,01$) der β-Carotin-Konzentration. 24 Stunden nach der Dosierung waren keine Konzentrationen mehr feststellbar. Die Halbwertszeit des β-Carotins im Plasma betrug etwa 3 (Dosierung 50 und 100 mg) bis 4 (Dosierung 100 mg) Stunden. Die Maximalkonzentrationen des β-Carotins im Blut traten bei Hunden früher ein als bei Katzen (siehe die folgenden Beispiele 4 und 5). Außerdem ist unter Berücksichtigung der Unterschiede im Körpergewicht die Konzentration von β-Carotin im Plasma von Hunden etwa 10 bis 16 Mal niedriger als die bei Katzen beobachtete Konzentration.

[0019] In einer zweiten Studie wurden den Hunden (n = 6/Behandlung) an 7 aufeinander folgenden Tagen täglich um 8 Uhr 0, 12,5, 25, 50 oder 100 mg β-Carotin verabreicht. Das β-Carotin wurde auf das Hundefutter gegeben und mit der morgendlichen Fütterung verabreicht. Die Blutproben wurde einmal täglich am Tag 0 (unmittelbar vor der ersten Dosis) und dann 6 Stunden nach jeder Dosierung (Tage 1 bis 7) abgenommen. Diese Entnahmezeiten für die Blutproben wurde anhand der Ergebnisse aus Beispiel 1 festgelegt, bei dem sich die Maximalkonzentrationen von β-Carotin 6 Stunden nach der Dosierung gezeigt hatten. Das Plasma wurde isoliert und auf die Konzentration von β-Carotin hin analysiert.

[0020] Die tägliche Dosierung mit β-Carotin während der 7 Tage führte bei den Hunden zu einer dosisabhängigen Zunahme ($P < 0,01$) an zirkulierendem β-Carotin. Bei den mit 100 mg β-Carotin gefütterten Hunden zeigte sich die steilste Zunahme bei der täglichen β-Carotin-Konzentration im Plasma. Die Maximalkonzentration (18 µg/l) β-Carotin im Plasma am Tag 1 bei den mit 100 mg β-Carotin in diesem Beispiel gefütterten Hunden glich der in der ersten Studie beobachteten Konzentration. Die Konzentration von β-Carotin im Plasma nach der letzten Dosis war im Allgemeinen 2,5 bis 4 Mal höher als die nach der ersten Dosis beobachtete Konzertration.

[0021] Eine dritte Studie diente der Ermittlung der Aufnahme von β-Carotin durch die Lymphozyten im Blut von Hunden. Den Hunden (n = 8/Behandlung) wurden 30 Tage lang täglich 0, 50 oder 100 mg β-Carotin verabreicht. Die Blutproben wurden allen Hunden an den Tagen 10, 20 und 30 aus der Halsvene entnommen.

Lymphozyten und Neutrophile aus dem Blut wurden durch Dichtegradientenzentrifugierung abgetrennt. Die Zellen wurden gezählt. Lymphozyten und Neutrophile wurden in PBS resuspendiert, das als Antioxidationsmittel 3% Natriumascorbat enthielt. Eine Aliquote der Zellsuspension wurde 30 Sekunden lang mit Ultraschall behandelt, um die Zellen zu zerstören. Zum Zweck der HPLC-Analyse wurde das β-Carotin aus den Leukozyt-Homogenaten extrahiert.

[0022] Am Tag 30 wurde aus einer größeren Aliquote Blut wie oben beschrieben Leukozyt-Suspensionen hergestellt, um danach eine subzellulare Fraktionierung durchzuführen. Durch eine 20 Sekunden andauernde Ultraschallbehandlung wurden die Zellen in 5 Proben von 0,25 Mol Saccharose zerstört. Natriumascorbat wurde als Antioxidationsmittel zugegeben. Das Homogenat wurde zentrifugiert (600 × g für 10 min bei 4°C) und der Zellkern vom Flüssigkeitsüberstand abgetrennt. Dann wurde der Flüssigkeitsüberstand zentrifugiert (17.300 × g für 20 min bei 4°C), um die Mitochrondrienfraktion abzutrennen. Nach der Abtrennung der Mitochrondrienfraktion wurde der Flüssigkeitsüberstand zentrifugiert (102.000 × g für 60 min bei 4°C), um die mikrosomale von der zytosolischen Fraktion zu trennen. Jede subzellulare Fraktion wurde mittels HPLC auf ihren Gehalt an β-Carotin hin analysiert.

[0023] Am Tag 0 (vor der β-Carotin-Ergänzung) war bei allen Hunden die Konzentration von β-Carotin in peripheren Lymphozyten nicht messbar. Darüber hinaus war während der gesamten Studie das β-Carotin in den Lymphozyten von Hunden ohne Ergänzung nicht messbar. Im Gegensatz dazu nahm die Konzentration von β-Carotin in den Lymphozyten von Hunden, denen β-Carotin verabreicht wurde, generell zeitabhängig zu ($P < 0,01$). Beim Vergleich von Hunden, denen 50 und 100 mg β-Carotin verabreicht wurden, gab es keinen wesentlichen Unterschied der β-Carotin-Konzentrationen in den Lymphozyten.

[0024] β-Carotin war in den verschiedenen subzellularen Fraktionen von Lymphozyten bei Hunden ohne Ergänzung nicht messbar. Im Gegensatz dazu wurde β-Carotin von allen subzellularen Fraktionen von Lymphozyten aufgenommen, die von Hunden mit β-Carotin-Ergänzung isoliert wurden. Die Zytosol-Fraktion machte 52 bis 62% des gesamten β-Carotins in den Lymphozyten aus, während die Zellkerne die kleinste Menge (6 bis 8%) des gesamten β-Carotins enthielten. Die Mitochondrien (14 bis 17%) und Mikrosomen (16 bis 23%) lagen in ihrem Gehalt zwischen dem Zytosol und den Zellkernen. Die Dosis von β-Carotin in der Nahrung hatte am Tag 30 der Zufuhr keinen wesentlichen Einfluss auf die Aufnahme von β-Carotin durch die subzellularen Fraktionen. Die Ergebnisse zeigen, dass β-Carotin von allen subzellularen Fraktionen der Lymphozyten aufgenommen wurde. Jedoch war der β-Carotin-Gehalt im Zytosol am höchsten.

[0025] Mit der Aufnahme von β-Carotin durch Neutrophile verhielt es sich wie bei den Lymphozyten. Anders als bei den Lymphozyten trat die maximale Aufnahme am Tag 10 auf, und am Tag 30 wurde kein weiterer Austieg der β-Carotin-Konzentrationen in Neutrophilen beobachtet. Auch das Zytosol, die Mitochondrien und die Mikrosomen von Neutrophilen im Blut zeigten eine erhebliche Aufnahme von β-Carotin. Im Gegensatz dazu wurde in den Zellkernen kein β-Carotin gefunden. Wie auch bei den subzellularen Fraktionen der Lymphozyten war der β-Carotin-Gehalt in der zytosolischen Fraktion der Neutrophilen am höchsten (61 bis 68). Es wurde keine wesentliche Wirkung der Dosis beobachtet.

[0026] In einer vierten Studie erhielten weibliche Beagles (4 bis 5 Monate alt) täglich zusätzlich 0, 25, 50 oder 100 mg β-Carotin, um die Rolle von β-Carotin in der Nahrung bei der Stärkung des zellvermittelten und humoralen Immunsystems des Hundes zu ermitteln. Die folgenden Parameter wurden bei allen Tieren oder in den peripheren Lymphozyten erfasst: (1) verzögerte Hypersensibilität (DTH) gegenüber PHA (unspezifische Immunität) und Impfung (spezifische Immunität), (2) Lymphozytenproliferation, (3) Lymphozytenpopulationen und (4) Immunglobuline (Ig).

[0027] Die β-Carotin-Ergänzung erhöhte die β-Carotin-Konzentrationen im Plasma in einer dosisabhängigen Weise, hatte jedoch keinen Einfluss auf das Retinol oder α-Tocopherol im Plasma. Diese Änderungen widerspiegelten generell die DTH-Reaktion auf die spezifischen (Impfstoff) und nicht spezifischen (PHA) Antigene. Die deutlichste Reaktion auf einen PHA-Angriff wurde bei Hunden beobachtet, denen 50 mg β-Carotin verabreicht wurden, während Hunde, denen entweder 20 oder 50 mg β-Carotin verabreicht wurden, eine deutlich stärkere DTH-Reaktion auf den Impfstoff zeigten. Die verzögerte Hyperempfindlichkeit ist streng genommen eine Zellenreaktion unter Einbeziehung der T-Zellen und Makrophagen, ohne dass daran Antikörper-Bestandteile beteiligt sind. Antigene liefernde Zellen (z. B. Makrophagen) stellen das Antigen oder Allergen den T-Zellen zur Verfügung, die aktiviert werden und Lymphokine freisetzen. Diese Lymphokine aktivieren Makrophagen und bewirken, dass diese zu gefräßigen Killern der körperfremden Eindringlinge werden. Daher zeigen die Daten eine erhöhte zellvermittelte Reaktion bei Hunden, denen β-Carotin verabreicht wurde.

[0028] Die Zufuhr von β-Carotin bewirkt auch deutliche Änderungen bei den Untergruppen der Lymphozyten. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen wiesen Hunde, denen 20 oder 50 mg β-Carotin verabreicht wurden, eine erhöhte Population an CD4+-Zellen auf (Woche 8). Die Hunde, denen 20 mg β-Carotin verabreicht wurden, wiesen auch eine erhöhte Population von CD8-Zellen in Woche 2 und 4 auf. Die T-Zellen können gemäß der Expression von CD4-Membranmolekülen klassifiziert werden. Die CD4-Zelle funktioniert als Adhäsionsmolekül und als Co-Rezeptor, der ebenfalls Signale aussendet. Sie spielt bei der Aktivierung von T-Zellen eine Rolle. Die CD4+-T-Lymphozyten erkennen in Verbindung mit den MHC-Molekülen der Klasse II Antigene und funktionieren weitgehend als Helferzellen. Mit der Zunahme der Population von T-Helferzellen in dieser Studie lässt sich die entsprechende Zunahme der DTH-Reaktion bei den Hunden erklären, denen 20 bis 50 mg β-Carotin verabreicht wurden.

[0029] Bei den Hunden, denen β-Carotin verabreicht wurde, stiegen die Konzentrationen von IgG, IgM und Gesamt IgG bereits eine Woche nach Beginn der Nahrungsergänzung deutlich an. Die Zunahme an Ig war bei den Hunden dosisabhängig, denen 0 bis 20 mg β-Carotin verabreicht wurden. Das höchste β-Carotin-Niveau (50 mg) führte zu keiner weiteren Steigerung. Die mit 20 mg β-Carotin gefütterten Hunde wiesen übereinstimmend die stärkste Antikörperreaktion bei beiden Ig-Werten auf. Eine der Hauptfraktionen des Immunsystems ist die Produktion frei zirkulierender Antikörper, die den Körper vor körperfremden Stoffen schütze. Antikörper dienen der Neutralisation von Giften, immobilisieren bestimmte Mikroorganismen, neutralisieren Virusaktivitäten, agglutinieren Mikroorganismen, oder Autigenpartikel und bewirken die Abscheidung löslicher Antigene.

[0030] Die Verabreichung von β-Carotin hatte keinen Einfluss auf die mitogeninduzierte Lymphozytenblastogenese und die TL-2-Produktion. Lymphozyten sind an der über die Zellen wirkenden Immunität beteiligt. Nach der Erkennung eines Antigens findet eine rasche Teilung der Lymphozyten statt, wodurch sie sich selbst klonen, um sich auf die Bekämpfung einer potentiellen Invasion vorzubereiten, Bei der Reaktion des Körperflüssigkeitsimmunsystems stimuliert IL-2 die T-Helferzellen und B-Zellen, sich als Reaktion auf die Antigene auszubreiten. Das ist für die klonale Expansion der durch die Antigene oder mitogenaktivierten T-Zellen erforderlich. Bei der über die Zellen stattfindenden Immunreaktion aktiviert IL-2 natürliche Killerzellen. stimuliert die Proliferation von Thymozyten und induziert die zytotoxische Aktivität der T-Zellen.

[0031] Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass der Hund einen wesentlichen Teil des β-Carotins aus der Nahrung absorbiert und das β-Carotin in die subzellulären Organellen der Immunzellen und Phagozyten überträgt. In diesen Zellen scheint das β-Carotin das Immunsystem des Hundes zu stärken, indem es die über die Zellen stattfindende Immunabwehr (DTH-Reaktion, Verschiebung in den Unterguppen der Lymphozyten) und die humorale Abwehr (IgG- und IgM-Produktion) stärkt.

Lutein

[0032] Über einen Zeitraum von 17 Wochen wurden nach dem Zufallsprinzip 56 weibliche Beagles (17 bis 18 Monate alt, durchschnittliches Köpergewicht 11,4 ± 0,4 kg) täglich zusätzlich 0, 5, 10 oder 20 mg Lutein verabreicht. Das Lutein enthielt 76,66% Lutein und 5,23% Zeaxanthin. Die Luteinergänzung wurde in Sojabohnenöl auf die entsprechende Konzentration resuspendiert und täglich um 8 Uhr 1 ml davon peroral verabreicht. Unmittelbar im Anschluss an die Luteinergänzung erhielt der Hund sein Futter (200 g pro Hund und Tag). Die Basisnahrung entsprach den oder übertraf die Anforderungen in Bezug auf alle notwendigen Nährstoffe (NRC 1985). Alle Hunde waren in Boxen von 2 × 2 m (2 Hunde/Box) in einer Einrichtung mit Temperatur- (20 bis 22°C) und Helligkeitsregelung (14 Stunden Licht) untergebracht. Das Körpergewicht wurde in den Wochen 0, 6 und 12 protokolliert.

[0033] In den Wochen 0, 2, 4, 8 und 12 wurde durch Punktierung der Halsvene Blut in heparinisierte, evakuierte Röhrchen entnommen und Aliquoten davon wurden für die HPLC-Analyse und zur Ermittlung der Immunreaktionen verwendet.

Extraktion und HPLC-Analyse

[0034] Zur Untersuchung auf Lutein, Zeaxanthin, Retinol und α-Tocopherol wurde Plasma extrahiert. Kurz, Plasmaprotein wurde durch Zugabe eines gleichen Volumens von Ethanol mit 0,1% butyliertem Hydroxytoluol (BHT) (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, USA) ausgefällt. Die Mischung wurde mit 5 ml einer 1:1-Mischung von Petroleumether und wasserfreiem Diethylether extrahiert.

[0035] Der getrocknete Rückstand wurde im Fließmittel, bestehend aus einer Mischung von 47:47:6 (V:V:V) von HPLC-qualitativem Acetonitril:Methanol:Chloroform (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA), erneut sus-

pendiert. Lutein, Zeaxanthin und α-Tocopherol wurden quantitativ bestimmt, indem die Flächen unter der Kurve verglichen wurden, während Retinol anhand des Maximalwertes quantifiziert wurde. Die Identität der eluierten Verbindungen wurde durch einen Vergleich des Absorptionsspektums mit dem Absorptionsspektrum reiner Verbindungen überprüft. Weil die Trennung von Lutein und Zeaxanthin bis auf die Ausgangslinie nicht erreicht werden kannte, wurden die Plasmakonzentrationen für Lutein + Zeaxanthin zusammen protokolliert.

Verzögerte Hyperempfindlichkeitsreaktion

[0036] Bei allen Hunden wurde in den Wochen 0, 6 und 12 die Verhärtung der Haut ermittelt. Den Hunden wurde in intradermal in die Flanke mit einer Kochsalzlösung (8,5 g/l; Kontrolle) Folgendes injiziert: ein abgeschwächter polyvalenter Impfstoff mit der Hundestaupevirus, Hunde-Adenovirus Typ 2, Hunde-Parainfluenzavirus und Parvovirus (Vanguard 5, Smithkline Beacham, West Chester, PA; spezifisches Antigen) und PHA (0,5 g/l; unspezifisches Antigen). Die Dosierungen von Impfstoff und PHA wurden zuvor ermittelt, um bei allen etwa gleichaltrigen Beagles eine optimale Reaktion der Haut zu erreichen. Die Injektionsstelle wurde geklammert und mit 70%igem Ethylalkohol abgerieben. Das Injektionsvolumen betrug 100 µl. Die Hautverhärtung wurde 0, 24, 48 und 72 Stunden nach der Injektion mithilfe eines druckempfindlichen Digitalmikrometers (Mitsutoyo, Tokyo, Japan) gemessen, und die Reaktion wurde in Prozent der Hautdicke angegeben, die nach 0 Stunden gemessen wurde.

Proliferation von Lymphozyten

[0037] Das in den Wochen 0, 2, 4, 8 und 12 abgenommene Blut wurde zur Ermittlung der mitogeninduzierten Proliferation von Lymphozyten durch periphere, mononukleare Zellen des Blutes (PBMC) verwendet. Die gesamte Blutkultur wurde zur Nachbildung der in-vivo-Bedingungen verwendet. Die verwendeten Mitogene umfassten Phytohämagglutinin (PHA), Concanavalin A (Con A) und Mitogen der Kernesbeere (pokeweed mitogen, PWM). Das gesamte Blut wurde gründlich gemischt und dann 1:12 mit RPMI-1640 verdünnt, das 25 mM Hepes, Penicillin (100 E/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) (Sigma, St. Louis, MO, USA) enthielt.

[0038] Vorstudien mit unverdünntem Blut und Blut, das 1:2, 1:4, 1:8, 1:12 und 1:16 verdünnt wurde, zeigten bei einer Verdünnung von 1:12 eine optimale PBMC-Proliferationsreaktion. Dreimal 150 µl wurden in Platten mit 96 Rundboden-Probenkammern pipettiert und 50 µl der entsprechenden Mitogene hinzugegeben. Die endgültigen Konzentrationen der Mitogene in der Kultur betrugen 2 und 10 µg/ml für PHA, 1 und 5 µg/ml für Con A und 0,5 und 2,5 µg/ml für PWM. Bei Verwendung von Blut einander ähnlicher Tiere führten die beiden Mitogenkonzentrationen in den Vorstudien zu maximalen (höhere Mitogenkonzentration) und suboptimalen (niedrigere Mitogenkonzentration) Proliferationsreaktionen. Die Mischung wurde 72 Stunden lang bei 37°C in einem Inkubator unter einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO_2 inkubiert. Vier Stunden vor Ende der Inkubation wurden 20 µl [^{3}H]-Thymidin (1 [µCi/Probenkammer) hinzugegeben. Die Zeilen wurden auf Fiberglasfilter gelegt und die Radioaktivität mithilfe der Flüssigkeitsszintillation gezählt. Die PBMC-Proliferationreaktion wurde als Stimulationsindex ausgedrückt (cpm (Zählung pro Minute) der stimuliertem Kulturen/cpm der nicht stimulierten Kulturen).

Lymphozyt-Untergruppen

[0039] Die Leukozyten wurden mit Histopaque-1119 (Sigma, St. Louis, MO, USA) abgeschieden. Die Zellen wurden dreimal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4) gewaschen und kontaminierende Erythrozyten wurden in NH_4Cl (8,4 g/l) lysiert. Die Lymphozyt-Untergruppen wurden mithilfe der Durchfluss-Zytometrie bestimmt (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA). Isolierte mononukleare Zellen wurden in PBS auf 1×10^7 Zellen/ml suspendiert, wobei zu der PBS 2% gammaglobulinfreies Serum, 5% Ziegenserum und 0,2 g/l Natriumazid gegeben wurden. Zur Immunofluoreszenzanalyse wurden insgesamt 5×10^5 Zellen mit optimalen Konzentrationen von monoklonalen Anti-Hund-Antikörpern von Mäusen (mAb) 30 Minuten lang auf Eis inkubiert. Die verwendeten mAb waren spezifisch für die folgenden Lymphozyten-Utergruppen: gesamte T-Zellen (anti-CD5), T-Helferzellen (anti-CD4), zytotoxische T-Zellen/T-Suppressorzellen (anti-CD8), Lymphozyten, die den Haupthistokompatibilitätskamplex exprimieren (MHQ-Antigene Klasse II (anti-MHC Klasse II), und B-Zellen (anti-CD21). Die Zellen wurden dann dreimal gewaschen und mit einem sekundären Antikörper, Fluoresceinisothrocyanat(FITC)-konjugierte $F(ab')_2$ Anti-Maus-Antikörper der Ziege IgGyP + IgM (H + L) (Caltag, Burlingare, CA), 30 Minuten lang auf Eis inkubiert, um die gebundenen mAb sichtbar zu machen. Zur Vorbereitung der Erfassung wurden verfärbte Zellen in 4%igem Paraformaldehyd fixiert.

[0040] Zur Korrektur der Hintergrundfluoreszenz wurden Negativkontrollen eingeführt. Die Daten wurden ausgedrückt in Prozent der positiv verfärbten Zellen, korrigiert um die nicht spezifisch mit dem sekundären Antikörper verfärbten Zellen.

Zytotoxität der NK-Zellen

[0041] Zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen wurden Schilddrüsenzellen, von Hunden mit einem Adenokarzinom als Zielzellen verwendet. Diese Zelllinie wurde zuvor als anfällig gegenüber der Abtötung durch NK-Zellen von Hunden dargestellt. Die Zielzellen wurden in einem Kolben T75 mit dem minimal erforderlichen Medium von 20 ml (MEM; Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA) kultiviert, ergänzt mit 10% fötalem Kalbsserum (FCS), 100 E/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Im konfluenten Zustand wurden die Zielzellen trypsinisiert, dreimal gewaschen und im kompletten Medium (RPMI-1640 + 10% FCS + 1000 E/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin) auf 5×10^5 Zellen/ml resuspendiert. Von den Zielzellen wurden drei Aliquoten von 100 µl in Platten mit 96 Probenkammern (96-Well U-bottom Plates von Costar, Cambridge, MA, USA) pipettiert und 8 Stunden inkubiert, um die Zelladhäsion zu ermöglichen. Lymphozyten (Effektorzellen; 100 µl), isoliert durch Percoll-Abscheidung (wie vorstehend beschrieben), wurden dann zu den Zielzellen gegeben, so dass ein Verhältnis von Effektor- zu Zielzelle (E:T) von 10:1 erreicht wurde. Nach 10 Stunden Inkubation bei 37°C wurden 20 µl eines Substrats, das 5 µg 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) enthielt, zugegeben. Die Mischung wurde 4 Stunden bei 370°C inkubiert und danach das nicht metabolisierte MTT durch Absaugen entfernt. Die Formazankristalle wurden durch Zugabe von 200 µl 95%igem Ethanol aufgelöst. Die optische Dichte (OD) wurde mit einem Microplate Reader bei 570 nm gemessen. Der Prozentsatz des spezifischen Zerfalls der NK-Zellen wurde wie folgt berechnet:

Spezifische Zytotoxizität (%) = 100 × {1 – [(OD der Zielzellen und Effektorzellen
– OD der Effektorzellen)/(OD der Zielzellen)]}

IL-2-Produktion

[0042] Die gesamte Blutmenge wurde im Verhältnis 1:2 mit RPMI-1640 verdünnt, das mit Hepes und Antibiotika (zuvor bereits beschrieben) ergänzt worden war, und es wurden 400 µl verdünntes Blut in Platten mit 48 Probenkammern (48-Well Plates von Costar, Cambridge, MA, USA) pipettiert. Die Zellen wurden mit PHA (400 µl einer Lösung von 5 µg/ml) 48 Stunden lang bei 370°C in einer 5%igen CO_2-Atmosphärre stimuliert. Die Platten wurden 10 Minuten lang bei 200 g zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit wurde mit –80°C eingefroren. Der IL-2-Gehalt der überstehenden Flüssigkeit der Kultur wurde dreifach durch ELISA (Intergen, Purchase, NY) bestimmt. Das polyklonale antihumane IL-2 reagierte mit dem IL-2 des Hundes und das rekombinierte humane IL-2 wurde als Standard verwendet.

IgG und IgM des Serums

[0043] Das in den Wochen 0, 2, 4, 8 und 12 abgenommene Serum wurde mittels Single Radial Immundiffusion (SRID) auf die Konzentrationen von IgG und IgM untersucht. Außerdem wurden alle Hunde in Woche 13 polyvalenten Impfstoff (Vanguard 5, Smithkline Beacham, West Chester, PA) geimpft und in Woche 15 ein weiteres Mal, um den möglichen Anamnese-Effekt des Luteins in der Nahrung zu ermitteln. Von Woche 13 bis Woche 17 wurde wöchentlich Blut entnommen. Ziegen-Antiserum wurde in der IgG-Größenordnung (10%, ganze Moleküle) oder IgM-Größenordnung (7,5% µ-kettenspezifisch) (ICN, Aurora, OH, USA) mit geschmolzener Agarose (10 g/l in PBS; Sigma Chem.) Louis, MO, USA) vermischt, und man ließ die Mischung in SRID-Platten erstarren. Zwei Mengen von 5 µl des Serums oder des IgG-(0, 2,88, 5,75, 11,5 und 23,0 mg/ml) oder IgM-(0, 0,25, 0,5, 1,0 und 2,0 mg/ml)Standards wurden in die Probenkammern gegeben. Nach der Inkubation von 24 Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer wurden die Ringdurchmesser mit einem SRID-Reader (Transidyne General Corp., Ann Arbor, MI) gemessen.

Untersuchung der Lipid-Peroxidation (TBARS)

[0044] Die Lipid-Peroxidationsaktivität des Plasmas wurde durch Messung der Produktion von Malondialdehyd (MDA) bestimmt. Die verwendete Standardsubstanz war 1,1,3,3-Tetramethoxypropan JMP) (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA). Zwei Plasmaproben von 500 µl wurden in 15-ml-Glasröhrchen pipettiert, und 3 ml Phospharsäure mit 10 g/l und 1 ml TBA-Lösung mit 6 g/l wurden hinzugegeben. Die Mischung wurde 45 Minuten lang in einem Wasserbad gekocht. Man ließ die Röhrchen abkühlen und der TBA-MDA-Komplex wurde dann mit 4 ml n-Butanol extrahiert. Die Butanolschicht wurde 10 Minuten lang mittels Zentrifugieren bei 1.000

g abgetrennt und die Absorption auf bei 532 nm gemessen (Beckman, Fullerton, CA). Die TBARS-Aktivität wurde in nMol MDA/L-Plasma ausgedrückt.

Statistik

[0045] Die Daten wurden mittels Split-Plot ANOVA unter Verwendung des General. Linear Model von SAS analysiert. Das statistische Modell war $Y_{ýk} = \mu$ + Nahrung, + $Hund_j$(Nahrung) (der Fehlerausdruck diente zum Test der Wirkungen der Nahrung) + $Zeitraum_k$ + $Nahrung_i \cdot Zeitraum_k$ + $e_{yk'}$ Unterschiede in den Behandlungssubstanzen wurden durch orthogonalen Kontrast verglichen und bei P < 0 als statistisch erheblich angesehen. 05.

Ergebnisse

Plasma

[0046] Die Konzentrationen von Lutein + Zeaxanthin im Plasma von Hunden, denen Lutein als Ergänzung verabreicht wurde, stiegen nach 2 Wochen der Verabreichung rasch an. (**Fig. 1**). Die Plasmakonzentrationen stiegen danach bei den Hunden, die 10 und 20 mg Lutein erhielten, weiter an, jedoch nur noch allmählich. Im Gegensatz dazu war im Plasma von Hunden, die keine Ergänzung erhielten, kein Latein und Zeaxanthin feststellbar. Bei den mit Lutein gefütterten Hunden waren die Konzentrationen von Lutein + Zeaxanthin im Plasma in den kochen 2 bis 12 deutlich höher (P < 0,05) als bei den Hunden ohne Ergänzung. Die Lateinergänzung hatte keinen Einfluss auf die Konzentrationen von Retinol und α-Tocopherol im Plasma. Die Konzentrationen dieser Vitamine betrugen bei allen Behandlungen und in allen Zeiträumen im Mittel 3,63 ± 0,14 bzw. 37 ± 2 µMol/l.

Verzögerte Hyperempfindlichkeitsreaktion

[0047] In allen untersuchten Zeiträumen war die DTH-Reaktion auf Kochsalzlösung gering (3 bis 10% Zunahme der Hautdicke) und unterschied sich nicht wesentlich zwischen den Behandlungsgruppen. Vor der Luteinzufuhr (Woche 0) waren die DTH-Reaktionen auf PHA und Impfstoff in allen Ernährungsgruppen ähnlich. Ungeachtet der Behandlungsdauer wurde die maximale DTH-Reaktion auf PHA etwa 24 Stunden nach der Injektion beobachtet, während die maximale Reaktion auf den Impfstoff zwischen 48 und 72 Stunden danach auftrat. Außerdem war die Reaktion der Hautdicke auf PHA etwa zweimal stärker als auf den Impstoff.

[0048] In Woche 8 trat 24 Stunden nach der Injektion eine dosisabhängige DTH-Reaktion auf PHA auf. Die DTH-Reaktion verringerte sich nach 48 und 72 Stunden und es wurde während dieser Zeiten kein wesentlicher Behandlungsunterschied beobachtet. Die DTH-Reaktion auf Impfstoff war 48 und 72 Stunden nach der Injektion dosisabhängig und nach 24 Stunden unbedeutend.

[0049] In Woche 12 gab es nach 24, 48 und 72 Stunden eine allgemeine dosisabhängige Zunahme der DTH-Reaktion auf PHA; jedoch war bei mit 20 mg Lutein gefütterten Hunden die Reaktion deutlich stärker als bei den Hunden ohne Nahrungsergänzang. Im Gegensatz zu Woche 6 gab es keine deutliche Auswirkung der Ernährung auf die DTH-Reaktion auf Impfstoff.

Mitogeninduzierte PBMC-Proliferation

[0050] Lutein in der Nahrung beeinflusst unwesentlich die spontane Proliferation durch nicht stimulierte PBMC. Es gab keine signifikante Wirkung des Lateins der Nahrung auf die PHA-stimulierte PBMC-Reaktion in den Wochen 0 und 4. Jedoch verstärkte sich die proliferative Reaktion (P < 0,01) in Woche 8 (10 pg/ml PHA) und Woche 12 (2 und 10 µg/ml PHA) bei Hunden, denen 20 mg Lutein verabreicht wurden, im Vergleich zu Hunden ohne diese Ergänzung. Die mit 5 und 10 mg Lutein gefütterten Hunde wiesen in Woche 8 ebenfalls eine höhere PBMC-Proliferation als Reaktion auf 10 µg/ml PHA auf.

[0051] Die Auswirkungen des Nahrungs-Luteins auf die durch Con A stimulierte Proliferationsreaktion der PBMC ähnelten im Allgemeinen denen, die bei der PHA-induzierten Proliferation beobachtet wurden. Die mit 20 mg Lutein gefütterten Hunde wiesen in Woche 8 eine höhere PBMC-Proliferation als Reaktion auf beide Con-A-Konzentrationen auf. Die mit 10 mg Lutein gefütterten Hunde wiesen in den Wochen 8 und 12 auch eine höhere PBMC-Proliferation als Reaktion auf 5 µg/ml Con A auf. Generell war die PBMC-Proliferation bei 5 µg/ml höher als bei 1 µg/ml Con A.

[0052] Die PBMC-Proliferation als Reaktion auf PWM war im Allgemeinen ähnlich der bei PHA und Con A beobachteten. Im Vergleich zu den Kontrolltieren ohne Nahrungsergänzung wiesen die mit 20 mg Lutein gefütterten Hunde in den Wochen 8 und 12 als Reaktion auf beide PWM-Konzentrationen eine deutlich höhere PBMC-Proliferation auf. Jene mit 10 mg Lutein gefütterten wiesen auch eine höhere proliferative Reaktion in Woche 8 auf. Wiederum wurde kein signifikanter Behandlungsunterschied in den Wochen 0 und 4 beobachtet.

Zytotoxische Aktivität natürlicher Killerzellen

[0053] Die Nahrungsergänzung durch Lutein hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen. Der durch PBMC verursachte spezifische Zerfall von Zielzellen betrug bei allen Behandlungen und in allen Probennahmezeiträumen im Mittel 49,1 ± 1,1%.

Subpopulationen von Lymphozyten

[0054] Vor der Nahrungsergänzung durch Latein (Woche 0) gab es keine wesentlichen Unterschiede in den Prozentanteilen der Lymphozytmarker. In Woche 12 war der Prozentsatz an CD4+-Zellen bei Hunden, die mit 5 und 10 mg Lutein gefüttert wurden, höher, während die Nahrung keinen Einfluss auf die CD8+Population hatte. Andererseits wiesen die mit 20 mg Latein gefütterten Hunde in Woche 8 einen deutlich höheren Prozentsatz an zytotoxischen CD8+-T-Zellen als die Kontrolltiere auf. Das Verhältnis von CD4;CD8 war bei den Behandlungen in den Wochen 0, 4 und 8 ähnlich, war jedoch tendenziell höher ($P < 0,08$) bei Hunden, denen 10 mg (2,50 ± 0,16) verabreicht wurden als bei der Kontrollgruppe (2,10 ± 0,16).

[0055] In den Wochen 4 und 8 wiesen die mit Lutein gefütterten Hunden generell höhere Prozentanteile an CD5+-Zellen als die Kontrolltiere ohne Ergänzung auf, wobei die Prozentanteile bei den mit 5 und 20 mg Lutein gefütterten Hunden statistisch erheblich waren. Im Vergleich zu den Runden ohne Ergänzung besaßen die mit 20 mg Lutein gefütterten Hunde in den Wochen 8 und 12 auch erhöhte Populationen von Zellen der MHC-Klasse 11. Die mit geringeren Luteinmengen gefütterten Hunde besaßen ähnliche Populationen an Zellen der MCH-Klasse 11 wie die Kontrolltiere.

[0056] Im Gegensatz zu anderen Lymphozyt-Subpopulationen hatte das Lutein in der Nahrung keinen wesentlichen Einfluss auf die Population von CD21+-B-Zellen.

Produktion von Interleukin-2

[0057] Im Versuchszeitraum unterschied sich die Produktion Von IL-2 durch PHA-stimulierte PBMC in den Blutkulturen zwischen den Ernährungsgruppen nicht wesentlich. Die IL-2-Konzentrationen in der Kultur betrugen im Verlauf der Studie durchschnittlich 15,7 ± 0,4 ng/ml.

Produktion von Immunoglobulin

[0058] Tendenziell erhöhten sich die Plasma-IgG-Konzentrationen ($P > 0,05$) im 17-wöchigen Blutentnahmezeitraum. In den ersten 12 Wochen der Nahrungsergänzung waren die Konzentrationen in den Nahrungsgruppen ähnlich. Nach erneuter Impfung in Woche 15 war der Plasma-IgG-Wert jedoch höher ($P < 0,05$) in Woche 16 bei Hunden, denen 5 mg Lutein ($P < 0,05$) verabreicht wurden, und in Woche 17 bei Hunden, denen 20 mg Lutein verabreicht wurden, während die Plasma-IgM-Konzentration unverändert blieb.

Lipid-Peroxidation

[0059] Die Luteinergänzung hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die TBARS-Aktivität des Plasmas, die in allen Zeiträumen und bei allen Behandlungen durchschnittlich 95,8 ± 0,1 nMol MDA/L betrug.

Diskussion

[0060] Die Ergebnisse zeigen, dass Lutein in der Nahrung die über die Zellen stattfindende Immunreaktion des Hundes wesentlich erhöht. Die Luteinergänzung stimulierte die PBMC-Proliferationsreaktion auf PHA, Con A und PWM. Bei den mit 20 mg Lutein gefütterten Hunden trat in Woche 12 eine ausgeprägte Zunahme der PBMC-Proliferation als Reaktion auf PHA und Con A auf.

[0061] Die Daten zeigen, dass die erhöhte Mitogenese durch Lutein in der Nahrung wahrscheinlich der gestiegenen Population von Lymphozyten zuzuschreiben ist. Die mit der Lateinergänzung ernährten Hunde be-

saßen höher Populationen von CD5+- und CD4+-Zellen. Lutein in der Nahrung wirkt möglicherweise auf die T-Lymphozyten, weil bei der Lateinergänzung keine Änderung der B-Zellen-Population festgestellt wurde.

[0062] Die Daten haben auch gezeigt, dass die Lateinergänzung in den Wochen 8 und 12 die PWM-induzierte PBMC-Proliferation deutlich erhöht hat.

[0063] Durch das Latein in der Nahrung wurde auch die DTH-Reaktion auf Impfstoff deutlich erhöht, was auf eine spezifische Immunreaktion hinweist. Im Vergleich zu den Hunden ohne Ergänzung erhöhte die Lateinergänzung auch deutlich die Anzahl von Zellen mit einer für Moleküle der MHC-Klasse II positiven Färbung.

[0064] In den ersten 12 Wochen der Ergänzung beeinflusste das Lutein die ex-vivo-Produktion polyklonaler Antikörper (IgG und IgM) des Hundes nicht wesentlich. Nach einer erneuten Antigen-Exposition jedoch nahmen die IgG-Konzentrationen im Plasma der mit Lutein gefütterten Hunde zu, was auf einen Anamnese-Effekt des Luteins in der Nahrung zur Erhöhung der Fähigkeit von Speicher-B-Zellen hindeutet, IgG abzusondern.

[0065] Zusammenfassend ist festzustellen, dass Lutein in der Nahrung die Population von T-Helferzellen bei den Hunden stärkte, die Ausprägung von Molekülen der MHC-Klasse II, was zu erhöhter mitogeninduzierter PBMC-Proliferation und DTH-Reaktion des Hundes führte. Außerdem erhöht Lutein wahrscheinlich die Ig-Produktion.

[0066] Tabelle 1 enthält eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Studien.

Tabelle 1

Vorteil	Vitamin E	β-Carotin	Latein
Optimierung der Aktivität der Immunzellen	√ (T-Zellen)		√ (B-Zellen)
Optimierung der im Blut vorhandenen Zelltypen		√	
Erhöhung des Antikörperniveaus im Blut		√	
Optimierung der Impfstofferkennung beim Hund		√	√

[0067] Fig. 1 zeigt eine Zunahme des Antikörperniveaus von 20% im Blut bei Hinzugabe von β-Carotin zur Nahrung.

[0068] Fig. 2 stellt die Fähigkeit des Hundes zur Impfstofferkennung dar. Die Erkennung wird wie dargestellt durch die Hinzugabe von Lutein zur Nahrung um fast 32% verbessert. Dadurch wird die Reaktion des Hundes auf Impfungen verbessert und dadurch ein zusätzlicher Schutz vor Krankheiten erreicht.

[0069] Zu beachten ist, dass kein Antioxidationsmittel Vorteile in Bezug auf alle Aspekte des untersuchten Immunsystems lieferte. Während zum Beispiel sowohl Vitamin E als auch Lutein die Aktivierung von Immunzellen optimierten, wirkte Vitamin E auf die T-Zellen und Lutein auf die B-Zellen. Die verbesserte Funktion der T-Zellen ist für die Bekämpfung von Virusinfektionen und Krebs von Bedeutung, während die Funktion der B-Zellen für bakterielle Infektionen wichtig ist. Daher bietet eine Kombination von Antioxidationsmitteln Synergieeffekte in Bezug auf das Immunsystem, welche die Vorteile übertreffen, die mit der Erhöhung des Niveaus eines einzelnen Antioxidationsmittels verbunden sind.

Patentansprüche

1. Verwendung einer Tiernahrungszusammensetzung, die eine Kombination von Vitamin E, Lutein und β-Carotin enthält, bei der Herstellung eines Tiernahrungsprodukts zum Gebrauch bei der Stärkung der Immunabwehr eines Hundes, wobei das Tiernahrungsprodukt von 4% bis 20% Ballaststoff insgesamt, 18 bis 40% Rohprotein und 4 bis 30% Fett umfasst.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Zusammensetzung von 175 bis 400 IE an Vitamin E pro Kilogramm der Diät, von 1 bis 50 mg/Tag an Lutein und von 1 bis 50 mg/Tag an β-Carotin umfasst.

3. Verwendung einer Tiernahrungszusammensetzung, die eine Kombination von Vitamin E, Lutein und β-Carotin enthält, bei der Herstellung eines Tiernahrungsprodukts zur Optimierung von Immunzellen bei einem Hund.

4. Verwendung einer Tiernahrungszusammensetzung, die eine Kombination von Vitamin E, Lutein und β-Carotin enthält, bei der Herstellung eines Tiernahrungsprodukts zur Optimierung der Impfstofferkennung bei einem Hund.

5. Tiernahrungszusammensetzung zum Verstärken der Immunabwehr bei einem Hund, umfassend eine Kombination von Vitamin E, Lutein und β-Carotin, wobei die Zusammensetzung von 4% bis 20% Ballaststoff insgesamt, 18 bis 40% Rohprotein und 4 bis 30% Fett umfasst.

6. Tiernahrungszusammensetzung nach Anspruch 5, umfassend von 175 bis 400 IE an Vitamin E pro Kilogramm der Diät, von 1 bis 50 mg/Tag an Lutein und von 1 bis 50 mg/Tag an β-Carotin.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

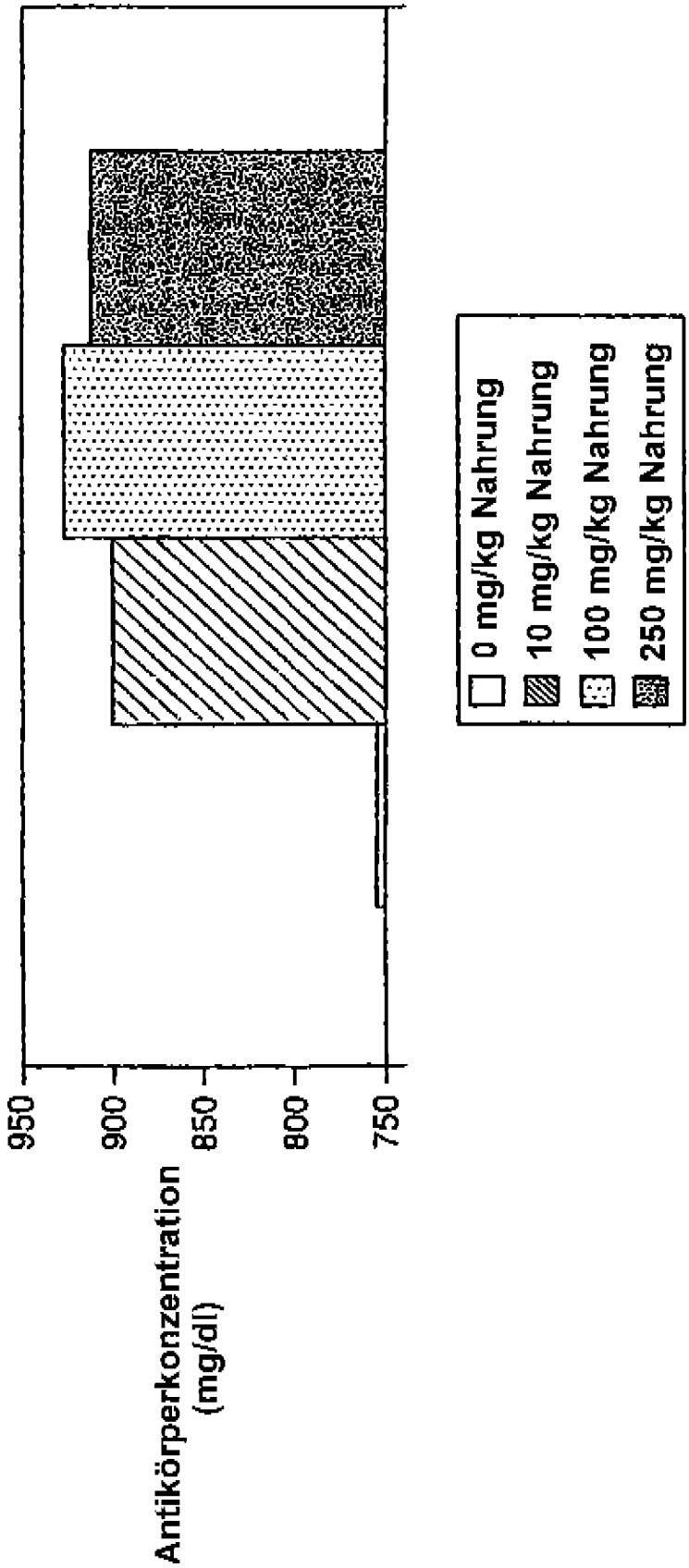
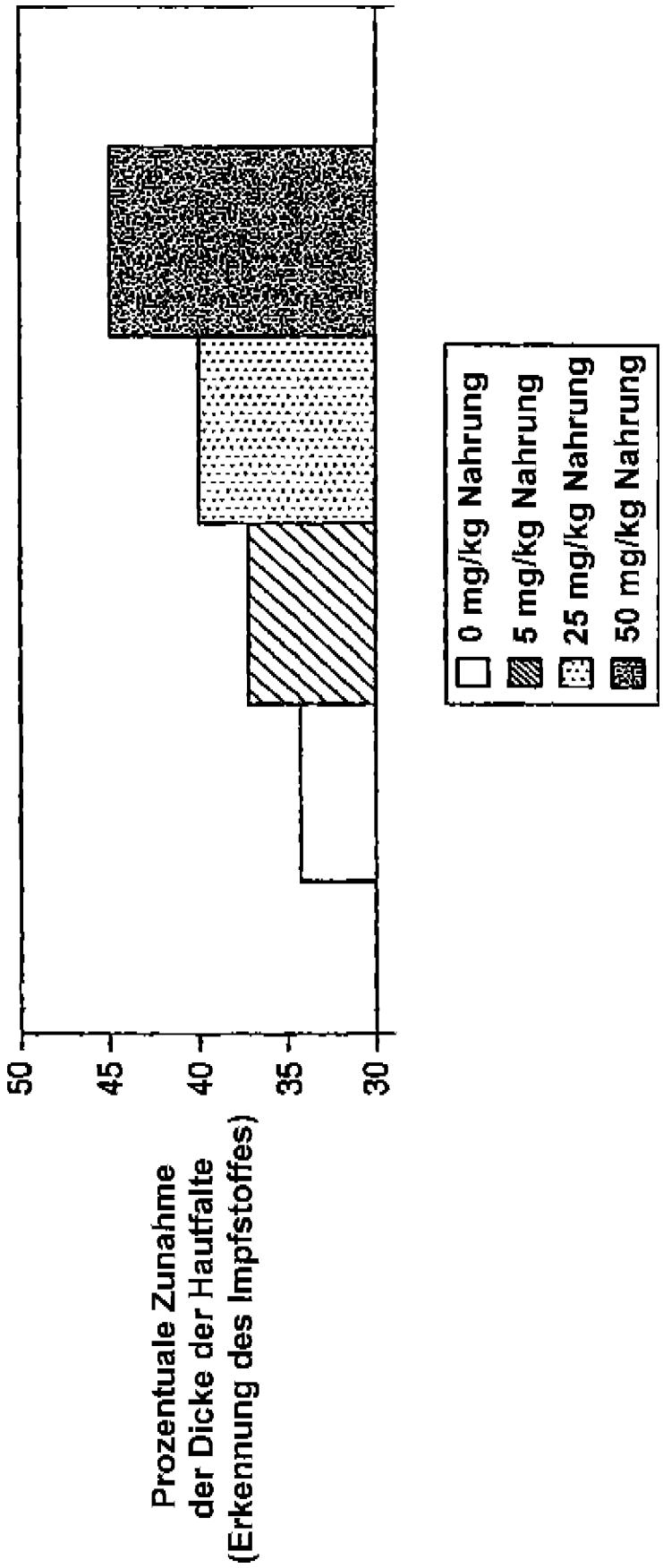


FIG. 2


Prozentuale Zunahme
der Dicke der Hautfalte
(Erkennung des Impfstoffes)
50
45
40
35
30
0 mg/kg Nahrung
5 mg/kg Nahrung
25 mg/kg Nahrung
50 mg/kg Nahrung