

Aus dem Institut für Tierernährung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zum Einfluss von Inulin und thermisch behandelten
Ackerbohnen auf immunologische Parameter bei Sauen,
Saug- und Absetzferkeln**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Nadine Paßlack
Tierärztin
aus Bottrop

Berlin 2010

Journal-Nr.: 3388

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Karl-Heinz Lahrmann
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Michael F.G. Schmidt

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

piglets, sows, inulin, faba beans, immune system, sow milk, flow cytometry,
lymphocytes, immunoglobulins

Tag der Promotion: 01.07.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-810-4

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2010

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Literatur	2
2.1	Immunologische Entwicklung des Ferkels	2
2.1.1	Aktive Immunabwehr	2
2.1.2	Passive Immunabwehr	3
2.1.3	Darmassoziiertes lymphatisches Gewebe	5
2.1.4	Besonderheiten des porcinen Immunsystems	5
2.2	Inulin	12
2.2.1	Chemische Struktur und Vorkommen	12
2.2.2	Eigenschaften und Bedeutung	13
2.2.3	Wirkungen auf das Immunsystem	14
2.3	Antinutritive Substanzen in Leguminosen	16
2.3.1	Definition und Vorkommen	16
2.3.2	Behandlungsverfahren zur Reduktion antinutritiver Inhaltsstoffe in Leguminosen	18
2.3.3	Wirkungen und Wirkmechanismen	19
3.	Material und Methoden	22
3.1	Versuchsaufbau	22
3.2	Probengewinnung	29
3.3	Futtermitteluntersuchung	30

3.4	Leistungsparameter	31
3.5	Immunologische Parameter	33
3.5.1	Differentialblutbild	33
3.5.2	Durchflusszytometrische Messungen	33
3.5.2.1	Phänotypisierung der Leukozyten in der Sauenmilch	34
3.5.2.2	Phänotypisierung der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)	37
3.5.2.3	Phänotypisierung der intraepithelialen Leukozyten im Darm	39
3.5.2.4	Proliferation der Lymphozyten aus dem Blut und aus dem Darm	43
3.5.3	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	46
3.5.3.1	Bestimmung der Immunglobulingehalte in der Milch und im Serum	46
3.6	Statistische Auswertung	48
4.	Ergebnisse	50
4.1	Leistungsparameter	50
4.1.1	Gesundheitszustand der Tiere	50
4.1.2	Reproduktionsspezifische Parameter	50
4.1.3	Lebendmasse, Futteraufnahme und Futteraufwand	51
4.2	Immunologische Parameter	52
4.2.1	Differentialblutbild	52
4.2.2	Phänotypisierung der Leukozyten in der Sauenmilch	54
4.2.3	Phänotypisierung der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)	58
4.2.4	Phänotypisierung der intraepithelialen Leukozyten im Darm	63

4.2.5	Proliferation der Lymphozyten aus dem Blut und aus dem Darm	68
4.2.6	Immunglobulingehalte in der Sauenmilch	72
4.2.7	Immunglobulingehalte im Serum	74
5.	Diskussion	80
5.1	Kritik der Methode	80
5.1.1	Versuchsdesign	80
5.1.2	Probenmaterial und Untersuchungsmethoden	82
5.2	Diskussion der Ergebnisse	84
5.2.1	Einfluss von Inulin und thermisch behandelten Ackerbohnen auf die Leistung sowie auf immunologische Parameter bei Sauen, Saug- und Absetzferkeln	84
5.2.2	Immunologische Eigenschaften der Sauenmilch	87
5.2.3	Vergleich zwischen den Saug- und Absetzferkeln	89
5.3	Schlussfolgerung und Ausblick	95
6.	Zusammenfassung	96
7.	Summary	98
8.	Zitierte Literatur	100
9.	Anhang	121
	Publikationsverzeichnis	128
	Danksagung	129
	Selbstständigkeitserklärung	130

Tabellen

Tabelle 1	Funktion und Verteilung der porcinen T-Lymphozyten im Blut und im peripheren lymphatischen Gewebe (peripheral lymphoid tissues, pLT). Angaben in % der detektierten Lymphozyten in der durchflusszytometrischen Bestimmung.	8
Tabelle 2	Verteilung und Konzentration der Immunglobuline (Ig) im Serum, Kolostrum und in der Milch von Ferkeln und Sauen. Angaben in µg/ml (Fetus) beziehungsweise mg/ml (Ferkel, Sauen).	11
Tabelle 3	Antinutritive Inhaltsstoffe in Körnerleguminosen (modifiziert nach Jeroch et al., 2008).	17
Tabelle 4	Zusammenstellung der Effekte unterschiedlich behandelte Leguminosen auf die Proteinverdaulichkeit bei Schweinen.	19
Tabelle 5	Zusammenstellung der Effekte unterschiedlich behandelte Leguminosen auf die Proteinverdaulichkeit beim Geflügel.	20
Tabelle 6	Zusammensetzung (%) des eingesetzten Trächtigkeits- und Laktationsfutters.	23
Tabelle 7	Rohnährstoff-, Mineralstoff- und Inulingehalte sowie Säurebindungskapazität des eingesetzten Trächtigkeitsfutters für die Kontroll- (K) und Inulingruppe (I).	23
Tabelle 8	Rohnährstoff-, Mineralstoff- und Inulingehalte sowie Säurebindungskapazität des eingesetzten Laktationsfutters für die Kontroll- (K) und Inulingruppe (I).	24
Tabelle 9	Überblick über die erfolgten immunologischen Untersuchungen bei den Sauen in der vorliegenden Studie.	24
Tabelle 10	Überblick über die erfolgten immunologischen Untersuchungen bei den Saugferkeln in der vorliegenden Studie.	25
Tabelle 11	Überblick über die erfolgten immunologischen Untersuchungen bei den Absetzferkeln in der vorliegenden Studie.	25
Tabelle 12	Zusammensetzung (%) des eingesetzten Saugferkelbeifutters.	26
Tabelle 13	Rohnährstoff-, Mineralstoff- und Inulingehalte sowie Säurebindungskapazität des eingesetzten Saugferkelbeifutters für	26

	die Kontroll- (K) und Inulingruppe (I).	
Tabelle 14	Übersicht über die Versuchsgruppen der Absetzferkel.	26
Tabelle 15	Zusammensetzung (%) des eingesetzten Aufzuchtfutters.	27
Tabelle 16	Rohnährstoff-, Mineralstoff- und Inulingehalte sowie Säurebindungskapazität des eingesetzten Aufzuchtfutters. K = Kontrollgruppe, I = Inulingruppe.	27
Tabelle 17	Bestimmungsgrundlage für reproduktionsspezifische Merkmale der Sauen.	32
Tabelle 18	Emissionsmaxima der in den durchflusszytometrischen Messungen der vorliegenden Studie eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe.	33
Tabelle 19	Übersicht über die in der vorliegenden Studie eingesetzten primären Antikörper sowie Angabe der Verwendungszeitpunkte.	41
Tabelle 20	Übersicht über die in der vorliegenden Studie eingesetzten sekundären Antikörper.	41
Tabelle 21	Übersicht über die in der vorliegenden Studie nachgewiesene Expression bestimmter Oberflächenmoleküle von Immunzellen zur Detektion spezifischer Leukozytenpopulationen.	42
Tabelle 22	Übersicht über die in der vorliegenden Studie eingesetzten Mitogene.	45
Tabelle 23	Übersicht über die für die Lymphozytenproliferation eingesetzten Antikörper.	45
Tabelle 24	Vergleichende Darstellung reproduktionsspezifischer Parameter der Sauen der Kontroll- (K) und Inulingruppe (I). Anzahl der Ferkel pro Wurf, Median (Minimum-Maximum).	50
Tabelle 25	Lebendmasse (kg) der Saugferkel in der zehntägigen Fütterungsperiode. Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I). Angaben pro Tier, Median (Minimum-Maximum).	51
Tabelle 26	Übersicht über die rechnerisch ermittelten Leistungsparameter bei den Absetzferkeln während des Versuchszeitraums. Vergleichende Darstellung zwischen den vier Fütterungsgruppen, die extrudierte beziehungsweise getoastete Ackerbohnen ohne (Kontrollgruppe	51

	(K)) oder mit Inulin (Inulingruppe (I)) erhielten. Angaben pro Tier, Mittelwert.	
Tabelle 27	Blutbild und Differentialblutbild der Saugferkel, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).	52
Tabelle 28	Blutbild und Differentialblutbild der Absetzferkel, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen den vier Fütterungsgruppen, die extrudierte beziehungsweise getoastete Ackerbohnen ohne (Kontrollgruppe (K)) oder mit Inulin (Inulingruppe (I)) erhielten.	53
Tabelle 29	Leukozytenverteilung in der Sauenmilch zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Laktation. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).	55
Tabelle 30	Leukozytenverteilung in der Sauenmilch zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Laktation. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Zusammenfassende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).	56
Tabelle 31	Lymphozytenverteilung in der Sauenmilch zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Laktation. Angaben in % der detektierten Lymphozyten, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).	57
Tabelle 32	Lymphozytenverteilung in der Sauenmilch zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Laktation. Angaben in % der detektierten Lymphozyten, Median (Minimum-Maximum). Zusammenfassende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).	58
Tabelle 33	Leukozytenverteilung im Blut der Saugferkel am zehnten Lebenstag. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).	59
Tabelle 34	Leukozytenverteilung im Blut der Absetzferkel. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen den vier Fütterungsgruppen, die extrudierte beziehungsweise getoastete Ackerbohnen ohne	60

	(Kontrollgruppe (K)) oder mit Inulin (Inulingruppe (I)) erhielten.	
Tabelle 35	Leukozytenverteilung im Blut der Saug- und Absetzferkel. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).	62
Tabelle 36	Leukozytenverteilung im Blut der Saug- und Absetzferkel. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Zusammenfassende Darstellung der Kontroll- (K) und Inulingruppe (I).	63
Tabelle 37	Verteilung der intraepithelialen Leukozyten im Darm der Saugferkel. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).	64
Tabelle 38	Verteilung der intraepithelialen Leukozyten im Darm der Absetzferkel. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen den vier Fütterungsgruppen, die extrudierte beziehungsweise getoastete Ackerbohnen ohne (Kontrollgruppe (K)) oder mit Inulin (Inulingruppe (I)) erhielten.	65
Tabelle 39	Verteilung der intraepithelialen Leukozyten im Darm der Saug- und Absetzferkel. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe.	67
Tabelle 40	Verteilung der intraepithelialen Leukozyten im Darm der Saug- und Absetzferkel. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Zusammenfassende Darstellung der Kontroll- (K) und Inulingruppe (I).	68
Tabelle 41	Darstellung der mitogenstimulierten Proliferation der Leukozyten aus dem Blut der Saugferkel im Alter von zehn Tagen. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).	69
Tabelle 42	Darstellung der mitogenstimulierten Proliferation der Leukozyten aus dem Blut der Absetzferkel. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen den vier Fütterungsgruppen, die extrudierte beziehungsweise getoastete Ackerbohnen ohne (Kontrollgruppe (K)) oder mit Inulin (Inulingruppe (I)) erhielten.	69

Tabelle 43	Darstellung der mitogenstimulierten Proliferation der Leukozyten aus dem Blut der Saug- und Absetzferkel. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).	70
Tabelle 44	Darstellung der mitogenstimulierten Proliferation der Leukozyten aus dem Blut der Saug- und Absetzferkel. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Zusammenfassende Darstellung der Kontroll- (K) und Inulingruppe (I).	70
Tabelle 45	Darstellung der PHA-M stimulierten Proliferation der intraepithelialen Leukozyten aus dem Darm der Absetzferkel. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen den vier Fütterungsgruppen, die extrudierte beziehungsweise getoastete Ackerbohnen ohne (Kontrollgruppe (K)) oder mit Inulin (Inulingruppe (I)) erhielten.	71
Tabelle 46	Immunglobulingehalt in der Sauenmilch zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Laktation. Angaben in mg/ml, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).	73
Tabelle 47	Immunglobulingehalt in der Sauenmilch zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Laktation. Angaben in mg/ml, Median (Minimum-Maximum). Zusammenfassende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).	73
Tabelle 48	Immunglobulingehalt im Serum der Sauen am fünften Tag post partum. Angaben in mg/ml, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).	75
Tabelle 49	Immunglobulingehalt im Serum der Saugferkel am zehnten Lebenstag. Angaben in mg/ml, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).	75
Tabelle 50	Immunglobulingehalt im Serum der Absetzferkel am 59. (± 1) Lebenstag. Angaben in mg/ml, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen den vier Fütterungsgruppen, die extrudierte beziehungsweise getoastete Ackerbohnen ohne (Kontrollgruppe (K)) oder mit Inulin (Inulingruppe (I)) erhielten.	76

Tabelle 51	Immunglobulingehalt im Serum der Absetzferkel am 59. (± 1) Lebenstag. Angaben in mg/ml, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe und der Inulingruppe unter zusammenfassender Betrachtung der Gruppen, die extrudierte (A_e) beziehungsweise getoastete (A_t) Ackerbohnen erhielten.	76
Tabelle 52	Immunglobulingehalt im Serum der Saug- und Absetzferkel. Angaben in mg/ml, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).	77
Tabelle 53	Immunglobulingehalt im Serum der Saug- und Absetzferkel. Angaben in mg/ml, Median (Minimum-Maximum). Zusammenfassende Darstellung der Kontroll- (K) und Inulingruppe (I).	77
Tabelle 54	Für die Futtermitteluntersuchungen eingesetzten Geräte und Chemikalien.	121
Tabelle 55	Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen eingesetzten Geräte, Materialien und Chemikalien.	122
Tabelle 56	Für die ELISA-Untersuchungen eingesetzten Geräte, Materialien und Chemikalien.	123
Tabelle 57	Im Rahmen der ELISA-Untersuchungen eingesetzten Verdünnungen der Antikörper und Proben.	124
Tabelle 58	Verdünnung der Standardansätze zur Bestimmung von IgA im Serum der Schweine.	124
Tabelle 59	Verdünnung der Standardansätze zur Bestimmung von IgG im Serum der Schweine.	125
Tabelle 60	Verdünnung der Standardansätze zur Bestimmung von IgM im Serum der Schweine.	125

Abbildungen

Abbildung 1	Chemische Struktur des Inulins.	12
--------------------	---------------------------------	----

Abbildung 2	Versuchsdesign der vorliegenden Studie.	28
Abbildung 3	Probenlokalisierung zur Gewinnung der intraepithelialen Lymphozyten. Modifizierte schematische Darstellung des Schweinedarms.	30
Abbildung 4	Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation zur Lymphozytenisolierung aus der Milch.	35
Abbildung 5	Darstellungsformen zur Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen in der Milch im in der vorliegenden Studie genutzten durchflusszytometrischen Verfahren.	37
Abbildung 6	Darstellungsformen der mit PWM, ConA und PHA-M stimulierten peripheren mononukleären Blutzellen im in der vorliegenden Studie genutzten durchflusszytometrischen Verfahren.	44
Abbildung 7	Standardkurve zur Bestimmung der IgA-Konzentration im Serum der Sauen und Ferkel (analog zur Bestimmung von IgG und IgM sowie zur Immunglobulinbestimmung in der Sauenmilch).	48
Abbildung 8	Zusammenfassende Darstellung der gemessenen Gehalte der Immunglobulinklassen G, A und M (Ig, total (mg/ml)) in der Sauenmilch an den Tagen 1, 5 (± 1) und 14 (± 1) post partum (p.p.). Die Berechnungsgrundlage bildeten die ermittelten Medianwerte der entsprechenden Immunglobulinklassen.	72
Abbildung 9	Prozentualer Anteil der gemessenen Immunglobuline IgG, IgA und IgM in der Sauenmilch an den Tagen 1, 5 (± 1) und 14 (± 1) post partum (p.p.). Die Berechnungsgrundlage bildeten die ermittelten Medianwerte der entsprechenden Immunglobulinklassen.	74
Abbildung 10	Immunglobulingehalte (mg/ml) im Serum der Sauen (Tag fünf post partum), Saugferkel (zehnter Lebenstag) und Absetzferkel (60. (± 1) Lebenstag). Die Berechnungsgrundlage bildeten die ermittelten Medianwerte der entsprechenden Immunglobulinklassen.	78
Abbildung 11	Prozentualer Anteil der gemessenen Immunglobuline IgG, IgA und IgM im Serum der Sauen (Tag fünf post partum), Saugferkel (zehnter Lebenstag) und Absetzferkel (59. (± 1) Lebenstag). Die Berechnungsgrundlage bildeten die ermittelten Medianwerte der entsprechenden Immunglobulinklassen.	79

Abkürzungsverzeichnis

A _e	extrudierte Ackerbohnen
A _t	getoastete Ackerbohnen
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AOM	Azoxymethan
CD	Cluster of differentiation
Con A	Concanavalin A
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FSC-H	Forward Scatter
g	Erdbeschleunigung
I	Inulingruppe
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
K	Kontrollgruppe
KM	Körpermasse
LL	lower left
LR	lower right

Abkürzungsverzeichnis

ME	umsetzbare Energie
mEq	Milliequivalente
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
ml	Milliliter
M-Zellen	multifenestrated cells
n	Anzahl der gültigen Fälle
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
p.n.	post natum
p.p.	post partum
PRRS	Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome
PHA-M	Phythämagglutinin M
PWM	Pokeweed Mitogen
SSC-H	Sideward Scatter
TCR	T-Zell-Rezeptor
UL	upper left
UR	upper right

1. Einleitung

Die Entwicklung des körpereigenen Immunsystems ist für den Organismus von grundlegender Bedeutung, um sowohl einen sofortigen als auch langfristigen Schutz gegenüber Infektionserregern sicherzustellen. Die Aufnahme immunologisch wirksamer Komponenten mit dem Kolostrum in den ersten Lebensstunden ermöglicht im Sinne einer passiven Immunisierung einen temporären Immunschutz ohne eine entscheidende funktionelle und aktive Beteiligung neonataler Immunmechanismen. Aufgrund der mit zunehmendem Lebensalter eintretenden immunologischen Reifung kann eine Immunkompetenz entstehen, die mit zellulären und humoralen Effektorfunktionen spezifisch auf antigene Strukturen reagiert.

Potenzielle Immunmodulatoren aus der Nahrung könnten helfen, funktionelle und mechanistische immunologische Vorgänge zu unterstützen oder zu forcieren. Andererseits können Nahrungsfaktoren aufgrund ihrer antinutritiven Inhaltsstoffe negative Auswirkungen für den Organismus haben, möglicherweise auch durch eine Beeinflussung von Immunmechanismen. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, die immunmodulatorische Wirkung von Inulin, einem Polysaccharid aus der Gruppe der Fruktane, bei Ferkeln zu untersuchen. Studien an Mäusen, Ratten und Menschen lassen eine mögliche Aktivierung des Immunsystems durch den Einsatz von Inulin vermuten, Untersuchungen an Ferkeln liegen in diesem Zusammenhang jedoch nicht detailliert vor. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von getoasteten und extrudierten Ackerbohnen auf immunologische Parameter bei Ferkeln zu überprüfen. Unbehandelte Leguminosen enthalten eine Vielzahl antinutritiver Inhaltsstoffe, insbesondere Lektine und Protease-Inhibitoren. Durch den Einsatz mechanischer, hydrothermischer und hydrothermisch-mechanischer Behandlungsverfahren können die Gehalte an antinutritiven Inhaltsstoffen und somit die mit dem Verzehr der Leguminosen verbundenen negativen Auswirkungen für den Organismus deutlich reduziert werden. Die bisher durchgeführten Studien bei Ferkeln zur Untersuchung antinutritiver Inhaltsstoffe fokussieren sich auf Interaktionen in der Nährstoffresorption sowie auf Auswirkungen auf Leistungsparameter, Aspekte einer möglichen Interferenz mit immunologischen Modifikationen wurden hingegen bislang nur in einem geringen Umfang berücksichtigt.

Für die Interpretation möglicher Wirkungen von potenziellen Immunmodulatoren aus der Nahrung ist ein Verständnis des neonatalen und des sich entwickelnden Immunsystems grundsätzliche Voraussetzung. Schwerpunkt dieser Arbeit war es daher, zunächst zelluläre und humorale Immunparameter in unterschiedlichen Lebensstadien von Schweinen zu bestimmen, indem Milch- und Blutproben von Sauen sowie Blut- und Darmproben von Saug- und Absetzferkeln gewonnen und umfassend immunologisch definiert wurden. Dies ermöglichte eine präzise Beschreibung der immunologischen Entwicklung von Ferkeln und eine konsekutive Einschätzung der Wirkung von Inulin sowie getoasteten und extrudierten Ackerbohnen auf das Immunsystem von Ferkeln.

2. Literatur

2.1 Immunologische Entwicklung des Ferkels

Eine adäquate, altersentsprechende immunologische Reifung ist für die Gesundheit und Entwicklung des Ferkels von entscheidender Bedeutung. Im Kontext der funktionellen Immunabwehr sind sowohl das aktive als auch das passive Immunsystem zu berücksichtigen. Während die aktive Immunabwehr vom körpereigenen Immunapparat vermittelt wird, resultiert die passive Immunabwehr aus dem Transfer immunologischer Faktoren körperfremder Immunkapazitäten und unterliegt demnach spezifischen Restriktionen.

2.1.1 Aktive Immunabwehr

Die zellulären und humoralen Komponenten der aktiven Immunabwehr werden einer angeborenen, unspezifischen und einer adaptiven, spezifischen Funktion zugeordnet (Janeway et al., 2002; Tizard, 2009). Die erste Reaktion auf eine Invasion mit pathogenen Mikroorganismen ist zunächst unspezifisch. Effektorzellen sind Natürliche Killerzellen, Mastzellen, Makrophagen, Dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten (Jungi, 2000). Sie binden an für Mikroorganismen spezifische Oberflächenstrukturen (pathogenassoziierte molekulare Muster) mittels verschiedener Mustererkennungsrezeptoren und stimulieren auf diese Weise die Phagozytose der gebundenen Mikroorganismen sowie die Induktion weiterer zellulärer Mechanismen (Fraser et al., 1998; Saalmüller, 2006). Schließlich sezernieren die Effektorzellen des angeborenen Immunsystems als Reaktion auf eindringende Mikroorganismen verschiedene Zytokine und Chemokine, die, zusammen mit dem Komplementsystem, die humoralen Komponenten der angeborenen Immunabwehr darstellen und zugleich Funktionen des unspezifischen Immunsystems übernehmen und die Verbindung zum adaptiven Immunsystem herstellen (Janeway et al., 2002).

Das adaptive Immunsystem ermöglicht eine antigenspezifische Reaktion auf pathogene Mikroorganismen und einen in diesem Kontext langfristigen Immunschutz (Saalmüller, 2006; Gerner et al., 2009). Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem erfolgt die Immunantwort verzögert, weiterhin wird die Erkennung von Pathogenen nicht über pathogenassoziierte molekulare Muster, sondern über antigene Strukturen ermöglicht. Zu den zellulären Komponenten des adaptiven Immunsystems gehören T- und B-Lymphozyten, die humoralen Anteile werden durch die von den B-Zellen sezernierten Antikörper definiert (King et al., 2003). In Abhängigkeit von der Art des Antigens werden diese verschiedenen Funktionsbereiche aktiviert. Eine intrazelluläre Infektion (v.a. durch Viren) erfordert eine Destruktion der infizierten Körperzellen und wird von antigenspezifischen zytotoxischen T-Zellen ermöglicht. Zytotoxische T-Zellen stellen eine Subpopulation der T-Lymphozyten dar und sezernieren nach Antigen-Erkennung bioaktive Substanzen, die die infizierten Körperzellen zerstören (Gaskins und Kelley, 1995). Eine extrazelluläre Infektion, beispielsweise durch Bakterien, aktiviert hingegen T-Helferzellen, eine weitere Subpopulation der T-Lymphozyten. Diese sezernieren nach Antigen-Erkennung spezifische Lymphokine, welche wiederum antigenspezifische B-Zellen aktivieren und zur Proliferation und Differenzierung zu Plasmazellen stimulieren. Die von den Plasmazellen produzierten Antikörper können Pathogene opsonieren und über Komplement-vermittelte direkte

Zytotoxizität schließlich die Entfernung der pathogenen Agentien ermöglichen (Gaskins und Kelley, 1995).

Neben den zytotoxischen T-Zellen und den T-Helfer-Zellen bilden die regulatorischen T-Zellen eine weitere Subpopulation der T-Lymphozyten (Käser et al., 2008; Gerner et al., 2009). Sie besitzen immunsuppressive Funktionen, indem sie nach antigener Stimulation die Immunantwort von T-Helfer-Zellen unterdrücken können (Iijima et al., 2001; McGuirk und Mills, 2002). Das Vorkommen von regulatorischen T-Zellen könnte daher auch im Rahmen immunologischer Toleranz von Bedeutung sein (Bloom et al., 1992; Green und Webb, 1993; von Böhmer und Melchers, 2010; Wing und Sakaguchi, 2010).

Die Effektormechanismen des adaptiven Immunsystems sind prinzipiell mit denen des angeborenen Immunsystems vergleichbar, allerdings erfolgt die Erkennung pathogener Mikroorganismen nicht über spezifische Mustererkennungsrezeptoren, sondern über zwei Klassen von Oberflächenmolekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (major histocompatibility complex, MHC). Im Falle einer intrazellulären Infektion werden von den infizierten Körperzellen antigene Peptidfragmente über MHC-Klasse-I-Moleküle den zytotoxischen T-Zellen präsentiert. T-Helfer-Zellen erkennen hingegen nur antigene Peptide, die an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden sind. Diese befinden sich auf antigenpräsentierenden Zellen, die aufgenommenes Proteinantigen in Peptidfragmente zerlegen und dieses dann an der Oberfläche darbieten können. Zu den wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen gehören Makrophagen, dendritische Zellen und B-Lymphozyten (Janeway et al., 2002).

Durch die für die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems erforderlichen Erkennungsmechanismen wird eine antigenspezifische Immunantwort ermöglicht. Ein Lymphozyt trägt nur Antigenrezeptoren einer einzigen Spezifität, entsprechend wird er nur bei Erkennung eines kompatiblen Antigens aktiviert. Die Proliferation und Differenzierung der aktivierten Lymphozyten ruft Klone der Effektorzellen hervor (Theorie der klonalen Selektion, Burnet, 1959; Janeway et al., 2002). Die klonale Selektion von Lymphozyten ermöglicht auch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, das dazu führt, dass bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Antigen die adaptive Immunantwort schneller und effektiver erfolgt.

Die Ausbildung immunphänotypischer Oberflächenmoleküle (CD-Moleküle; Cluster of differentiation) ermöglicht eine Differenzierung der Immunzellpopulationen (Lunney, 1993; Saalmüller, 1996). So tragen T-Helfer-Zellen spezifisch CD4-Moleküle auf der Oberfläche (CD4⁺-Zellen) oder zytotoxische und T-Suppressorzellen CD8-Moleküle (CD8⁺-Zellen). Die CD-Moleküle können als Marker verwendet und durch die Bindung monoklonaler Antikörper nachgewiesen werden (Gerner et al., 2009).

2.1.2 Passive Immunabwehr

Die Präsenz körperfremder immunologischer Kompetenzen zur Vermittlung eines temporären Immunschutzes wird als passive Immunabwehr bezeichnet. Die Übertragung maternalen Antikörper und Immunzellen über das Kolostrum und über die Milch stellt ein in diesem Zusammenhang wichtiges Prinzip dar. Weiterhin ist es bei einigen Spezies (z.B. Meerschweinchen, Kaninchen) möglich, einen maternalen Immunschutz bereits durch den Transfer von Immunglobulinen (Ig) über die Plazenta zu erreichen. Artspezifische Besonderheiten der Plazentation schränken einen solchen Übertragungsweg jedoch ein oder

verhindern ihn. So ist ein Transfer maternaler Immunglobuline beim Schwein nicht möglich (Sterzl und Silverstein, 1967), wodurch einer ausreichenden Bereitstellung und Aufnahme immunologisch wirksamer Komponenten mit dem Kolostrum besonders hohe Bedeutung zukommt (King et al., 2003). Neben Immunglobulinen und Leukozyten werden Zytokine, Laktoferrin, Prolaktin und Nukleotide mit dem Kolostrum und der Milch bereitgestellt, die eine im Rahmen der unspezifischen Immunantwort unterstützende Funktion einnehmen (Filteau, 2001; King et al., 2003).

Auch bei der passiven Immunisierung wird ein vorübergehender Immunschutz erzielt. Die Injektion von Antikörpern oder eines Immuserums eines Spendertieres verleiht dem Empfängertier einen sofortigen, jedoch temporären Schutz gegen viele Infektionserreger oder Toxine. Die Aktivität der übertragenen Immunglobuline im Organismus des Empfängers stellt hierbei den limitierenden Faktor hinsichtlich der zu erwartenden Wirkungsdauer des Immunschutzes dar (Saalmüller, 2006).

Immunglobuline können über drei Mechanismen eine Immunität beziehungsweise Abwehr von Pathogenen vermitteln. Indem neutralisierende Immunglobuline an Pathogene binden, wird eine Invasion in Körperzellen verhindert. Weiterhin ist es möglich, dass opsonierende Antikörper nach Bindung an Pathogene die Phagozytose durch Effektorzellen des Immunsystems fördern. Der dritte Mechanismus besteht in einer Aktivierung des Komplementsystems, sodass die Opsonierung verstärkt und einige Bakterien direkt zerstört werden (Janeway et al., 2002). Der Isotyp der von den Plasmazellen synthetisierten Immunglobuline determiniert die Wirkungsweise der humoralen Immunantwort. Es werden die Isotypen G, A, M, E und D unterschieden. Naive B-Zellen exprimieren zunächst ausschließlich IgM und IgD, mit einem deutlich höheren Anteil an IgM. Aus diesem Grund können im Frühstadium einer Infektion vorrangig Immunglobuline der Klasse M im Plasma nachgewiesen werden (Butler et al., 2006). Durch einen Zytokin-vermittelten Klassenwechsel in der Synthese der Immunglobulinisotypen produzieren die Plasmazellen im Verlauf einer Immunantwort vermehrt IgG und IgA, sodass der Anteil an IgM im Plasma deutlich zurückgeht. Diese Änderungen im Verteilungsmuster der Immunglobulinklassen ermöglichen eine spezifische Immunabwehr von Pathogenen (Janeway et al., 2002). IgM-Moleküle weisen eine geringe Affinität für Pathogene auf, die jedoch durch eine insgesamt hohe Avidität kompensiert wird. Charakteristisch für diese Immunglobulinklasse ist eine effiziente Aktivierung des Komplementsystems, infolgedessen wird bereits im Rahmen der frühen Immunantwort eine umfassende Eliminierung pathogener Organismen oder Moleküle erreicht. Innerhalb der verzögerten Immunabwehr sind insbesondere Immunglobuline der Klassen G und A bedeutsam. IgG ermöglicht eine effiziente Opsonierung von Pathogenen für die Aufnahme durch Phagozyten sowie eine Aktivierung des Komplementsystems. Im Gegensatz dazu wirkt IgA überwiegend als neutralisierender Antikörper an Schleimhaut- und Körperoberflächen. Immunglobuline vom Isotyp E befinden sich vornehmlich auf Mastzellen und induzieren bei Aktivierung eine Freisetzung von Mediatoren dieser Effektorzellen. Auf diese Weise werden Reaktionen wie Husten, Niesen oder Erbrechen ausgelöst und die pathogenen Erreger oder Partikel dadurch aus dem Körper eliminiert. IgD wird auf der Oberfläche von den meisten reifen B-Zellen exprimiert, jedoch nur in einem geringen Umfang sezerniert. Die immunologische Funktion dieser Immunglobulinklasse ist bislang ungeklärt.

2.1.3 Darmassoziiertes lymphatisches Gewebe

Etwa 25 % der intestinalen Mukosa werden von lymphatischem Gewebe gebildet (Kagnoff, 1987). Das darmassoziierte Gewebe umfasst Lymphaggregate (Peyersche Platten, solitäre Lymphfollikel), diffuses lymphoretikuläres Gewebe (intraepitheliale Leukozyten, Leukozyten der Lamina propria) sowie die mesenterialen Lymphknoten (Langkamp-Henken et al., 1992; Pabst und Rothkötter, 1999).

Peyersche Platten stellen Lymphaggregate in der Mukosa und Submukosa des Dünndarms dar. Sie sind vom Darmlumen durch das Follikel-assoziierte Epithel separiert, welches spezialisierte Epithelzellen (multifenestrated cells, M-Zellen) für die Antigenaufnahme und den Antigentransport zu den immunologischen Effektorzellen der Peyerschen Platten enthält. Die zellulären Komponenten der Peyerschen Platten sind durch T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen, naive B-Zellen, Plasmazellen, Makrophagen und dendritische Zellen definiert (Langkamp-Henken et al., 1992). Nach Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen werden B-Zellen zur Produktion von IgA stimuliert (Langkamp-Henken et al., 1992; Kagnoff, 1993), zudem verlassen aktivierte Lymphozyten über die mesenterialen Lymphknoten die Peyerschen Platten, gelangen über den Ductus thoracicus in den Blutkreislauf und schließlich wieder spezifisch zurück in die Lamina propria und in intraepitheliale Regionen des Darms (Langkamp-Henken et al., 1992; Kagnoff, 1993; DeWitt und Kudsk, 1999).

Solitäre Lymphfollikel finden sich in allen Abschnitten des Darms, vorrangig in den Bereichen des Kolons und Rektums. Sie sind funktionell mit den Peyerschen Platten vergleichbar (Laissue und Gebbers, 1992).

Die Lamina propria ist immunologisch durch das Vorhandensein von T- und B-Lymphozyten, Plasmazellen, Mastzellen und Makrophagen charakterisiert (Langkamp-Henken et al., 1992). Die T-Lymphozyten nehmen vornehmlich T-Helferzellfunktionen ein (MacDonald, 2003), etwa 90 % der Plasmazellen produzieren IgA (Laissue und Gebbers, 1992). Hiervon wird der überwiegende Anteil in Form von sekretorischem IgA in das Darmlumen sezerniert und wirkt insbesondere einer Adhäsion von intestinalen Pathogenen entgegen (Kagnoff, 1993). Intraepitheliale Lymphozyten befinden sich zwischen den Epithelzellen des mukosalen Epithels und stehen daher in kontinuierlichem Kontakt mit luminalem Antigen. Sie werden überwiegend durch CD8⁺-Zellen repräsentiert, die über immunregulatorische und immunsuppressive Mechanismen zur Aufrechterhaltung oraler Toleranz gegenüber nicht-invasiven Antigenen beitragen und gleichzeitig einen ersten Schutz gegenüber Pathogenen ermöglichen (Abreu-Martin und Targan, 1996; Iijima et al., 2001; MacDonald, 2003).

2.1.4 Besonderheiten des porcinen Immunsystems

Das porcine Immunsystem weist sowohl anatomisch als auch funktionell einige Besonderheiten auf, die bei der Untersuchung und Interpretation immunologischer Parameter zu berücksichtigen sind.

Anatomische Besonderheiten

Anatomisch beachtenswert ist der reverse Aufbau der Lymphknoten und der damit assoziierte Lymphfluss beim Schwein. Die Lymphknoten vom Typus normalis anderer Haussäugetiere besitzen ein peripheres Rindenparenchym und ein zentrales Markgewebe (Nickel et al., 1996).

Die Lymphe gelangt über afferente Lymphgefäße zunächst in einen Randsinus des Rindenparenchyms und wird anschließend über Intermediärsinus in einen zentralen Marksinus entlassen. Efferente Lymphgefäße verlassen über den Hilus schließlich den Lymphknoten. Im Gegensatz dazu besitzt der porcine Lymphknoten vom Typus inversus ein zentrales Rindenparenchym und ein peripheres Markgewebe (Nickel et al., 1996; König und Liebich, 2005). Die afferenten Lymphgefäße treten über den Hilus des Lymphknotens ein und ergießen die mitgeführte Lymphe in eine zentrale Zisterne. Von dort wird die Lymphe über die Sinus und weiter über efferente Gefäße aus dem Lymphgewebe direkt in die Blutbahn geführt (Pabst, 1987). Funktionell betrachtet erfolgt im Lymphknoten vom Typus normalis aufgrund des Lymphflusses eine Einteilung des Lymphgewebes in Sektoren, wohingegen im Lymphknoten vom Typus inversus eine Mischung der zugeführten Lymphe in der zentralen Zisterne sowie eine nachfolgende Verbreitung über das gesamte Lymphgewebe erfolgt (Nickel et al., 1996).

Immunzellen

Porzine T-Zellen unterscheiden sich charakteristisch in ihren Eigenschaften und ihrem Vorkommen von den Immunzellen anderer Säugetiere. Sie werden nach Ausbildung des T-Zell-Rezeptors in $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen unterteilt (Yang und Parkhouse, 1996; Charerntantanakul und Roth, 2007).

Die $\alpha\beta$ -T-Zellen bilden vier Subpopulationen aus: $CD4^+CD8^-$ (naive T-Helferzellen), $CD4^+CD8^{low}$ (T-Gedächtniszellen), $CD4^-CD8^{high}$ (zytotoxische T-Zellen) und $CD4^-CD8^{low}$ (bislang nicht geklärte Funktion). Die Subpopulationen zeigen im Blut und im lymphatischen Gewebe ein differierendes Verteilungsmuster, ebenso liegen meist altersabhängige Verschiebungen in den Zellgehalten vor (Tabelle 1).

Naive T-Helfer-Zellen erkennen Antigene über MHC-II-Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen und exprimieren nach Aktivierung CD8- und MHC-II-Moleküle (Saalmüller et al., 1991, 2002; Summerfield et al., 1996; Zuckermann und Husmann, 1996). Durch die Ausbildung dieser Moleküle haben sich die naiven T-Zellen zu T-Gedächtniszellen umgewandelt (Summerfield et al., 1996; Zuckermann und Husmann, 1996; Haverson et al., 1999; Saalmüller et al., 2002). Eine Expression von CD8-Molekülen auf $CD4^+$ -Zellen nach antigener Stimulation wurde bislang nur bei intraepithelialen Lymphozyten von Ratten beobachtet, wobei die Ausbildung jedoch transient war (Takimoto et al., 1992). Das Vorhandensein von $CD4^+CD8^{low}$ -Zellen ist für Schweine spezifisch, bei anderen Tierarten finden sich hingegen lediglich $CD4^+CD8^+$ im Thymus (Pescovitz et al., 1985; Saalmüller et al., 1987, 1989, 1991). Die thymalen $CD4^+CD8^+$ -Zellen des Schweins differenzieren sich bereits ab dem 70. Tag der Trächtigkeit zu $CD4^+CD8^-$ oder $CD4^-CD8^+$ -Zellen (Sinkora et al., 2000).

Porzine $CD4^-CD8^{high}$ - und $CD4^-CD8^{low}$ -Zellen werden allgemein als $CD4^-CD8^+$ -Zellen zusammengefasst, bislang konnte jedoch nur für die $CD4^-CD8^{high}$ -Zellen eine zytotoxische Aktivität nachgewiesen werden (Pescovitz et al., 1985; Zuckermann et al., 1990; Martins et al., 1993; Saalmüller und Bryant, 1994; Saalmüller et al., 1994; Pauly et al., 1996; Yang und Parkhouse, 1997), die Funktion der $CD4^-CD8^{low}$ -Zellen ist nicht vollständig geklärt.

Die $\gamma\delta$ -T-Zellen repräsentieren die größte Subpopulation der T-Zellen im Blut junger Ferkel, ihre Anzahl sinkt jedoch mit zunehmendem Alter der Tiere (Binns et al., 1992; Yang und Parkhouse, 1996). Es lassen sich zwei Subpopulationen der $\gamma\delta$ -T-Zellen differenzieren: $CD2^+$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen und $CD2^-$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen.

$CD2^+$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen finden sich überwiegend in der Milz und in geringeren Anteilen in den Lymphknoten und Tonsillen (Yang und Parkhouse, 1996). Sie exprimieren MHC-II- und CD80/CD86-Co-stimulierende Moleküle und sollen daher antigenpräsentierende Funktionen übernehmen (Takamatsu et al., 2002). Eine Subpopulation der $CD2^+$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen, $CD2^+CD4^-$

CD8^{lo}- $\gamma\delta$ -T-Zellen, weist zudem zytotoxische Aktivitäten auf (Grimm et al, 1993; Pauly et al., 1996; Yang und Parkhouse, 1997; De Bruin et al., 2000). Diese ist antigenunspezifisch und nicht-MHC-restringiert (Saalmüller et al., 1994; Pauly et al., 1996).

Die Funktion porciner CD2⁻- $\gamma\delta$ -T-Zellen ist bislang nur unzureichend bekannt, da sie jedoch nicht durch Antigene oder Mitogene stimuliert werden (Hammerberg und Schurig, 1986; Binns, 1994), übernehmen sie möglicherweise keine immunologischen Effektorfunktionen.

Tabelle 1: Funktion und Verteilung der porzinen T-Lymphozyten im Blut und im peripheren lymphatischen Gewebe (peripheral lymphoid tissues, pLT). Angaben in % der detektierten Lymphozyten in der durchflusszytometrischen Bestimmung.

Lymphozyten, %	Funktion	Blut	pLT	Literatur
$\alpha\beta$-T-Zellen				
CD4 ⁺ CD8 ⁻	Naive T-Helferzellen	3-14 ¹	9-30 ¹	Yang und Parkhouse, 1996; Zuckermann und Husmann, 1996
CD4 ⁺ CD8 ^{low}	T-Gedächtniszellen	2-5 ²	3-13	Lunney und Pescovitz, 1987; Salmüller et al., 1987; Yang und Parkhouse, 1996; Zuckermann und Husmann, 1996
CD4 ⁻ CD8 ^{high}	Zytotoxische T-Zellen	7-28 ¹	5-32	Yang und Parkhouse, 1996; Zuckermann und Husmann, 1996
CD4 ⁻ CD8 ^{low}	Bislang nicht geklärte Funktion			
$\gamma\delta$-T-Zellen				
CD2 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻	Antigenpräsentierende Funktionen	~1	0,2-13 ³	Yang und Parkhouse, 1996
CD2 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ^{low}	Antigenpräsentierende Funktionen, zytotoxische Aktivität	~2	1-9 ³	Yang und Parkhouse, 1996
CD2 ⁻ CD4 ⁻ CD8 ⁻	Bislang nicht geklärte Funktion	15-25	1-4	Yang und Parkhouse, 1996

¹leichter Anstieg mit zunehmendem Lebensalter der Tiere; ²starker Anstieg mit zunehmendem Lebensalter der Tiere; ³deutlich höhere Gehalte in der Milz als in den Tonsillen und Lymphknoten (Yang und Parkhouse, 1996)

Immunglobuline

Ogleich der Immunglobulin-vermittelte Immunschutz bei neugeborenen Ferkeln aus einer Aufnahme von Kolostrum in den ersten Stunden post natum resultiert, finden sich bereits im fetalen Serum Immunglobuline der Klassen G, A und M (Butler et al., 2001). Aufgrund der insgesamt sowohl absolut als auch relativ zu den anderen Immunglobulinklassen hohen Gehalte an IgG im Kolostrum dominiert dieser Immunglobulinisotyp auch im Serum junger Ferkel (Butler et al., 2009). Nach Schluss der Darmbarriere findet eine deutliche Verschiebung der Immunglobulingehalte in der Milch statt, indem IgA als vorherrschender Isotyp nachzuweisen ist und IgG nur noch in geringen Mengen vorliegt (Butler et al., 2006; Butler et al., 2009). Parallel zu diesen Vorgängen können auch im Serum der Sauen im Verlauf der Laktation Änderungen hinsichtlich des Vorkommens der verschiedenen Immunglobulinklassen festgestellt werden, mit einer Reduktion der relativen Anteile von IgG und IgM und einer Zunahme an IgA (Klobasa et al., 1987; Butler et al., 2009). Insgesamt variiert das Verteilungsmuster der Immunglobuline im Serum, Kolostrum und in der Milch in Abhängigkeit vom Alter der Tiere beziehungsweise vom Laktationsstadium (Tabelle 2).

Immunologische Qualitäten der Sauenmilch

Die epitheliochoriale Plazenta beim Schwein verhindert einen Transfer maternaler Immunglobuline auf den Fötus während der Trächtigkeit (Sterzel und Silverstein, 1967), sodass das Ferkel agammaglobulinämisch geboren wird (Salmon, 1984; Salmon et al., 2009). Die transiente Fähigkeit des Dünndarmepithels, Immunglobuline, Immunzellen und weitere immunologisch wirksame Komponenten aus dem Kolostrum zu resorbieren, ist daher für die Ausbildung einer passiven Immunabwehr des Neugeborenen unbedingt erforderlich. Die Möglichkeit einer intestinalen Resorption von Makromolekülen ist bis maximal 48 Stunden post partum beschrieben (Murata und Namioka, 1977; Weström et al., 1984), anschließend vermitteln die mit der Sauenmilch aufgenommenen immunologischen Komponenten im Darm einen lokalen Immunschutz (King et al., 2003).

Mit dem Schluss der Darmbarriere nach 48 Stunden verändert sich auch die immunologische Zusammensetzung der Sauenmilch (King et al., 2003). Im Kolostrum finden sich vorherrschend Immunglobuline vom Isotyp G, wohingegen die Immunglobuline der Klassen A und M in deutlich geringeren Konzentrationen vorliegen (Bourne und Curtis, 1973). Im Laufe der Laktationsperiode sinkt der absolute Gehalt an Immunglobulinen, zudem verschieben sich die relativen Anteile, sodass IgA prädominiert (Jensen und Pedersen, 1979; Stokes et al., 1992; Butler und Brown, 1994; Salmon, 1999; Berthon et al., 2000). Diese Veränderungen in der Milchzusammensetzung sind von unmittelbarer Bedeutung für die lokale Immunabwehr im Intestinaltrakt der Saugferkel. Aufgrund der limitierten intestinalen Wirksamkeit von IgG (Gaskins und Kelley, 1995; Gaskins, 1998) übernimmt insbesondere IgA wichtige immunologische Funktionen, da dieser Isotyp relativ resistent gegenüber digestiven oder bakteriellen Enzymen ist (Kerr, 1990) und daher Antigene binden und die Ansiedlung von pathogenen Mikroorganismen verhindern beziehungsweise einschränken kann (Porter, 1986; Kagnoff, 1993; Salmon, 1999).

Die Herkunft der Immunglobuline differiert, etwa 70 % der Immunglobuline vom Isotyp G und mehr als 90 % von IgA und IgM werden lokal in der Milchdrüse synthetisiert (Bourne und Curtis, 1973), konsekutiv stammt ein im Vergleich zu IgA und IgM deutlich höherer Anteil an IgG aus dem Blut. Die Veränderungen im relativen und absoluten Immunglobulingehalt der Sauenmilch im Laufe der Laktation implizieren demnach auch ein verändertes Rekrutierungsmuster, mit einem deutlichen Schwerpunkt in der lokalen Synthese von Immunglobulinen in der Milchdrüse (Stokes et al., 1992; Salmon, 1999).

Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass Immunglobuline aus der Sauenmilch auch nach Schluss der Darmbarriere zu einem geringen Anteil resorbiert werden (Butler et al., 1981;

Stirling et al., 2005) und somit möglicherweise auch weiterhin partiell systemische Wirkungen erzielen könnten.

Zu den zellulären Komponenten der Sauenmilch zählen polymorphkernige neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen und Epithelzellen, die Anzahl der jeweiligen Zellfraktionen ist abhängig vom Entwicklungsstadium der Milchdrüse und anderen individuellen Einflussfaktoren (Salmon et al., 2009). Etwa 26 % der kolostralen Zellen sind Lymphozyten (Evans et al., 1982), mit einem geringeren Anteil an B-Lymphozyten (etwa 30 %) als an T-Lymphozyten (Schollenberger et al., 1986 a,b). Im Laufe der Laktation verändert sich dieses Muster. Der Gehalt an Lymphozyten beträgt etwa 10 % (Magnusson et al., 1991; Lee et al., 1983), Epithelzellen (31 %), kernlose Zellfragmente und neutrophile Granulozyten (47 %), eosinophile Granulozyten (1 %) und Makrophagen (9 %) repräsentieren den überwiegenden Zellanteil in der Sauenmilch (Schollenberger et al., 1986 a,b). Die für eine Immunantwort relevanten Zellen befinden sich sowohl in der Trächtigkeit als auch während der Laktationsperiode im Milchdrüsenparenchym (Salmon, 1987; Chabaudie et al., 1993; Magnusson, 1999). Zelluläre und humorale Faktoren führen zu einer Rekrutierung von Lymphozyten während der Trächtigkeit (Salmon et al., 2009), sodass die Immunzellen während der Laktationsperiode in das Kolostrum beziehungsweise in die Milch sezerniert werden können (Riedel-Caspari, 2001). Die durch einen Estrogen-abhängigen Faktor (estrogen-responsive element, ERE; Sampaio et al., 1995) induzierte Expression von vaskulärem MAdCAM-1, einem Adressin, ermöglicht die Bindung von T-Lymphozyten über ihren Homing-Rezeptor $\alpha 4\beta 7$ -Integrin. Für die Extravasation von B-Lymphozyten und IgA-Plasmazellen wird zudem noch ein zusätzlicher chemotaktischer Faktor benötigt (Salmon et al., 2009). Sowohl die T- als auch die B-Lymphozyten stammen aus dem darmassoziierten lymphatischen Gewebe (Roux et al., 1977; Bourges et al., 2008), sodass ein enteromammärer Kreislauf definiert wird (Salmon et al., 2009).

Schließlich vermittelt die Sauenmilch durch weitere immunologisch oder antimikrobiell wirksame Komponenten einen unspezifischen Immunschutz. Hierzu zählen insbesondere Laktoferrin, Lysozym, Transferrin, Zytokine, Prolaktin und Nukleotide (Filteau, 2001; King et al., 2003; Salmon et al., 2009).

Literatur

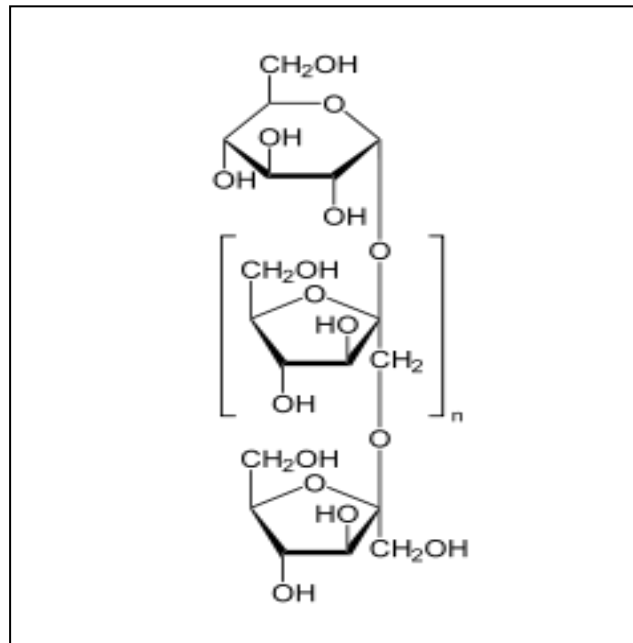
Tabelle 2: Verteilung und Konzentration der Immunglobuline (Ig) im Serum, Kolostrum und in der Milch von Ferkeln und Sauen. Angaben in µg/ml (Fetus) beziehungsweise mg/ml (Ferkel, Sauen).

Probenahme	Probe	IgG	IgA	IgM	Literatur
Fetus/Ferkel					
Fetus, 90. Trächtigkeitstag	Serum	3,65	0,27	0,57	Butler et al., 2001; Butler et al., 2009
Ferkel, neugeboren	Serum	33,9	2,1	0,83	Butler et al., 2009
Ferkel, eine Woche p.n.	Serum	36	9,1	2,9	Butler et al., 2009
Ferkel, fünf Wochen p.n.	Serum	7,5	0,6	2,2	Butler et al., 2009
Sau					
Sau, 60. Trächtigkeitstag	Serum	35	1,3	6,5	Klobasa et al., 1985; Butler et al., 2009
Sau, Tag des Abferkelns	Serum	26	1,8	5,0	Klobasa et al., 1985; Butler et al., 2009
Sau, Tag des Abferkelns	Kolostrum	95	21,2	9,1	Klobasa et al., 1985; Butler et al., 2009
Sau, drei Wochen p.p.	Serum	32	2,2	3,5	Butler et al., 2009
Sau, drei Wochen p.p.	Milch	0,9	5,3	1,4	Butler et al., 2009

2.2 Inulin

2.2.1 Chemische Struktur und Vorkommen

Inulin ist ein Gemisch aus kurzen und mittellangen Ketten von β -D-Fruktosanen mit einem Polymerisationsgrad von bis zu 70 Monosaccharideinheiten (Gibson und Roberfroid, 1995; Roberfroid, 1997; Niness, 1999). Inulin gehört zu der Gruppe der Fruktane, die per definitionem dadurch gekennzeichnet sind, dass an ein Saccharosemolekül ein oder mehrere Fruktosemoleküle gebunden sind. Im Falle des Inulins sind die Fructofuranosyleinheiten β -(2 \rightarrow 1) glykosidisch verknüpft, mit einem Glucopyranosemolekül am nicht-reduzierenden Ende, welches mit der Fructofuranose α -(2 \rightarrow 1) glykosidisch verbunden ist. Weitere Glukose-Reste liegen in 1,3-Bindung auch innerhalb der Kette vor (Lehmann, 1996). Abbildung 1 zeigt die chemische Struktur des Inulins auf und verdeutlicht die glykosidischen Bindungen zwischen den Monosacchariden. In der Strukturformel gibt n den Polymerisationsgrad oder die Anzahl an D-Fructofuranose an. Bei einem Polymerisationsgrad von unter 9 wird von Oligofruktose, ansonsten von Inulin gesprochen (Roberfroid, 2005).



Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Inulin>

Abbildung 1: Chemische Struktur des Inulins.

Inulin wird in vielen Pflanzen als Reservestoff eingelagert, beispielsweise in Zichorien, Artischocken, Weizen, Roggen oder Gerste (Watzl et al., 2005). Für die industrielle Herstellung wird es vorrangig aus der Artischocke (*Helianthus tuberosus*) oder der Zichorie (*Cichorium intybus*) gewonnen (Debruyn et al., 1992; Kaur und Gupta, 2002).

2.2.2 Eigenschaften und Bedeutung

Inulin wird aufgrund seiner technologischen (Fett- und Stärkeersatz, Verbesserung des Geschmacks und der Textur; Franck, 2002) und funktionellen Eigenschaften (Verbesserung der Mineralstoffabsorption, Interaktion mit der Fettverdauung, Einfluss auf die Darmgesundheit; van Loo et al., 1999) sowohl in der Futtermittel- als auch in der Lebensmittelindustrie eingesetzt.

Die β -(2→1) glykosidischen Bindungen verhindern einen Abbau durch körpereigene Enzyme (Bach Knudsen und Hessov, 1995; Ellegård et al., 1997; Macfarlane und Cummings, 1999), sodass Inulin beim Menschen und einigen Tierarten einem hydrolytischen Abbau im Dünndarm entgeht und erst im Dickdarm mikrobiell fermentiert wird (Nilsson und Bjorck, 1988; Houdijk et al., 2002; Gibson et al., 2004).

Verschiedene Studien konnten einen bifidogenen Effekt von Inulin im Dickdarm nachweisen (Shimoyama et al., 1984; Hidaka et al., 1986; Mitsuoka, 1986; Sanno, 1986; Takahashi, 1986; Mitsuoka et al., 1987; Bouhnik et al., 1994; Gibson und Wang, 1994; Kleessen et al., 1994; Gibson et al., 1995; Gibson und Roberfroid, 1995; Roberfroid et al., 1995; Djouzi und Andrieux, 1997; Menne et al., 1997; Roberfroid et al., 1998; Cummings et al., 2001), mit einem konsekutiven Anstieg kurzkettiger Fettsäuren (Schneeman, 1999; Delzenne, 2003). Bifidobakterien werden als vorteilhaft für die Förderung der Gesundheit angesehen, indem sie das Wachstum pathogener Bakterien im Darm hemmen, den intestinalen pH-Wert durch die Produktion von Fettsäuren senken, Vitamine synthetisieren, und Immunantworten stimulieren können (Gibson und Roberfroid, 1995; Kolida et al., 2002).

Die genannten Eigenschaften definieren Inulin als ein potenzielles Präbiotikum. Präbiotika sind „*Nicht verdaubare Nahrungsbestandteile, die ihren Wirt günstig beeinflussen, indem sie das Wachstum und/oder die Aktivität einer oder mehrerer Bakterienarten im Dickdarm gezielt anregen und somit die Gesundheit des Wirts verbessern*“ (Gibson und Roberfroid, 1995). Dies impliziert, dass die potenziell präbiotisch wirksamen Substanzen nicht vom Wirtsorganismus hydrolysiert oder absorbiert werden dürfen, sondern in den Dickdarm gelangen, um dort das Wachstum und die metabolische Aktivität bestimmter Bakterien zu begünstigen und dadurch eine gesundheits- und/oder leistungssteigernde Wirkung für den Organismus zu erzielen.

Unter Berücksichtigung dieser Begriffsbestimmung ist die Einordnung von Inulin beim Schwein problematisch. Es wurde gezeigt, dass Inulin weitgehend im Dünndarm abgebaut wird (Houdijk et al., 1999; Branner et al., 2004; Böhmer et al., 2005), eine andere Studie beschreibt hingegen das Zäkum als Hauptort der Fermentation (Yasuda et al., 2007). Ein mikrobieller Abbau von Inulin im porzinen Dickdarm, insbesondere im Kolon, scheint demnach aufgrund der widersprüchlichen Angaben in der Literatur fraglich und ermöglicht keine eindeutige Zuordnung im Kontext präbiotischer Wirkmechanismen. Davon unabhängig werden beim Schwein durch Inulin hervorgerufene Effekte beschrieben.

Wirkungen von Inulin beim Schwein

Einige Studien konnten beim Schwein, ebenso wie beim Menschen oder bei der Ratte, eine Beeinflussung der intestinalen Mikrobiota durch Inulin im Sinne einer Förderung von Bifidobakterien belegen (Howard et al., 1993; Klein Gebbink et al., 2001), wohingegen in einer anderen Untersuchung keine Veränderungen der mikrobiellen Populationen im Intestinaltrakt nachgewiesen wurden (Farnworth et al., 1992). *In vitro* zeigte sich eine geringere mukosale Adhäsion pathogener coliformer Bakterien bei Zugabe von 5 % Inulin zum Inokulum (Rossi et al., 2001).

Der Einfluss von Inulin auf die Nährstoffverdaulichkeit, -verfügbarkeit und -retention wurde in mehreren Studien untersucht, die Ergebnisse zeigen jedoch nur wenige Interaktionen auf.

Houdijk et al. (1999) sowie De Schrijver und De Vos (2003) konnten keinen Einfluss auf die Proteinverdaulichkeit oder Stickstoffretention nachweisen. Die scheinbare ileale und fäkale Absorption wurde durch den Einsatz von Inulin reduziert, während die scheinbare fäkale Absorption von Zink anstieg (Vanhoof und De Schrijver, 1996). De Schrijver und De Vos (2003) konnten hingegen keine Beeinflussung der Protein- und Nährstoffverdaulichkeit feststellen.

Auch hinsichtlich einer verbesserten Körpermassenzunahme der Tiere, die Inulin erhielten, werden differierende Ergebnisse berichtet. Während Farnworth et al. (1992) keine Beeinflussung der täglichen Körpermassenzunahme und Futteraufnahme feststellen konnten, zeigten die Ferkel, die Inulin erhielten, in einer Studie von He et al. (2002) gesteigerte tägliche Körpermassenzunahmen sowie eine verbesserte Futtermittelverwertung.

Die Wirkung von Inulin auf immunologische Parameter beim Schwein wurde bislang noch nicht detailliert untersucht, obgleich Studien bei anderen Tierarten eine Beeinflussung sowohl des intestinalen als auch des systemischen Immunsystems aufzeigen konnten.

2.2.3 Wirkungen auf das Immunsystem

Die immunmodulatorische Wirkung von Inulin wurde insgesamt nur wenig untersucht, dennoch lassen erste Ergebnisse einen Einfluss auf die Immunabwehr vermuten. So erhielten Mäuse ein Kontrollfutter mit Zellulose beziehungsweise ein Versuchsfutter mit 10 % Inulin oder 10 % Oligofruktose und wurden anschließend verschiedenen enterischen und systemischen Pathogenen sowie Tumorinduktoren ausgesetzt (Buddington et al., 2002). Die Verabreichung der Fruktane führte zu keiner herabgesetzten Inzidenz für Lungentumoren nach Injektion von B16F10 Tumorzellen, jedoch wiesen diese Tiere reduzierte karzinogeninduzierte aberrierende Bereiche im distalen Kolon auf. Die Wissenschaftler haben in einer Folgestudie die immunmodulatorischen Wirkungen von Inulin und Oligofruktose näher untersucht (Kelly-Quagliana et al., 2003). Mäuse erhielten erneut ein Kontrollfutter mit Zellulose beziehungsweise ein Versuchsfutter mit 10 % Inulin oder Oligofruktose. Nach sechs Wochen konnte bei den Tieren beider Versuchsgruppen eine erhöhte NK-Zell-Aktivität in der Milz sowie eine gesteigerte Phagozytoseaktivität peritonealer Makrophagen nachgewiesen werden.

In einer Studie mit F344-Ratten wurde die durch Azoxymethan (AOM) induzierte Kolonkarzinogenese untersucht (Femia, et al., 2002). Tiere, die Inulin oder Oligofruktose erhielten, zeigten eine reduzierte Inzidenz für Kolonkarzinome und wiesen seltener Kolorektaltumoren auf. Als Wirkmechanismus ist eine gesteigerte NK-Zell-Aktivität denkbar, da gezeigt wurde, dass einer AOM-vermittelten Depression dieser Effektorzellen durch die Gabe von mit Oligofruktose angereichertem Inulin entgegengewirkt wurde (Roller et al., 2004a).

Eine Aktivierung des Immunsystems durch mit Oligofruktose angereichertes Inulin (10 % in der Diät) konnte in mehreren Studien gezeigt werden. In F344-Ratten wurde in einem vierwöchigen Versuch die Produktion von sekretorischem IgA im Zäkum stimuliert sowie ex vivo eine erhöhte Sekretion von Interleukin-10 (IL-10) der Lymphozyten aus den Peyerschen Platten beobachtet (Roller et al., 2004b). In einer 33 Wochen andauernden Studie wurde die Entwicklung von Kolonkarzinomen durch die Injektion von AOM induziert. Auch in diesen Tieren war die Produktion von IL-10 durch Lymphozyten der Peyerschen Platten erhöht,

zudem zeigten die Tiere der Versuchsgruppe ein signifikant geringeres Auftreten von Kolonkarzinomen und -adenomen (Roller et al., 2004a).

In einer anderen Studie wurden Kolitiden durch Dextranatriumsulfat bei Sprague-Dawley-Ratten induziert (Osman, 2006). Die Tiere erhielten vor und nach der Kolitisinduktion ein Kontrollfutter oder ein Futter mit Oligofruktose beziehungsweise Inulin. Im Kolongewebe der Tiere aus den Fruktangruppen wurde eine verringerte Produktion an IL-1 β ermittelt, einhergehend mit einer reduzierten Myeloperoxidase-Aktivität im Kolon und einer signifikant geringeren Anzahl intestinaler Bakterien in den mesenterialen Lymphknoten.

Aus Schweinen, die über drei Wochen ein Futter mit 2 % eines mit Oligofruktose angereicherten Inulins (Inulingruppe) beziehungsweise mit Maltodextrin (Kontrollgruppe) erhielten, wurden aus dem distalen Jejunum intraepitheliale Lymphozyten isoliert und mit Mitogenen stimuliert (Girrbach et al., 2005). Die intraepithelialen Lymphozyten der Inulingruppe produzierten signifikant mehr IL-10 als die Effektorzellen der Kontrollgruppe.

Schließlich beschreiben zwei Studien eine durch Fruktooligosaccharide hervorgerufene Veränderung der zellulären Zusammensetzung der Peyerschen Platten von Mäusen im Sinne eines Anstiegs der B-Lymphozyten (Hosono et al., 2003; Manhart, 2003).

Wirkmechanismen

Für die Interpretation der in den durchgeführten Untersuchungen festgestellten immunmodulatorischen Wirkungen von Inulin sind drei mögliche Wirkmechanismen denkbar (Watzl et al., 2005). Einerseits könnte die bifidogene Wirkung von Inulin (Gibson et al., 1995; Howard et al., 1995; Bouhnik et al., 1999) zu einer Aktivierung des Immunsystems führen. Eine Verschiebung der Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora verändert die Ausbildung pathogenassoziierter molekularer Muster wie Endotoxine, Lipopolysaccharide oder Teichonsäure (Akira et al., 2001). Die Erkennung dieser Muster über Toll-like-Rezeptoren durch Effektorzellen des Immunsystems stimuliert die Freisetzung von Zytokinen (Abreu, 2003; Cherayil, 2003). Weiter wurde gezeigt, dass die Ingestion von Bifidobakterien mit einem Anstieg von IgA im Dünndarm und in den Fäzes sowie mit einer gesteigerten IgA-Synthese *ex vivo* durch B-Zellen der Peyerschen Platten assoziiert ist (Takahashi et al., 1998; Fukushima et al., 1999; Qiao et al., 2002). Die selektive Förderung bestimmter Bakterien, insbesondere von Bifidobakterien, durch Inulin scheint demnach einen potenziellen Mechanismus für die immunmodulatorische Wirkung von Inulin darzustellen.

Ein weiterer möglicher Wirkmechanismus besteht in einer Inulin-induzierten gesteigerten mikrobiellen Produktion kurzkettiger Fettsäuren im Dickdarm. Ein Anstieg an kurzkettigen Fettsäuren kann zu einer Aktivierung des lokalen Immunsystems führen. So zeigten Ratten im Rahmen einer parenteralen Ernährung mit Zusatz kurzkettiger Fettsäuren eine signifikant erhöhte NK-Zell-Zytotoxizität im Vergleich zu den Tieren, die keinen Zusatz an kurzkettigen Fettsäuren erhielten (Pratt et al., 1996). Eine intravenöse Applikation pharmakologisch wirksamer Dosen von Azetat hat ebenfalls die NK-Zell-Zytotoxizität gesteigert (Ishizaka et al., 1993). Die durch Inulin induzierte erhöhte intestinale Synthese kurzkettiger Fettsäuren vermag daher Leukozyten im darmassozierten lymphatischen Gewebe zu aktivieren (Bach Knudsen et al., 2003).

Der dritte potenzielle Wirkmechanismus liegt in einer möglichen Interaktion zwischen Inulin und einem Kohlenhydratrezeptor auf der Oberfläche von Leukozyten. Es konnte bereits für spezifische Rezeptoren eine Wechselwirkung mit Kohlenhydraten aus der Nahrung nachgewiesen werden. Dies betrifft den Komplement-Rezeptor 3 (CD11b/CD18; Ross und Větvicka, 1993), den β -Glukan-Rezeptor Dectin-1 (Brown und Gordon, 2001; Herre et al., 2004), spezifische Lektin-ähnliche Rezeptoren (Murosaki et al., 1999) und Mannose-Rezeptoren (Herre et al., 2004). Die Erkennung spezifischer Kohlenhydratstrukturen führt zu einer Stimulation immunologischer Effektormechanismen, sodass die potenzielle Präsenz

eines Fruktose-Rezeptors die durch Inulin induzierten immunmodulatorischen Wirkungen begründen könnte.

2.3 Antinutritive Substanzen in Leguminosen

2.3.1 Definition und Vorkommen

Unter dem Begriff antinutritive Substanzen werden Inhaltsstoffe in Pflanzen mit nachteiligen Wirkungen für den Menschen und für das Tier zusammengefasst. Dies sind Stoffe, die unverdaulich oder nicht resorbierbar sind sowie Verbindungen, die die Resorption nutritiver Substanzen verhindern oder limitieren (Kamphues et al., 2009). Konsekutiv können im Rahmen eines Einsatzes der Pflanzen in der Human- und Tierernährung Mengenrestriktionen beziehungsweise Gegenmaßnahmen oder Behandlungsverfahren zur Reduktion der nachteiligen Effekte erforderlich werden (Jeroch et al., 2008).

In der Familie der Leguminosen findet sich eine vergleichsweise hohe Anzahl antinutritiver Inhaltsstoffe. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die relevanten Stoffgruppen.

Literatur

Tabelle 3: Antinutritive Inhaltsstoffe in Körnerleguminosen (modifiziert nach Jeroch et al., 2008).

Stoffgruppe	Chemische Verbindung	Wirkung	Vorkommen
Phenolderivate	Tannine	Futteraufnahmesenkung, Hemmung proteolytischer Enzyme, herabgesetzte Proteinverdaulichkeit	Ackerbohnen, Erbsen
Proteine	Lectine	Verdaunungsstörungen, Durchfall, Nierenschäden, Beeinträchtigung körpereigener Abwehrmechanismen	<i>Phaseolus</i> -Arten, Ackerbohnen, Erbsen
	Protease-Inhibitoren	Trypsin- und chymotrypsinhemmende Wirkung, Pankreashypertrophie und -plasie, Wachstumsdepressionen	Ackerbohnen, Erbsen, Lupinen
Glucoside	Vicin, Convicin (Pyrimidin-Glucoside)	Störung des Fettstoffwechsels, verminderte Legeleistung und Einzeleimasse, Befruchtungs- und Schlupfleistungsdepression	Ackerbohnen, Wicken
	α -Galactoside	Störung der Verdauungsvorgänge durch übermäßige Bildung von Gärgasen	Lupinen, Ackerbohnen, Erbsen
	Cyanogene Glucoside	Vergiftungerscheinungen durch freigesetzte Blausäure	Wicken, <i>Phaseolus</i> -Arten
Alkaloide	Sparteine, Lupinin, Lupanin, Hydroxylupanin, Angustifolin	Leberschädigung, Atemlähmung, Futteraufnahmesenkung	Bitterlupinen, nur Spuren in Süßlupinen
Chelatbildner	Phytinsäure	Bindung von Mengen (P, Ca) und Spurenelementen, dadurch schlechtere Verwertung	In allen Leguminosen
Antivitaminne		Aktivitätsminderung von Niacin	Ackerbohnen

2.3.2 Behandlungsverfahren zur Reduktion antinutritiver Inhaltsstoffe in Leguminosen

Zur Reduktion antinutritiver Inhaltsstoffe in Leguminosen eignen sich verschiedene mechanische, hydrothermische und hydrothermisch-mechanische Behandlungsverfahren, die einzeln oder in Kombination zu einer Verbesserung der Nährstoffverfügbarkeit und des Futterwertes führen können. Zu berücksichtigen sind jedoch auch mögliche Nachteile, die sowohl bei sachgerechtem als auch bei nicht adäquatem Einsatz der Methoden auftreten können. Hierbei sind insbesondere eine Reduktion der Nährstoffverfügbarkeit, meist der Aminosäuren und Vitamine, sowie Substanz- und Akzeptanzverluste von Bedeutung.

Zu den wichtigen antinutritiven Faktoren in Leguminosen zählen Lektine und Protease-Inhibitoren (Gatel, 1994). Protease-Inhibitoren können durch Hitzeeinwirkung inaktiviert werden, beispielsweise durch Extrusion (Flis et al., 1989; Grosjean und Gatel, 1989; Myer und Froseth, 1989; Van Zuilichem und Van der Poel, 1989), Autoklavieren (Marquardt et al., 1974), Mikronisation (McNab und Wilson, 1974) oder Wasserdampfbehandlung (Van der Poel et al., 1990). Limitierende und regulierende Faktoren für die Wirksamkeit der Behandlungsmethode stellen die Temperatur und Zeit der Anwendung sowie die Partikelgröße und der Trockensubstanzgehalt der Leguminosen dar (Liener, 1983; Griffiths, 1984). Auch Lektine werden durch Einwirkung von Hitze inaktiviert, wobei die Anwendungstemperatur und -dauer wichtige Einflussfaktoren für die Wirksamkeit der Methode darstellen (Gatel, 1994).

Hinsichtlich einer Reduktion antinutritiver Substanzen sind als Behandlungsverfahren für Leguminosen insbesondere das Schälen, Toasten, Expandieren und Extrudieren relevant.

Das Schälen von Leguminosen erfolgt mit einer Schälmaschine. Durch Entfernung der faserreichen Schalen steigen sowohl die Verdaulichkeit als auch der energetische Futterwert an, zudem lässt sich der Gehalt einiger antinutritiver Inhaltsstoffe (v.a. der Tannine) reduzieren. Der mit dem Schälen verbundene Substanzverlust kann bei zu intensiver mechanischer Bearbeitung auch mit Verlusten der Endospermsubstanz und damit mit einem Verlust wichtiger Nährstoffe einhergehen.

Beim Toasten werden Leguminosen mit überspanntem Wasserdampf behandelt. Neben einer Inaktivierung antinutritiver Substanzen, beispielsweise von Glucosinolaten und Verdauungsenzyminhibitoren, ermöglicht dieses hydrothermische Behandlungsverfahren auch eine Entfernung von Extraktionsmitteln sowie eine Verminderung des ruminalen Proteinabbaus.

Das Expandieren stellt ein hydrothermisch-mechanisches Behandlungsverfahren dar. Unter Einleitung von Wasserdampf wird das Futter bei 100-130 °C für fünf bis zehn Sekunden und etwa 40 bar durch einen druckfesten Zylinder befördert. Auf diese Weise werden antinutritive Inhaltsstoffe inaktiviert und die Keimbelastung reduziert.

Auch das Extrudieren ist ein hydrothermisch-mechanisches Behandlungsverfahren. Bei Temperaturen von 130-160 °C wird das Futter für etwa fünf bis zehn Sekunden, einem Druck von 60 bar und unter Zufuhr von Wasserdampf durch einen druckfesten Zylinder befördert und anschließend in eine spezifische Form gepresst. Auf diese Weise können Proteaseinhibitoren inaktiviert und Keime reduziert werden. Die hohen Temperaturen können jedoch auch zu Proteinschädigungen und damit einem Verlust an Aminosäuren sowie zu einem Vitaminabbau führen.

2.3.3 Wirkungen und Wirkmechanismen

Untersuchungen zur Wirkung antinutritiver Inhaltsstoffe in Leguminosen fokussieren sich auf Interaktionen in der Nährstoffresorption sowie auf Auswirkungen auf Leistungsparameter. Ein Großteil der durchgeführten Studien konnte einen Anstieg der Nährstoffverdaulichkeit, insbesondere der Proteine, durch eine hydrothermische oder mechanisch-hydrothermische Behandlung der Leguminosen belegen (Tabellen 4 und 5). Einige Studien haben zudem die Aminosäurenverfügbarkeit untersucht und ebenfalls einen Anstieg der Verdaulichkeit durch eine Behandlung der Leguminosen beziehungsweise eine reduzierte Aminosäurenverfügbarkeit aufgrund einer Fütterung unbehandelter Leguminosen zeigen können. So ließ sich bei Ferkeln eine höhere scheinbare ileale Verdaulichkeit spezifischer Aminosäuren (Lys, Met, Thr, Val) sowie eine höhere standardisierte ileale Verdaulichkeit von Arg, Lys, Met und Thr durch den Einsatz von extrudierten Erbsen erzielen (Owusu-Asiedu et al., 2002). Der partielle Ersatz von Sojabohnenmehl und Maisstärke durch rohe Bohnen (5 % und 15 %) führte zu einer Abnahme der Verdaulichkeit von Rohprotein und von den gemessenen Aminosäuren (Met, Cys, Lys, Thr, Arg, His, Ile, Leu, Phe, Val, Ala, Asp, Glu, Gly, Pro, Ser, Tyr) (Myer et al., 1982). Allerdings ergab auch der Einsatz von extrudierten oder autoklavierten Bohnen im Vergleich zu Sojabohnenmehl (Kontrolle) eine herabgesetzte Verdaulichkeit von Rohprotein und einigen AS (Met, Cys, Lys, Thr, Arg, His, Ile, Leu, Phe, Ala, Asp, Glu, Gly, Pro, Ser, Tyr), obgleich eine insgesamt höhere Verdaulichkeit von Rohprotein und einigen AS (Lys, Thr, Arg, His, Ile, Leu, Phe, Asp, Glu, Gly, Pro, Ser, Tyr) bei den Ferkeln, die extrudierte anstelle autoklavierter Bohnen erhielten, demonstriert wurde (Myer und Froseth, 1983).

Tabelle 4: Zusammenstellung der Effekte unterschiedlich behandelter Leguminosen auf die Proteinverdaulichkeit bei Schweinen.

Leguminosenart, Behandlung	Verdaulichkeit ¹	Wirkungen ²	Literatur
Ackerbohnen (<i>Vicia faba</i>), autoklaviert	1 2	- -	Ivan und Bowland, 1976; Aherne et al., 1977
Bohnen (<i>Phaseolus vulgaris</i>), extrudiert		+ 6,5 %	Flis et al., 1989
Erbsen (<i>Pisum sativum</i>), extrudiert	2 2	- -	Bengala Freire et al., 1989; Marlier et al., 1989
Erbsen (<i>Pisum sativum</i>), extrudiert	2 2	+ 3,7 % + 5,4 %	Bengala Freire et al., 1989; Bengala Freire et al., 1991

¹1 = ileale scheinbare Verdaulichkeit, 2 = fäkale scheinbare Verdaulichkeit; ²im Vergleich zu unbehandelten Leguminosen; + Anstieg der Proteinverdaulichkeit; - kein Unterschied zwischen den Gruppen

Tabelle 5: Zusammenstellung der Effekte unterschiedlich behandelter Leguminosen auf die scheinbare Proteinverdaulichkeit beim Geflügel.¹

Leguminosenart, Behandlung	Wirkungen²	Literatur
Ackerbohnen (<i>Vicia faba</i>), autoklaviert	+ 5,6 %	Guillaume, 1978
Ackerbohnen (<i>Vicia faba</i>), extrudiert	+ 5,0 %	Huyghebaert et al., 1979
Erbsen (<i>Pisum sativum</i>), extrudiert	+ 2,0 %	Huyghebaert et al., 1979
Erbsen (<i>Pisum sativum</i>), autoklaviert	+ 4,3 % + 17,3 %	Conan und Carré, 1989

¹zitiert nach Gatel (1994); ²im Vergleich zu unbehandelten Leguminosen; + Anstieg der Proteinverdaulichkeit

Die untersuchten Leistungsparameter wurden im Gegensatz zur Nährstoffverdaulichkeit meist nicht durch eine Behandlung der eingesetzten Leguminosen beeinflusst. So führte die Verfütterung roher, extrudierter beziehungsweise getoasteter Ackerbohnen (*Vicia faba*) an Ferkel zu keinen Unterschieden in der Körpermassenentwicklung zwischen den Gruppen (Wetscherek et al., 1995). Sowohl der Einsatz roher, als auch extrudierter Ackerbohnen ergab bei steigender Konzentration (125, 250 oder 375 g/kg Futter) im Vergleich zu einem Kontrollfutter ohne Ackerbohnen in der Aufzuchtperiode von Ferkeln geringere tägliche Zuwachsraten, wohingegen in der Mastperiode keine Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden (O'Doherty und McKeon, 2001). Auch extrudierte Sojabohnen (*Glycine max*) konnten im Vergleich zu Sojabohnenmehl keine verbesserten täglichen Körpermassenzunahmen bei Ferkeln erzielen, jedoch zeigte sich eine Verbesserung der Futtermittelverwertung aufgrund einer geringeren täglichen Futteraufnahme (Shelton et al., 2001). Christodoulou et al. (2006) konnten keine Unterschiede in der Futteraufnahme, Futtermittelverwertung und Körpermassenzunahme der Ferkel durch den Einsatz roher beziehungsweise extrudierter Kichererbsen (*Cicer arietinum*) zwischen den Gruppen feststellen. Der Ersatz von Sojabohnenmehl und Maisstärke durch rohe Bohnen (5 % und 15 %) führte in einem Fütterungsversuch mit Ferkeln zu einer geringeren Körpermassenzunahme (Myer et al., 1982).

Myer et al. (1982) haben in einer halbsynthetischen Diät für Ferkel Sojabohnenmehl und Maisstärke partiell (5 % und 15 %) durch rohe Ackerbohnen ersetzt. Neben einem Rückgang der Verdaulichkeit von Protein und einigen Aminosäuren wurde ein Anstieg der renalen Stickstoff- und Sulfatexkretion sowie eine verminderte Stickstoffretention in beiden Gruppen beobachtet. Geringere tägliche Körpermassenzunahmen waren hingegen nur bei den Tieren, die eine Diät mit 15 % rohen Ackerbohnen erhielten, zu verzeichnen. Die Tiere zeigten in beiden Gruppen geringere Trypsin-, Chymotrypsin- und Amylase-Aktivitäten, geringere Albumin- und höhere Harnstoff- und Zinkkonzentrationen sowie erhöhte Aktivitäten der Alkalischen Phosphatase im Serum. Die Gesamtleukozytenzahl war in beiden Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (kein Ersatz von Sojamehl und Maisstärke durch rohe Ackerbohnen) erhöht, bedingt durch einen Anstieg der neutrophilen Granulozyten, die eosinophilen Granulozyten haben den Versuchsgruppen hingegen abgenommen.

In einem anderen Versuch der Autoren (Myer et al., 1982) erhielten Ferkel eine Diät mit Mais-Sojabohnenmehl, mit oder ohne rohe Ackerbohnen (15 %). Hinsichtlich des

Gesamtleukozytengehalts und Differentialblutbilds zeigten sich in diesem Versuch nur geringe Veränderungen zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe. Die Größe des Pankreas war bei den Ferkeln, die das Versuchsfutter mit rohen Ackerbohnen erhielten, verringert, ebenso zeigte sich bei den Tieren eine im Vergleich zur Kontrollgruppe herabgesetzte Proteinverdaulichkeit. Die Ergebnisse aus den beiden Versuchen zeigen einen möglicherweise mit der Fütterung roher Ackerbohnen assoziierten Rückgang der Nährstoffverdaulichkeit, der Leistung sowie physiologischer und hämatologischer Parameter auf.

Ähnliche Ergebnisse liegen auch zum Einsatz roher und hitzebehandelter Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) vor (Myer und Froseth, 1983). In einem Fütterungsversuch mit 64 Ferkeln erhielten die Tiere entweder eine Diät auf Basis von Mais-Sojabohnenmehl (Kontrolle) oder diese Diät partiell durch rohe (5 %, 15 %), extrudierte (15 %, 40 %) oder autoklavierte (15 %, 40 %, 40 % + 1 % D,L-Methionin) Bohnen ersetzt. Die Fütterung von 15 % rohen Bohnen führte zu einer im Vergleich zur Kontrollgruppe reduzierten Körpermassenzunahme, geringeren Trypsin-, Chymotrypsin-, Amylase- und Alkalische Phosphatase-Aktivitäten sowie zu geringeren Albumin- und Harnstoffkonzentrationen im Serum. Die Ferkel, die eine Diät mit 40 % extrudierten Bohnen erhielten, zeigten eine reduzierte Körpermassenzunahme, ebenso wie die Ferkel, die eine Diät mit 40 % autoklavierten Bohnen erhielten, hier konnte zudem eine Abnahme der Futterverwertung festgestellt werden.

Im Kontext differierender Behandlungsverfahren von Leguminosen wurden Aspekte einer möglichen Interferenz mit immunologischen Modifikationen in den durchgeführten Untersuchungen bislang nur in einem geringen Umfang berücksichtigt.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchsaufbau

In dem gewählten Versuchsdesign wurde eine Untersuchung immunologischer Parameter bei Sauen, Saugferkeln und Absetzferkeln vorgesehen, um den Einfluss von Inulin sowie extrudierten und getoasteten Ackerbohnen zu überprüfen. Die Durchführung erfolgte in zwei separaten Versuchsdurchgängen in zwei aufeinanderfolgenden Jahren (Abbildung 2). Im Kontext der Wiederholbarkeit wurden sowohl genetische und physiologische als auch haltungsbedingte Einflussfaktoren berücksichtigt und weitmöglich reduziert.

Sauen

Im ersten Versuchsdurchgang wurden zehn und im zweiten Versuchsdurchgang elf Jungsauen (TOPIGS, Lebensalter zu Versuchsbeginn 272 ± 24 Tage) eingesetzt und gleichmäßig auf zwei Versuchsgruppen (Kontroll- und Inulingruppe) aufgeteilt. Die Tiere wurden am 137. (± 5) Lebenstag gegen PRRS (Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome) geimpft sowie am 185. (± 3) Lebenstag und 35 Tage vor dem geplanten Abferkeltermin entwurmt (Ivomec[®]). Die Anlieferung der Sauen erfolgte im ersten Versuchsdurchgang am 36. Trächtigkeitstag beziehungsweise im zweiten Versuchsdurchgang am sechsten Trächtigkeitstag. Die Besamung der Sauen (Sperma von Piétrain-Ebern; GFS Aschenberg) fand jeweils im Frühsommer statt, sodass der Abferkeltermin in beiden Versuchsdurchgängen im Spätsommer lag. Während der Trächtigkeit erhielten die Sauen beider Versuchsgruppen ein Trächtigkeitstutter für niedertragende Sauen. Diesem wurde für die Inulingruppe ab dem 92. Trächtigkeitstag Inulin zugesetzt (Endkonzentration 3 %; Tabellen 6 und 7). In der Laktationsperiode wurde ein Laktationsfutter eingesetzt, das für die Inulingruppe ebenfalls 3 % Inulin enthielt (Tabelle 6 und 8). Die Futterzuteilung erfolgte in Abhängigkeit von der Körpermasse der Tiere individuell, wobei die Gesamtfuttermenge auf zwei Mahlzeiten pro Tag verteilt wurde. Zusätzlich zu dem Alleinfutter für tragende beziehungsweise laktierende Sauen erhielten die Tiere pro Tag 100 g Heu sowie Wasser ad libitum.

Die Sauen wurden während der Trächtigkeit einzeln in Außenstallungen auf Stroh gehalten, wobei ein täglicher Auslauf auf Sand zusammen mit den Tieren derselben Versuchsgruppe ermöglicht wurde. Acht Tage vor dem errechneten Abferkeltermin erfolgte die Aufstallung der Sauen in einzelne Abferkelabteile mit Kastenständen und Stroheinstreu. Die Sauen der beiden Versuchsgruppen wurden hierbei in zwei unterschiedlichen Sauenställen gehalten, mit einer durchschnittlichen Raumtemperatur von 24 °C. Mit Hilfe eines Lichtprogramms konnten jeweils zwölfstündige Licht- und Dunkelphasen eingestellt werden. Ab dem dritten Tag post partum erhielten die Sauen wieder die Möglichkeit des täglichen Auslaufs auf einem Steinboden.

Für die Bestimmung immunologischer Parameter wurden bei den Sauen an den Tagen 1, 5 (± 1) und 14 (± 1) p.p. Milchproben sowie am fünften Tag p.p. Blutproben gewonnen (Tabelle 9).

Tabelle 6: Zusammensetzung (%) des eingesetzten Trächtigkeits- und Laktationsfutters.

Futtermittel	Trächtigkeitsfutter	Laktationsfutter
Weizen	32,0	30,0
Gerste	18,0	15,0
Erbsen	11,5	14,4
Bohnen, extrudiert	19,0	13,5
Sojabohnen	-	10,0
Weizenkleie	13,0	8,40
Rapskuchen	2,50	4,80
Vormischung	2,70	2,90
Sonnenblumenöl	1,30	1,00

Tabelle 7: Rohnährstoff¹-, Mineralstoff¹- und Inulingehalte² sowie Säurebindungskapazität des eingesetzten Trächtigkeitsfutters für die Kontroll- (K) und Inulingruppe (I).

Inhaltsstoffe		Trächtigkeitsfutter	
		K	I
Trockensubstanz	g/kg uS	848	
Rohprotein	g/kg uS	161	
Rohfett	g/kg uS	20,9	
Rohfaser	g/kg uS	54,1	
N-freie Extraktstoffe	g/kg uS	565	
Rohasche	g/kg uS	46,8	
Kalzium	g/kg uS	7,45	
Phosphor	g/kg uS	7,03	
Natrium	g/kg uS	1,69	
Magnesium	g/kg uS	1,28	
Kalium	g/kg uS	6,80	
Eisen	mg/kg uS	277	
Zink	mg/kg uS	107	
Kupfer	mg/kg uS	19,5	
Säurebindungskapazität	mEq/kg uS	440	
Inulin	g/kg uS	10,0	30,0 ³

¹entsprechend den Empfehlungen der VDLUFA analysiert, nach Naumann und Bassler (2004); ²analysiert nach AOAC 997.08; ³täglich zugesetzte Menge: 20,0 g/kg uS

Tabelle 8: Rohnährstoff¹-, Mineralstoff¹- und Inulingehalte² sowie Säurebindungskapazität des eingesetzten Laktationsfutters für die Kontroll- (K) und Inulingruppe (I).

Inhaltsstoffe		Laktationsfutter	
		K	I
Trockensubstanz	g/kg uS		891
Rohprotein	g/kg uS		185
Rohfett	g/kg uS		43,1
Rohfaser	g/kg uS		53,0
N-freie Extraktstoffe	g/kg uS		560
Rohasche	g/kg uS		49,6
Kalzium	g/kg uS		8,59
Phosphor	g/kg uS		7,03
Natrium	g/kg uS		1,96
Magnesium	g/kg uS		1,96
Kalium	g/kg uS		8,58
Eisen	mg/kg uS		298
Zink	mg/kg uS		114
Kupfer	mg/kg uS		23,4
Säurebindungskapazität	mEq/kg uS		560
Inulin	g/kg uS	8,00	30,0 ³

¹entsprechend den Empfehlungen der VDLUFA analysiert, nach Naumann und Bassler (2004); ²analysiert nach AOAC 997.08; ³täglich zugesetzte Menge: 22,0 g/kg uS

Tabelle 9: Überblick über die erfolgten immunologischen Untersuchungen bei den Sauen in der vorliegenden Studie.

Probenmaterial	Untersuchungsparameter	Methode
Milchproben (Tage 1, 5, 14 p.p.)	Phänotypisierung der Lymphozyten	Durchflusszytometrie
Blutproben (Tag 5 p.p.)	Bestimmung des Immunglobulingehaltes	ELISA ¹

¹Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Saugferkel

Insgesamt wurden 16 weibliche Saugferkel im Alter von zehn Tagen von den Sauen der Kontroll- und Inulingruppe für die Bestimmung der immunologischen Parameter herangezogen (Abbildung 2; Tabelle 10). Die Ferkel wurden mit den Wurfgeschwistern in der Box der Muttersau gehalten und ausschließlich mit Kolostrum beziehungsweise Milch der Mutter ernährt. Am ersten Tag p.p. wurden alle Tiere eines Wurfs gewogen und mit Tätowierungen an beiden Ohren eindeutig markiert, am zweiten Tag p.p. erfolgte eine einmalige intramuskuläre Eiseninjektion (Eisen Dextran 20[®], 1 ml pro Ferkel). Die Körpermasseentwicklung der Tiere wurde an den Tagen drei, sieben und zehn kontrolliert.

Tabelle 10: Überblick über die erfolgten immunologischen Untersuchungen bei den Saugferkeln in der vorliegenden Studie.

Probenmaterial	Untersuchungsparameter	Methode
Blutproben	Phänotypisierung der Lymphozyten	Durchflusszytometrie
	Proliferation der Lymphozyten	Durchflusszytometrie
	Bestimmung des Immunglobulingehaltes	ELISA ¹
Darmproben	Phänotypisierung der Lymphozyten	Durchflusszytometrie
	Proliferation der Lymphozyten	Durchflusszytometrie

¹Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Absetzferkel

Es wurden 32 weibliche Absetzferkel im Alter von 59 (± 1) Tagen für die Untersuchungen der immunologischen Parameter eingesetzt (Abbildung 2; Tabelle 11). Im Alter von 14 Tagen erhielten die Tiere ein Saugferkelbeifutter, das bei den Ferkeln der Sauen aus der Inulingruppe 3 % Inulin enthielt (Tabellen 12 und 13). Die Ferkel wurden mit 42 Tagen abgesetzt und gleichmäßig auf vier Gruppen aufgeteilt, wobei die Auswahl der Ferkel für die Untersuchungen anhand der Körpermasse am Tag des Absetzens erfolgte. Jeweils zwei Gruppen bekamen ein Futter mit extrudierten oder getoasteten Ackerbohnen, das Futter für die Ferkel der Sauen aus der Inulingruppe enthielt zusätzlich 3 % Inulin (Tabellen 14 bis 16). Die Ackerbohnen wurden beim Toasten beziehungsweise Extrudieren einer Hochtemperatur-Kurzzeitbehandlung bei Temperaturen von > 130 °C unterzogen. Im Falle des Extrudierens erfolgte diese Behandlung unter zusätzlicher Druckanwendung von etwa 60 bar.

Die Haltung der Tiere erfolgte in Boxen mit Steinfußboden und Stroheinstreu. Die Ferkel erhielten das Futter sowie Wasser ad libitum, wobei die durchschnittliche tägliche Futteraufnahme pro Tier durch Rückwaage des Futters berechnet wurde.

Am Versuchsende wurden die Absetzferkel für die immunologischen Untersuchungen euthanasiert.

Tabelle 11: Überblick über die erfolgten immunologischen Untersuchungen bei den Absetzferkeln in der vorliegenden Studie.

Probenmaterial	Untersuchungsparameter	Methode
Blutproben	Phänotypisierung der Lymphozyten	Durchflusszytometrie
	Proliferation der Lymphozyten	Durchflusszytometrie
	Bestimmung des Immunglobulingehaltes	ELISA ¹
Darmproben	Phänotypisierung der Lymphozyten	Durchflusszytometrie
	Proliferation der Lymphozyten	Durchflusszytometrie

¹Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Tabelle 12: Zusammensetzung (%) des eingesetzten Saugferkelbeifutters.

Futtermittel	Saugferkelbeifutter
Gerste	20,2
Bohnen, extrudiert	20,0
Weizenflocken	13,0
Haferflocken	12,0
Erbsen	10,0
Sojabohnen	10,0
Magermilchpulver	10,0
Vormischung	2,80
Sonnenblumenöl	2,00

Tabelle 13: Rohnährstoff¹-, Mineralstoff¹- und Inulingehalte² sowie Säurebindungskapazität des eingesetzten Saugferkelbeifutters für die Kontroll- (K) und Inulingruppe (I).

Inhaltsstoffe		Saugferkelbeifutter	
		K	I
Trockensubstanz	g/kg uS	903	
Rohprotein	g/kg uS	201	
Rohfett	g/kg uS	52,4	
Rohfaser	g/kg uS	49,5	
N-freie Extraktstoffe	g/kg uS	549	
Rohasche	g/kg uS	50,9	
Kalzium	g/kg uS	7,61	
Phosphor	g/kg uS	7,34	
Natrium	g/kg uS	3,31	
Magnesium	g/kg uS	1,56	
Kalium	g/kg uS	9,68	
Eisen	mg/kg uS	238	
Zink	mg/kg uS	161	
Kupfer	mg/kg uS	34,8	
Säurebindungskapazität	mEq/kg uS	490	
Inulin	g/kg uS	9,50	30,0 ³

¹entsprechend den Empfehlungen der VDLUFA analysiert, nach Naumann und Bassler (2004); ²analysiert nach AOAC 997.08; ³täglich zugesetzte Menge: 20,5 g/kg uS

Tabelle 14: Übersicht über die Versuchsgruppen der Absetzferkel.

Anzahl der Ferkel	Fütterung
8	Futter mit extrudierten Ackerbohnen ohne Inulinzusatz
8	Futter mit getoasteten Ackerbohnen ohne Inulinzusatz
8	Futter mit extrudierten Ackerbohnen mit Inulinzusatz
8	Futter mit getoasteten Ackerbohnen mit Inulinzusatz

Tabelle 15: Zusammensetzung (%) des eingesetzten Aufzuchtfeeders.

Futtermittel	Aufzuchtfeeders	
	Extrudierte Ackerbohnen	Getoastete Ackerbohnen
Gerste	28,0	28,0
Bohnen, extrudiert	22,0	-
Bohnen, getoastet	-	22,0
Weizenflocken	22,0	22,0
Sojabohnen	17,4	17,4
Magermilchpulver	6,00	6,00
Vormischung	3,10	3,10
Sonnenblumenöl	1,50	1,50

Tabelle 16: Rohnährstoff¹-, Mineralstoff¹- und Inulingehalte² sowie Säurebindungskapazität des eingesetzten Aufzuchtfeeders. K = Kontrollgruppe, I = Inulingruppe.

Inhaltsstoffe		Aufzuchtfeeders, extrudiert		Aufzuchtfeeders, getoastet	
		K	I	K	I
Trockensubstanz	g/kg uS	910	900	916	905
Rohprotein	g/kg uS	195	193	200	200
Rohfett	g/kg uS	62,7	55,2	66,7	60,4
Rohfaser	g/kg uS	49,3	48,4	50,1	46,7
N-freie	g/kg uS	548	547	544	543
Extraktstoffe					
Rohasche	g/kg uS	55,2	56,9	55,0	54,9
Kalzium	g/kg uS	8,70	9,71	8,43	9,08
Phosphor	g/kg uS	7,55	7,80	7,60	7,22
Natrium	g/kg uS	2,30	2,32	2,33	2,33
Magnesium	g/kg uS	1,54	1,49	1,48	1,48
Kalium	g/kg uS	9,93	10,1	10,0	9,82
Eisen	mg/kg uS	256	254	233	235
Zink	mg/kg uS	135	158	122	144
Kupfer	mg/kg uS	30,9	29,7	28,2	28,2
Inulin	g/kg uS	9,00	30,0 ³	7,00	30,0 ⁴
Säurebindungs- kapazität	mEq/kg uS	523	630	545	555

¹entsprechend den Empfehlungen der VDLUFA analysiert, nach Naumann und Bassler (2004); ²analysiert nach AOAC 997.08; ³täglich zugesetzte Menge: 21,0 g/kg uS; ⁴täglich zugesetzte Menge: 23,0 g/kg uS

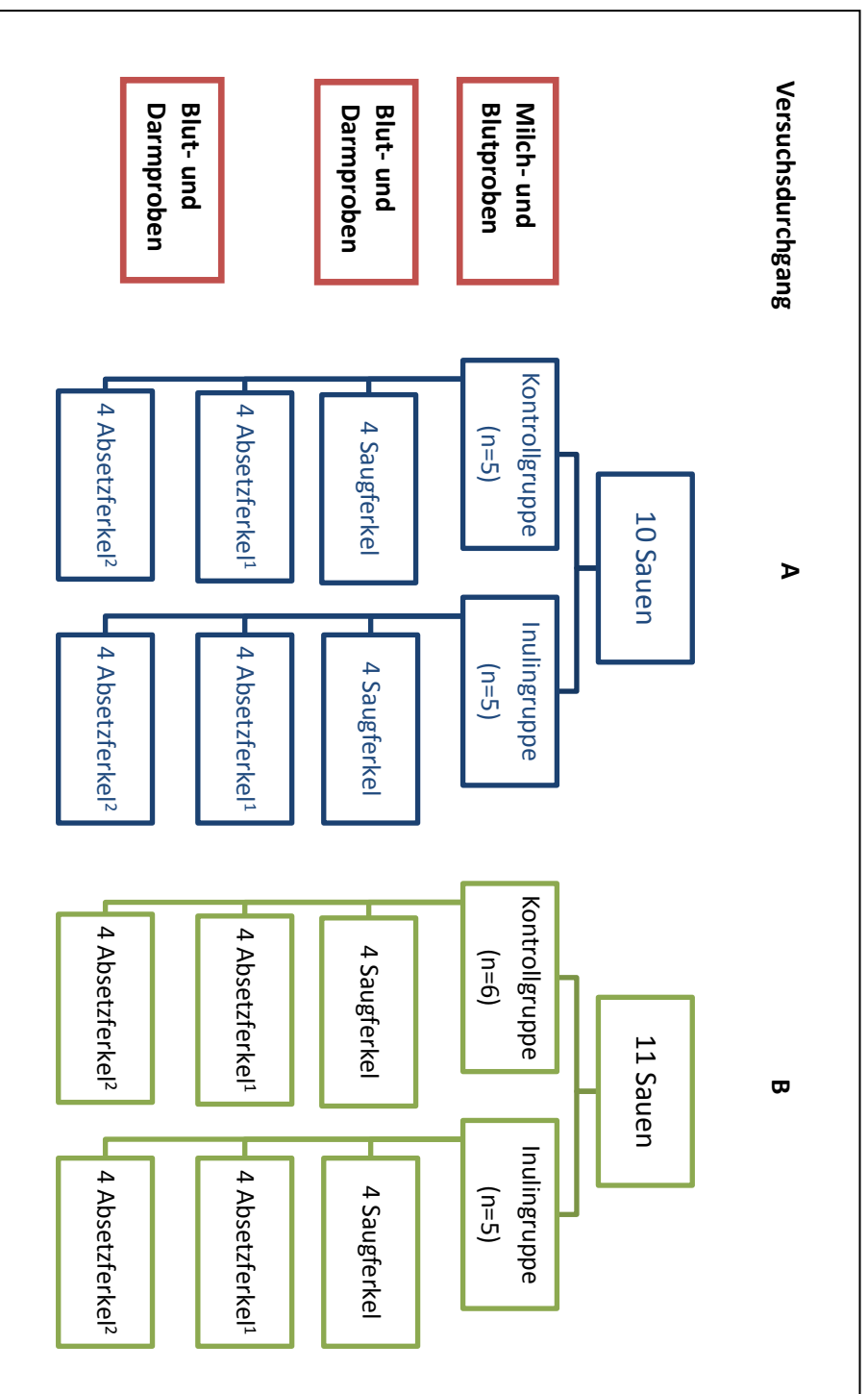


Abbildung 2: Versuchsdesign der vorliegenden Studie. Versuchsdurchgang A: 2008; Versuchsdurchgang B: 2009; ¹Aufzuchtfütter mit extrudierten Ackerbohnen; ²Aufzuchtfütter mit getoasteten Ackerbohnen.

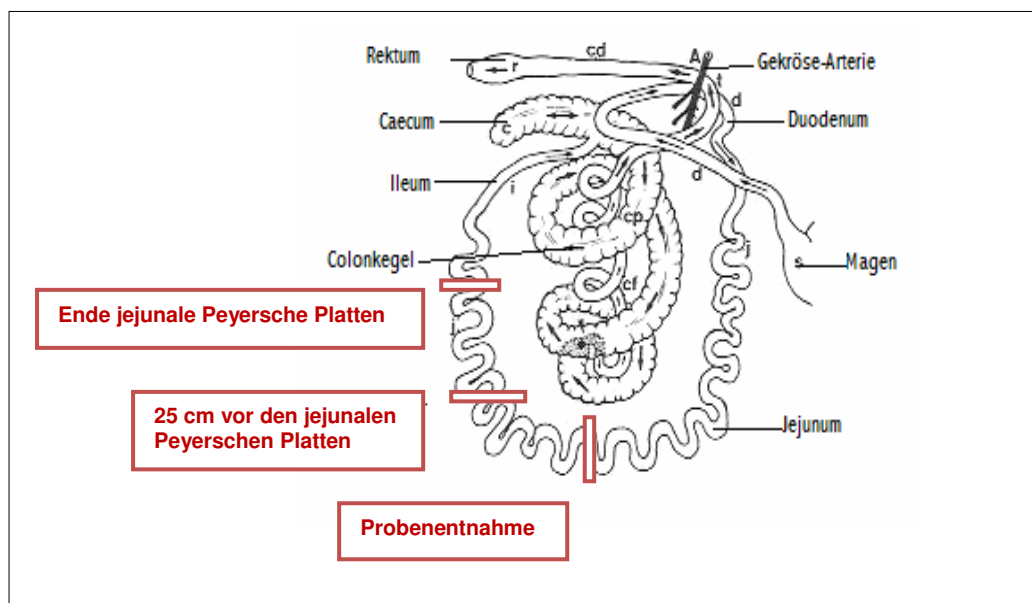
3.2 Probengewinnung

Zur Gewinnung der Kolostrum- und Milchproben wurden den Sauen zehn Minuten vor Probenentnahme 3 ml Oxytocin (Oxytocin 10 IE/ml[®]) intramuskulär injiziert, und anschließend etwa 30 ml Milch durch manuelles Melken aus verschiedenen Zitzen des Gesäuges gewonnen. Die Lymphozytenisolierung und -differenzierung erfolgte im direkten Anschluss, zudem wurden unmittelbar nach Probenentnahme 5 ml Milch pro Sau für die spätere Immunglobulinbestimmung bei -30 °C eingefroren. Die Blutproben der Sauen (7 ml Blut im Serumröhrchen, Sarstedt Monovette[®]) wurden aus der Vena jugularis externa beziehungsweise aus der Vena auricularis gewonnen. Nach einer Zentrifugation bei 3000 x g für 10 Minuten bei 4 °C wurde das erhaltene Serum für die spätere Immunglobulinbestimmung bei -30 °C eingefroren.

Die Saug- und Absetzferkel wurden am Tötungstag mit einer Kombination aus Ketaminhydrochlorid (Ursotamin[®], Serumwerk Bernburg Ag, Deutschland; 25 mg/kg KM intramuskulär) und Azaperon (Stresnil[®], Jansen-Cilag, Neuss, Deutschland; 2 mg/kg KM intramuskulär) sediert und in tiefer Narkose mit einem Kombinationspräparat aus Tetracainhydrochlorid, Mebezoniumiodid und Embutramid (T61[®], Intervet, Deutschland; 0,5 ml/kg KM intrakardial) euthanasiert. Im direkten Anschluss wurde Blut aus dem Herzen für die Lymphozytenisolierung (7 ml Heparinblut, Sarstedt Monovette[®]), Immunglobulinbestimmung (7 ml Blut im Serumröhrchen, Sarstedt Monovette[®]) sowie für eine Blutbildanalyse (2 ml EDTA-Blut, Sarstedt Monovette[®]) entnommen.

Der Bauchraum der Ferkel wurde durch einen Schnitt in der Linea alba eröffnet, der Gastrointestinaltrakt entnommen und anschließend der Dünndarm von dem Gekröse getrennt. Für die Gewinnung eines zwischen allen beprobten Ferkeln vergleichbaren Darmstückes wurden 20 cm des mittleren Jejunums, beginnend 25 cm oral der jejunalen Peyerschen Platten, gewählt (Abbildung 3).

Die Isolierung der intraepithelialen Lymphozyten aus dem Darmabschnitt und dem gewonnenen Heparinblut erfolgte im direkten Anschluss, das Serum für die Bestimmung der Immunglobulingehalte wurde nach einer Zentrifugation des Blutes (3000 x g, 4 °C, 10 Minuten) zunächst bei -30 °C eingefroren. Für die Blutbildanalyse wurden die EDTA-Blutröhrchen am Tag der Sektion an ein externes Labor verschickt.



Quelle: http://www.diss.fu-berlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_000000003032/04_litue.pdf?hosts=
(modifiziert)

Abbildung 3: Probenlokalisierung zur Gewinnung der intraepithelialen Lymphozyten. Modifizierte schematische Darstellung des Schweinedarms.

3.3 Futtermitteluntersuchung

Die in der vorliegenden Studie eingesetzten Futtermittel wurden auf ihren Rohnährstoff-, Mineralstoff- und Inulingehalt sowie auf ihre Säurebindungskapazität analysiert. Die Bestimmung der Rohnährstoffe erfolgte anhand der Vorgaben der Weender-Analyse (Naumann und Bassler, 2004), die Inulingehalte wurden in Anlehnung an die AOAC-Methode 997.08 ermittelt. Tabelle 55 gibt einen Überblick über die für die Futtermitteluntersuchungen eingesetzten Geräte und Chemikalien.

Weender Analyse

Zur Bestimmung des Trockensubstanzgehaltes wurde das Futter zunächst in Porzellantiegel eingewogen und im Trockenschrank bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach erfolgter Abkühlung im Exsikkator auf Zimmertemperatur wurden die Proben anschließend erneut gewogen, sodass der resultierende Trockensubstanzgehalt berechnet werden konnte.

Im Anschluss an die Trockensubstanzbestimmung wurde der Rohaschegehalt ermittelt, indem die Proben für neun Stunden im Muffelofen bei 600 °C verascht und nach dem Abkühlen im Exsikkator gewogen wurden.

Die Ermittlung des Rohproteingehaltes erfolgte über die Messung des Stickstoffgehaltes des Futters mit Hilfe eines Makro-Elementaranalysators.

Für die Rohfettanalyse wurde die Methode nach Naumann und Bassler (2004) modifiziert eingesetzt. Zunächst wurde das Fett mit Petrolether für drei Stunden nach Soxhlet extrahiert und anschließend der Petrolether bei 100 °C im Trockenschrank für eine Stunde abgedampft. Nach der Abkühlung im Exsikkator konnte der Rohfettgehalt anhand der

Gewichtsbestimmung des Probengefäßes mit und ohne Rohfett im Futter rechnerisch bestimmt werden.

Zur Bestimmung des Rohfasergehaltes wurden die Futterproben in einem Rohfaseranalysator zunächst in 1,25 %iger Schwefelsäure gekocht, nach dem Absaugen der flüssigen Phase mit 1,25 %iger Natronlauge versetzt und schließlich mit heißem destilliertem Wasser gespült. Im Anschluss wurden die Glasfiliertiegel aus dem Rohfaseranalysator entnommen, drei Minuten in Azeton geschwenkt und bei 105 °C im Trockenschrank getrocknet. Nach Bestimmung des Gewichts konnten die Proben anschließend im Muffelofen bei 500 °C verascht werden, sodass sich danach der Rohfasergehalt im Futter aus der Differenz des Gewichts des getrockneten Inhalts der Glasfiliertiegel und dem Gewicht der Rohasche errechnen ließ.

Mineralstoffbestimmung

Zur Bestimmung der Mineralstoffgehalte in den Futterproben wurden diese zunächst bei 600 °C im Muffelofen zur Rohaschebestimmung verascht, dann mit 6 ml Salzsäure (37-38 %ig) sowie 20 ml destilliertem Wasser versetzt und anschließend für 50 Minuten bei 200 °C im Sandbad erhitzt. Die Proben wurden durch einen Faltenfilter filtriert und mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Aus dieser Aschelösung konnten die Gehalte an Kalzium, Natrium, Magnesium, Kalium, Kupfer, Zink und Eisen mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt werden. Weiterhin wurden 500 µl der Aschelösung zur Ermittlung des Phosphorgehaltes mit 5 ml einer Lösung aus Salpetersäure (134 ml, w = 65 %) und den P-Komplexbildnern Ammoniumvanadat (200 ml) und Ammoniummolybdat (200 ml) versetzt und anschließend mit destilliertem Wasser auf 20 ml aufgefüllt. Da Phosphor in salpetersaurem Milieu zu einem gelben Farbkomplex reagiert, wurde die Extinktion photometrisch bei einer Wellenlänge von 436 nm gemessen und der Phosphorgehalt schließlich mit Hilfe einer Eichkurve bestimmt.

Säurebindungskapazität

Für die Bestimmung der Säurebindungskapazität wurden zunächst 10 g der Futterproben mit 90 ml destilliertem Wasser versetzt. Anschließend konnte der pH-Wert in der Suspension bestimmt und durch die Zugabe einer 1 N Salzsäure auf den pH-Wert 3 eingestellt werden. Die hierfür benötigte Menge (ml) der Salzsäure wurde mit 100 multipliziert und die so berechnete Säurebindungskapazität als Milliequivalente (mEq) pro kg Futter angegeben.

Inulingehalt

Zur Ermittlung des Inulingehaltes wurden Futtermittelproben an ein externes Labor verschickt (IGV Institut für Getreideverarbeitung GmbH, Nuthetal, Deutschland) und dort in Anlehnung an die AOAC-Methode 997.08 (Bestimmung von Inulin mittels HPLC/RI) analysiert.

3.4 Leistungsparameter

Der Gesundheitszustand der Sauen und Ferkel wurde täglich anhand üblicher klinischer Parameter (Allgemeinbefinden, Ernährungs-, Entwicklungs- und Pflegezustand, Verhalten, Körperhaltung, Kotkonsistenz) überwacht. Zusätzlich erfolgte an den ersten drei Tagen post partum eine Kontrolle der Körpertemperatur der Sauen.

Die Lebendmasse der Sauen wurde während der Trächtigkeitsperiode in dreiwöchigen und in der Laktationsperiode in einwöchigen Abständen erfasst (AGRETO Waagenbausatz, AGRIS GmbH, Wartberg, Österreich; Messgenauigkeit ± 1 % Maximalabweichung über den gesamten Wiegebereich (Maximalgewicht: 4000 kg)), die der Ferkel an den Tagen eins, drei, sieben, 14, 21, 28, 42 post natum sowie am Tag der Euthanasie (Industrie-Terminal BT, Bizerba GmbH & Co. KG, Balingen, Deutschland; Genauigkeitsklasse III). Die Lebendmassenzunahme wurde rechnerisch mit Hilfe der Körpermassendaten ermittelt.

Für die Bestimmung spezifischer Reproduktionsparameter der Jungsauen wurde die Anzahl lebend und totgeborener sowie abgesetzter Ferkel berücksichtigt (Tabelle 17).

Tabelle 17: Bestimmungsgrundlage für reproduktionsspezifische Merkmale der Sauen.

Reproduktionsparameter	Bestimmung
Insgesamt geborene Ferkel	Anzahl aller bei der Geburt ausgestoßenen, voll ausgebildeten Feten, unabhängig, ob tot oder lebend
Lebend geborene Ferkel	Anzahl der unmittelbar nach der Geburt lebenden Ferkel
Tot geborene Ferkel	Anzahl der unmittelbar nach Austritt aus dem Geburtsweg voll entwickelten nicht lebenden Ferkel
Abgesetzte Ferkel	Anzahl der am Tag des Absetzens vorhandenen Ferkel
Durchschnittliche Anzahl abgesetzter Ferkel je geborenem Wurf	Anzahl abgesetzter Ferkel einer Sauengruppe bezogen auf die Anzahl geborener Würfe $AGF/WG \text{ (St.)} = \text{Anzahl abgesetzter Ferkel (AGF)} / \text{Anzahl geborener Würfe (WG)}$
Durchschnittliche Anzahl abgesetzter Ferkel je abgesetztem Wurf	Anzahl abgesetzter Ferkel einer Sauengruppe, bezogen auf die Anzahl von Sauen, von denen am Ende der Säugezeit Ferkel abgesetzt werden (= abgesetzte Würfe) $AGF/WA \text{ (St.)} = \text{Anzahl abgesetzter Ferkel (AGF)} / \text{Anzahl abgesetzter Würfe (W A)}$

Die durchschnittliche tägliche Futterraufnahme konnte anhand der Futtereinwaage und Futterrückwaage (Industrie-Terminal BT, Bizerba GmbH & Co. KG, Balingen, Deutschland; Genauigkeitsklasse III) unter Berücksichtigung der Tierzahl pro Box ermittelt werden. Zur Berechnung des Futteraufwandes wurde folgende Formel genutzt:

Futteraufwand = mittlere Futterraufnahme (kg) / mittlere Lebendmassenzunahme (kg).

3.5 Immunologische Parameter

3.5.1 Differentialblutbild

Von den Saug- und Absetzferkeln wurde unmittelbar nach der Euthanasie Blut aus dem Herzen entnommen. Neben den Blutproben für die Phänotypisierung peripherer Blutzellen sowie für die Serumgewinnung zur Immunglobulinbestimmung wurde EDTA-Blut für ein Differentialblutbild gewonnen und am Tag der Euthanasie der Ferkel gekühlt an ein externes Labor (LABOKLIN, Bad Kissingen) verschickt.

3.5.2 Durchflusszytometrische Messungen

Die Phänotypisierung der intraepithelialen Lymphozyten aus dem Darm sowie der Lymphozyten aus dem Blut und der Milch erfolgte anhand durchflusszytometrischer Messungen. Ebenso wurde das Verfahren der Durchflusszytometrie zur Auswertung des Proliferationstests der Blut- und intestinalen intraepithelialen Lymphozyten genutzt. Tabelle 56 gibt einen Überblick über die für die durchflusszytometrischen Untersuchungen eingesetzten Geräte, Materialien und Chemikalien.

Prinzip durchflusszytometrischer Messungen und Anwendung in der vorliegenden Studie

Die Durchflusszytometrie oder fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS-Analyse) ermöglicht eine quantitative Erfassung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Grundlage des Verfahrens ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper an antigene Oberflächenstrukturen von Zellen binden. Die so markierten Zellen werden einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet, sodass die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffs auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Nach Passieren des Laserstrahls fallen die Elektronen unter Abgabe von Photonen auf ihr ursprüngliches Energieniveau ab und die emittierte Photonenkonzentration wird durch einen Photodetektor registriert. Diese verhält sich proportional zur Menge an gebundenem Antikörper pro Zelle. Aufgrund der unterschiedlichen Emissionsspektren verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe wird ein gleichzeitiger Einsatz verschiedener Farbstoffe ermöglicht. Tabelle 18 gibt einen Überblick über die eingesetzten Farbstoffe in der vorliegenden Studie.

Tabelle 18: Emissionsmaxima der in den durchflusszytometrischen Messungen der vorliegenden Studie eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe.

Fluoreszenzfarbstoff	Abkürzung	Emissionsmaximum (nm)
Fluoreszeinisothiozyanat	FITC	519
Phycoerythrin	PE	578
Propidiumjodid	PI	650

Neben der Information zur Menge der gebundenen Antikörper pro Zelle und Zellsuspension werden anhand der Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellmorphologie ermöglicht. Dabei stellt die gemessene Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung (180°-Forward Scatter) ein Maß für die Zellgröße und die im 90 °-Winkel gemessene Seitwärtsstreuung (Sideward Scatter) ein Maß für die Granularität der Zellen dar.

In der vorliegenden Studie wurde die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse eingesetzt, um mit Hilfe Fluoreszenzfarbstoff-markierter monoklonaler Antikörper die Expression von Oberflächenmolekülen auf Einzelzellebene zu detektieren. Hierfür stand als Analysengerät das FACS-Calibur zur Verfügung. Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit dem Computerprogramm CellQuest pro® (Becton Dickinson Bioscience, San José, USA).

3.5.2.1 Phänotypisierung der Leukozyten in der Sauenmilch

Zur Charakterisierung der Leukozyten in der Sauenmilch sind zunächst eine Isolierung der Immunzellen aus der Milch sowie zwei anschließende Färbeschritte mit primären und sekundären Antikörpern erforderlich, bevor die Oberflächenmarker der Leukozyten und damit die differierenden Zellpopulationen durchflusszytometrisch detektiert werden können.

Von den Milchproben (30 ml je Sau in einem 50 ml Greiner Röhrchen) wurden zunächst etwa 5 ml entnommen und bei -30 °C für die spätere Immunglobulinbestimmung eingefroren. Anschließend wurden die Milchproben mit phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS) auf 50 ml aufgefüllt und bei 452 x g bei 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Nachdem das sich an der Oberfläche befindende Fett mit einem Löffel abgenommen wurde, konnten der Überstand verworfen und die Innenwände des Greiner Röhrchens mit einem Kimwipe-Tuch von Fettresten gereinigt werden. Das Zellsediment wurde in PBS resuspendiert und die Suspension auf 50 ml mit PBS aufgefüllt. Nach zehnmütiger Zentrifugation (452 x g, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment in PBS resuspendiert. Es folgten die Überführung der Zellsuspension in ein 15 ml Greiner Röhrchen, das mit PBS anschließend auf 14 ml aufgefüllt wurde. Nach erneuter Zentrifugation bei 452 x g und 4 °C für 10 Minuten konnten der Überstand verworfen und das Zellsediment in 10 ml PBS resuspendiert werden. Diese Suspension wurde vorsichtig auf 3 ml Ficoll Histopaque in einem 15 ml Greiner Röhrchen geschichtet und anschließend bei 1257 x g für 15 Minuten bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Ficoll ist ein synthetisch hergestelltes Polysaccharid aus Saccharose und Epichlorhydrin und ermöglicht eine Auftrennung der Zellen in der Milch entlang eines Dichtegradienten (Abbildung 4).

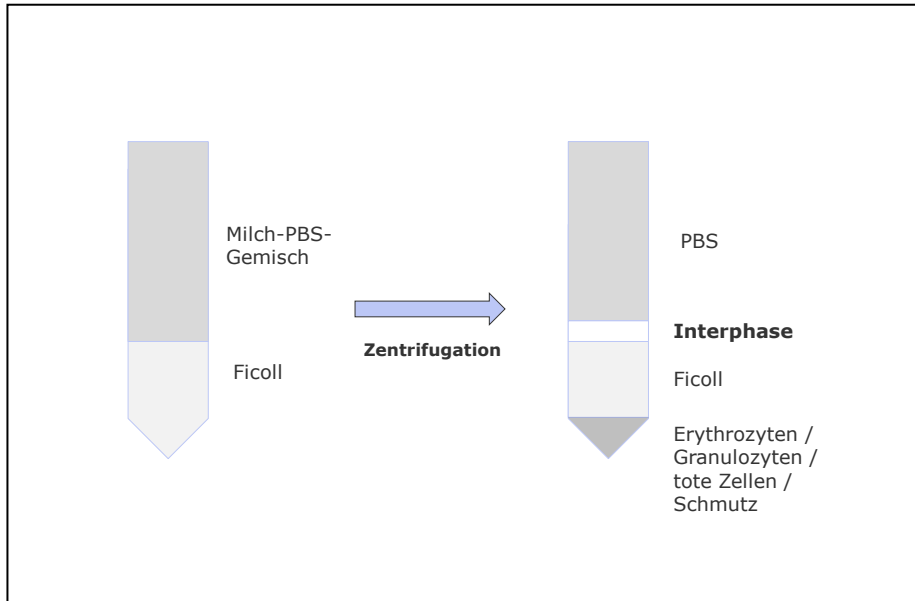


Abbildung 4: Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation zur Lymphozytenisolierung aus der Milch.

Bei den in der Interphase enthaltenen Zellen handelt es sich um hauptsächlich mononukleäre Zellen. Die Interphase wurde in ein 15 ml Greiner Röhrchen pipettiert, mit PBS auf 10 ml aufgefüllt und bei 452 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellsediment in 5 ml PBS resuspendiert und die Suspension bei 452 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Zellsediment in einem Milliliter beziehungsweise im Falle eines kleinen Zellsediments in 500 µl resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden anschließend mit 90 µl Trypanblau beziehungsweise bei Vorliegen eines kleinen Zellsediments mit 10 µl Trypanblau verdünnt. Es folgte die Zellzahlbestimmung in einer modifizierten Neubauer Zählkammer (4 x 16 Kleinstquadrate), um die Anzahl der mononukleären Zellen in der Zellsuspension mit nachfolgender Formel zu bestimmen.

Gesamtzellzahl in der Zellsuspension = Mittelwert der gezählten Anzahl lebender Zellen x Volumen der Zellsuspension in ml (1 beziehungsweise 0,5) x Verdünnung in Trypanblau (10 beziehungsweise 2) x Kammerfaktor (10^4)

Anhand der ermittelten Zellzahl wurde durch Verdünnung mit FACS-Puffer eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/Milliliter eingestellt.

Für die sich nun anschließenden Färbeschritte wurden jeweils 100 µl der Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen pipettiert und diese mit den primären Antikörpern (Tabelle 19) versetzt. Nach fünfundzwanzigminütiger Inkubationszeit auf Eis und unter Lichtschutz wurden pro FACS-Röhrchen 2 ml FACS-Puffer hinzugegeben und die Röhrchen bei 452 x g und 4 °C für

fünf Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, konnten je 50 µl der passenden vorverdünnten sekundären Antikörper (Tabelle 20) in die FACS-Röhrchen pipettiert werden. Die Proben wurden erneut für 25 Minuten auf Eis und unter Lichtschutz inkubiert. Anschließend wurden in jedes FACS-Röhrchen 2 ml FACS-Puffer pipettiert und die Proben bei 452 x g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die nun mit primären und sekundären Antikörpern versehenen Proben wurden direkt anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

Die durchflusszytometrische Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms CellQuest pro® (Becton Dickinson Bioscience, San José, USA). Zur Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen wurden zunächst die Zellgröße (dargestellt im Forward Scatter, FSC-H) und Zellgranularität (dargestellt im Sideward Scatter, SSC-H) gegeneinander aufgetragen. Auf diese Weise konnten Lymphozyten von Granulozyten, Monozyten und von Zellresten (Debris) unterschieden werden (Abbildung 5a). Zur Auswertung der SWC3⁺- und CD14⁺-Zellen wurde eine Region (gate) um alle detektierten Leukozyten gelegt (R1, Abbildung 5a), zur Auswertung der übrigen CD-markierten Leukozyten hingegen nur eine Region um die Lymphozyten (R2, Abbildung 5a). Anschließend wurden die Färbungen FITC und PE in einem zweiten Diagramm gegeneinander aufgetragen und die Zellpopulationen aus R1 beziehungsweise R2 eingefügt. Auf diese Weise konnte anhand der Festlegung von Quadranten der relative Anteil an FITC-positiven, PE-positiven sowie FITC- und PE-doppeltpositiven Zellen ermittelt werden (Abbildung 5b). Tabelle 21 gibt einen Überblick über die detektierten Leukozytenpopulationen.

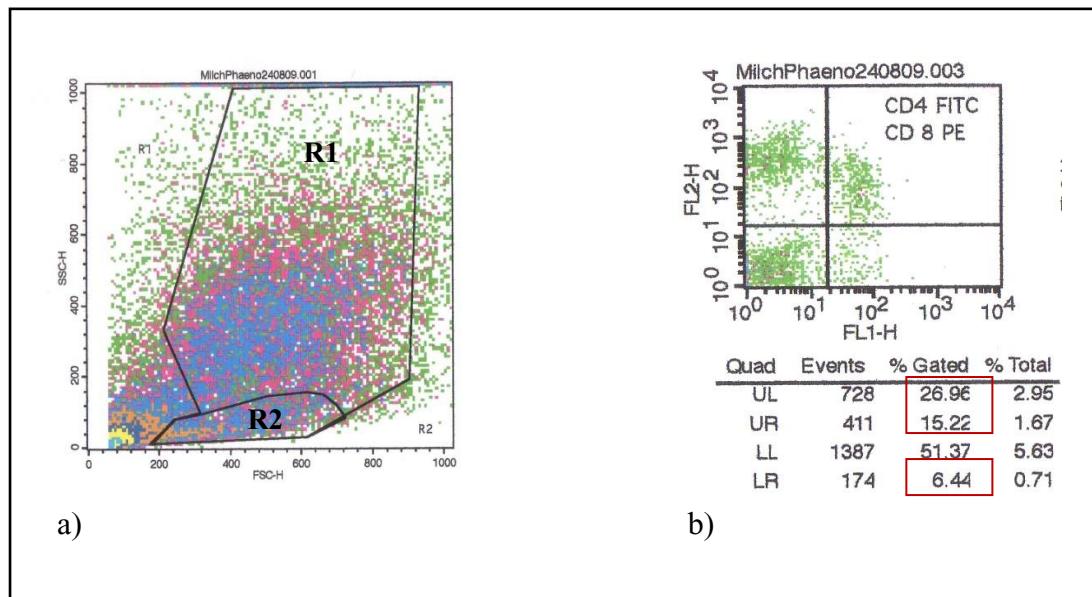


Abbildung 5: Darstellungsformen zur Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen in der Milch in in der vorliegenden Studie genutzten durchflusszytometrischen Verfahren.

- Auftragung der Zellgröße (dargestellt im Forward Scatter, FSC-H) gegenüber der Zellgranularität (dargestellt im Sideward Scatter, SSC-H) zur Detektion der myeloiden Zellen und Lymphozyten (Leukozytengate, R1) beziehungsweise zur alleinigen Darstellung der Lymphozyten (Lymphozytengate, R2).
- Auftragung der Färbung mit Fluoreszeinisothiozyanat (FITC, zu sehen im FL1-H Detektor) gegenüber der Färbung mit Phycoerythrin (PE, zu sehen im FL2-H Detektor) am Beispiel der CD4- und CD8 α -markierten T-Lymphozyten und NK-Zellen in R2. Der anti-CD4-Antikörper war FITC- und der anti-CD8 α -Antikörper PE-markiert, sodass im rechten unteren Quadranten (lower right, LR) die CD4⁺CD8 α ⁻-Zellen (naiven T-Helferzellen), im linken oberen Quadranten (upper left, UL) die CD4⁻CD8 α ⁺-Zellen (zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen) und im rechten oberen Quadranten (upper right, UR) die CD4⁺CD8 α ⁺-Zellen (T-Gedächtniszellen) dargestellt wurden.

3.5.2.2 Phänotypisierung der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)

Bei der Phänotypisierung der peripheren mononukleären Blutzellen werden die Leukozyten zunächst aus dem Blut isoliert und anschließend mit primären und sekundären Antikörpern gefärbt, sodass die Zellpopulationen schließlich durchflusszytometrisch detektiert werden können. Aufgrund der parallel zu der Lymphozytenphänotypisierung durchgeführten Lymphozytenproliferation erfolgten die Schritte bis zur Färbung mit den primären Antikörpern unter sterilen Bedingungen.

Das gewonnene Heparinblut wurde zunächst im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt, sodass etwa 10 ml dieses Blut-PBS-Gemisches vorsichtig auf 3 ml Ficoll geschichtet werden konnten. Nach einer dreißigminütigen Zentrifugation (400 x g, Raumtemperatur, keine Bremse) wurde die entstandene Interphase (siehe 3.5.2.1 zur Dichtezentrifugation mit Ficoll) vorsichtig in ein 15 ml Greiner Röhrchen überführt und mit PBS auf 15 ml aufgefüllt. Es folgten eine erneute

Zentrifugation (300 x g, 4 °C, 10 Minuten) und, nachdem der Überstand verworfen wurde, eine Resuspension des Zellsediments in einem Milliliter PBS. Anschließend wurden 7 ml Lysispuffer hinzugegeben und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mit dem Lysispuffer bei 200 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, konnten das Zellsediment in PBS resuspendiert und das Greiner Röhrchen auf 15 ml PBS aufgefüllt werden. Es folgte eine erneute Zentrifugation (200 x g, 4 °C, 10 Minuten), der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in einem Milliliter Zellkulturmedium resuspendiert.

10 µl der Zellsuspension wurden mit 90 µl Trypanblau verdünnt, sodass die Anzahl der mononukleären Zellen in der Zellsuspension mit Hilfe einer modifizierten Neubauer Zählkammer (4 x 16 Kleinstquadrate) und nachfolgender Formel bestimmt werden konnte.

Gesamtzellzahl in der Zellsuspension = Mittelwert der gezählten Anzahl lebender Zellen x Volumen der Zellsuspension in ml (1) x Verdünnung in Trypanblau (10) x Kammerfaktor (10⁴)

Anhand der ermittelten Zellzahl wurde durch Verdünnung mit FACS-Puffer eine Konzentration von 1 x 10⁷ Zellen / Milliliter eingestellt. Anschließend wurde ein Milliliter für den Proliferationstest in ein 15 ml Greiner Röhrchen überführt und auf Eis bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Im Rahmen der Phänotypisierung der peripheren mononukleären Blutzellen wurden anschließend jeweils 100 µl der Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen pipettiert, diese mit den primären Antikörpern (Tabelle 19) versetzt und fünfundzwanzig Minuten unter Lichtschutz inkubiert. Nachfolgend konnten pro FACS-Röhrchen 2 ml FACS-Puffer hinzugegeben, die Röhrchen bei 452 x g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen werden. Je 50 µl der passenden vorverdünnten sekundären Antikörper (Tabelle 20) wurden anschließend in die FACS-Röhrchen pipettiert und die Proben erneut für 25 Minuten auf Eis und unter Lichtschutz inkubiert. Anschließend wurden in jedes FACS-Röhrchen 2 ml FACS-Puffer pipettiert und die Proben bei 452 x g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Im direkten Anschluss erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der mit primären und sekundären Antikörpern versehenen Proben.

Die durchflusszytometrische Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms CellQuest pro® (Becton Dickinson Bioscience, San José, USA). Zur Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen (Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten) sowie zum Ausschluss von Zellresten (Debris) wurden zunächst die Zellgröße (dargestellt im Forward Scatter, FSC-H) und Zellgranularität (dargestellt im Sideward Scatter, SSC-H) gegeneinander aufgetragen (analog zum Vorgehen bei der Phänotypisierung der Leukozyten in der Sauenmilch, Abbildung 5a). Zur Auswertung der Leukozytenpopulationen wurde eine Region (gate) um alle detektierten Leukozyten gelegt (R1, Abbildung 5a analog). In einem zweiten Diagramm wurden die Färbungen FITC und PE gegeneinander aufgetragen und die Zellpopulation aus R1 eingefügt, sodass anhand der Festlegung von Quadranten der relative Anteil an FITC-positiven, PE-positiven sowie FITC- und PE-doppeltpositiven Zellen ermittelt werden konnte (Abbildung 5b analog). Tabelle 21 gibt einen Überblick über die detektierten Leukozytenpopulationen.

3.5.2.3 Phänotypisierung der intraepithelialen Leukozyten im Darm

Nach der Probenahme wurde der Darm zunächst umgestülpt, sodass die mukosale Seite außen und die seröse Seite innen lag. Anschließend wurde ein Ende des Darms abgebunden, dieser mit PBS gefüllt und nachfolgend das andere Ende abgebunden. Der so präparierte Darm wurde zunächst für fünf Minuten bei 37 °C in einem Erlenmeyer-Kolben mit 50 ml HBSS-DTT-Medium inkubiert (Schüttelinkubator mit 100 Schüttlern/Minute), nachfolgend mit dem Medium über eine 200 µm Gaze in ein Becherglas gegossen und das Medium verworfen. Im Folgenden wurde der Darm dreimal für je 30 Minuten in 50 ml HBSS-EDTA-Medium im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Am Ende einer Inkubationszeit wurde der Darm jeweils erneut mit dem Medium über eine Gaze gegossen, der Überstand aufgefangen und der Darm wieder mit 50 ml HBSS-EDTA-Medium in den Erlenmeyer-Kolben gefüllt. Die nach einer Inkubationszeit jeweils gewonnene Zellsuspension wurde bei 600 x g und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert, das Zellsediment in zehn Millilitern RPMI-Zellkulturmedium resuspendiert und die Suspension auf Eis gelagert, bis nach den Inkubationsschritten drei Suspensionen vorlagen. Diese wurden vereinigt, mit 50 µl DNase versetzt, für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert und schließlich bei 600 x g und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, konnte das Zellsediment in etwa 30 ml 25 %igem Percoll resuspendiert und 20 Minuten bei 600 x g und 4 °C zentrifugiert werden. Danach wurden die Mukusschicht mit einer Plastik-Pasteur-Pipette abgenommen und die Zellen in 50 ml RPMI in 50 ml Greiner Röhrchen aufgenommen. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation (300 x g, 4 °C) wurden der Überstand verworfen, das Zellsediment in 5 ml RPMI resuspendiert, und die fünf- bis zehnfache Menge an Lysispuffer zugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine erneute Zentrifugation (300 x g, 4 °C, zehn Minuten), der Überstand wurde verworfen und die Zellen konnten in RPMI-Zellkulturmedium aufgenommen werden. Die Zellsuspension wurde mit Trypanblau verdünnt, sodass die Anzahl der mononukleären Zellen in der Zellsuspension mit Hilfe einer modifizierten Neubauer Zählkammer (4 x 16 Kleinstquadrate) und nachfolgender Formel bestimmt werden konnte.

Gesamtzellzahl in der Zellsuspension = Mittelwert der gezählten Anzahl lebender Zellen x Volumen der Zellsuspension in ml x Verdünnung in Trypanblau x Kammerfaktor (10^4)

Die ermittelte Zellzahl ermöglichte eine Einstellung der Zellzahl für die nachfolgenden Färbeschritte. Hierbei wurden pro FACS-Röhrchen 1×10^6 Zellen eingesetzt. Weiterhin wurde ein Milliliter (= 1×10^7 Zellen) für den Proliferationstest in ein 15 ml Greiner Röhrchen überführt und auf Eis bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Für die Färbung der intraepithelialen Lymphozyten wurden zunächst jeweils 100 µl der Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen pipettiert, diese mit den primären Antikörpern (Tabelle 19) versetzt und fünfundzwanzig Minuten unter Lichtschutz inkubiert. Nachfolgend konnten pro FACS-Röhrchen 2 ml FACS-Puffer hinzugegeben, die Röhrchen zentrifugiert (452 x g, 4 °C, fünf Minuten) und der Überstand verworfen werden. Je 50 µl der passenden vorverdünnten sekundären Antikörper (Tabelle 20) wurden anschließend in die FACS-Röhrchen pipettiert und die Proben erneut für 25 Minuten auf Eis und unter Lichtschutz

inkubiert. Nachdem in jedes FACS-Röhrchen 2 ml FACS-Puffer pipettiert wurden, konnten die Proben bei 452 x g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert werden. Im direkten Anschluss erfolgte die durchflusssytometrische Analyse der mit primären und sekundären Antikörpern versehenen Proben.

Die durchflusssytometrische Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms CellQuest pro® (Becton Dickinson Bioscience, San José, USA). Zunächst wurden die Zellgröße (dargestellt im Forward Scatter, FSC-H) und Zellgranularität (dargestellt im Sideward Scatter, SSC-H) gegeneinander aufgetragen, um die Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten sowie die Zellreste (Debris) zu charakterisieren (analog zum Vorgehen bei der Phänotypisierung der Leukozyten in der Sauenmilch, Abbildung 5a). Zur Auswertung der SWC3⁺-, CD 16⁺- und CD45⁺-Zellen wurde eine Region (gate) um alle detektierten Leukozyten gelegt (Leukozytengate R1, Abbildung 5a analog), zur Auswertung der übrigen CD-markierten Leukozyten hingegen lediglich eine Region um die Lymphozyten (Lymphozytengate R2, Abbildung 6a analog). Anschließend wurden die Färbungen FITC und PE in einem zweiten Diagramm gegeneinander aufgetragen und die Zellpopulationen aus R1 beziehungsweise R2 eingefügt. In einem dritten Diagramm wurde zur Differenzierung der lebenden und toten Zellen der DNA-Farbstoff Propidiumiodid (PI) eingesetzt. Dieser wird lediglich in tote Zellen eingebaut, sodass um den Anteil der PI-positiven Zellen ein drittes gate (R3) zum Nachweis der toten Zellen gelegt wurde. Indem R3 im Anschluss aus dem FITC/PE-Diagramm ausgeschlossen wurde, konnte anhand der Festlegung von Quadranten der relative Anteil an vitalen FITC-positiven, PE-positiven sowie FITC- und PE-doppeltpositiven Zellen ermittelt werden (Abbildung 5b analog). Tabelle 21 gibt einen Überblick über die detektierten Leukozytenpopulationen.

Tabelle 19: Übersicht über die in der vorliegenden Studie eingesetzten primären Antikörper sowie Angabe der Verwendungszeitpunkte.

Primärer Antikörper	Isotyp	Bezeichnung, Hersteller	Menge/ 100 µl Zellsuspension	Verwendung
CD2	IgG2a	MSA4, α CD2 pig, Institut für Immunologie, VU Wien	33 µl	Milch, Blut, Darm
CD5	IgG1	α CD5 (9G12), Fa. VMRD	50 µl einer 1:200 Verdünnung	Milch, Blut, Darm
CD4	IgG2b	Mouse Anti-porcine CD4a-FITC (74-12-4), Southern Biotechnology Ass.	2 µl	Milch, Blut, Darm
CD8	IgG2a	Mouse Anti-porcine CD8a-RPE (76-2-11), Southern Biotechnology Ass.	1 µl	Milch, Blut, Darm
CD25	IgG1	α porcine CD25 (K231.3B2), Fa. Acris	1 µl	Milch, Blut
CD21	IgG1	Mouse Anti-porcine CD21 (BB6-11C9.6), Southern Biotechnology Ass.	1 µl	Milch, Blut
SWC 3	IgG2b	Purified Mouse Anti-pig monocyte/granulocyte SWC3a (74-22-15A), Becton Dickinson	50 µl einer 1:200 Verdünnung	Milch, Blut, Darm
MHC II	IgG2a	α -MHC class II (MSA 3), Fa. VMRD	50 µl einer 1:200 Verdünnung	Milch, Blut, Darm
CD14	IgG2b	α -porcine CD14 (MCA1218), Fa. Serotec	1 µl	Milch, Blut
CD8β	IgG2a	α -porcine CD8β (PG164A), Fa. VMRD	1 µl	Blut, Darm
TCR1	IgG1	α -po-TCR1-N4 (PGBL22-A), Fa. VMRD	0,5 µl	Blut, Darm
CD45RC	IgG1	CD45RC (3a56), Institut für Immunologie, VU Wien	33 µl	Blut
CD45	IgG1	CD45 (K252-1E4), Fa. Serotec	1 µl	Darm
CD16	IgG1	Anti porcine CD16 (G7), Fa. Acris	1 µl	Darm

CD: Cluster of differentiation

Tabelle 20: Übersicht über die in der vorliegenden Studie eingesetzten sekundären Antikörper.

Sekundärer Antikörper, Bezeichnung	Farbstoff	Hersteller	Verdünnung
Anti-Mouse IgG1 PE (1072-09)	Phycoerythrin (PE)	Southern Biotechnology Ass.	1:200
Anti-Mouse IgG2a FITC (1080-02)	Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)	Southern Biotechnology Ass.	1:100
Anti-Mouse IgG2b FITC (1090-02)	Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)	Southern Biotechnology Ass.	1:100

Tabelle 21: Übersicht über die in der vorliegenden Studie nachgewiesene Expression bestimmter Oberflächenmoleküle von Immunzellen zur Detektion spezifischer Leukozytenpopulationen.

CD-Expression	Nachweis	Literatur
CD2 ⁺ CD5 ⁻	NK-Zellen	Duncan et al., 1989; Yang und Parkhouse, 1996; Gerner et al., 2009
CD2 ⁻ CD5 ⁺	B-Zellen und CD2 ⁻ - $\gamma\delta$ -T-Zellen	Saalmüller und Bryant, 1994; Pescovitz et al., 1998; Charerntantanakul und Roth, 2007
CD2 ⁺ CD5 ⁺	$\alpha\beta$ -T-Zellen (total), CD2 ⁺ - $\gamma\delta$ -T-Zellen	Saalmüller und Bryant, 1994; Pescovitz et al., 1998; Charerntantanakul und Roth, 2007
CD4 ⁺ CD8 α ⁻	T-Helfer-Zellen	Saalmüller et al., 2002; Charerntantanakul und Roth, 2007
CD4 ⁺ CD8 α ^{high}	Zytotoxische T-Zellen	Pauly et al., 1996; Arriens et al., 1998; Saalmüller et al., 2002; Charerntantanakul und Roth, 2007
CD4 ⁺ CD8 α ^{low}	CD8 α ⁺ - $\gamma\delta$ -T-Zellen, NK-Zellen	Saalmüller et al., 2002; Charerntantanakul und Roth, 2007
CD4 ⁺ CD8 α ^{low}	Aktivierte T-Helfer-Zellen	Bailey et al., 1992; Saalmüller et al., 2002
CD4 ⁺ CD25 ⁻	T-Helfer-Zellen	Saalmüller et al., 2002
CD4 ⁺ CD25 ⁺	Aktivierte T-Helfer-Zellen	Saalmüller, 2006; Gerner et al., 2009
CD5 ⁺ MHCII ⁺	Antigenpräsentierende Zellen (B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen, ggf. T-Zellen), NK-Zellen	
CD5 ⁺ MHCII ⁺	B-Zellen, ggf. T-Zellen (ruhende CD8 ⁺ -Zellen)	Saalmüller et al., 1991; Butler et al, 2006; Saalmüller, 2006
CD21 ⁺ SWC3 ⁻	B-Zellen	Butler et al., 2006
CD21 ⁺ SWC3 ⁺	Myeloide Zellen (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen)	Lunney und Pescovitz, 1987; Piriou-Guzylack und Salmon, 2008; Martín de la Fuente et al., 2009
CD16 ⁺	NK-Zellen, Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen	Halloran et al., 1994; Youinou et al., 2002; Piriou-Guzylack und Salmon, 2008
SWC3 ⁺	Myeloide Zellen (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten)	Piriou-Guzylack und Salmon, 2008
CD14 ⁺	Makrophagen (im Blut Monozyten)	Piriou-Guzylack und Salmon, 2008
TCRI ⁺	$\gamma\delta$ -T-Zellen	Yang und Parkhouse, 1996; Charerntantanakul und Roth, 2007
CD45RC ⁺	Wird in aktivierten T-Helfer-Zellen herunterreguliert; auch Expression auf NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen möglich	Zuckermann et al., 1998; Saalmüller et al., 2002; Gerner et al., 2009
CD45 ⁺	Porzine Leukozyten	Herniston et al., 2009

CD: Cluster of differentiation; NK Zellen: Natural Killer Zellen

3.5.2.4 Proliferation der Lymphozyten aus dem Blut und aus dem Darm

Die Aktivierung und Proliferation antigenspezifischer Lymphozyten stellen entscheidende Prozessschritte bei der Initiierung spezifischer Immunreaktionen dar. In diesem Kontext ist die Quantifizierung der Aktivierung beziehungsweise Proliferation von Lymphozyten für die Untersuchung immunologischer Fragestellungen unerlässlich.

Die mitogene Stimulation von Lymphozyten *in vitro* ist eine adäquate Methode, um die Stimulation durch spezifische Antigene nachzustellen (Roitt, 1995; Janeway und Travers, 1997).

In der vorliegenden Studie wurden hierfür drei unterschiedliche Mitogene aus der Gruppe der Lektine eingesetzt. Das Pokeweed Mitogen (PWM) stimuliert sowohl B- als auch T-Lymphozyten (Ruscetti et al., 1977), wohingegen das Phythämagglutinin M (PHA-M) und das Concanavalin A (Con A) ausschließlich T-Zellen stimulieren (Abbas et al., 1996). Hierbei werden unterschiedliche Subpopulationen der T-Lymphozyten angesprochen. Die von Con A, nicht jedoch von PHA-M aktivierten CD4⁺-Zellen unterdrücken in Anwesenheit von CD8⁺-Zellen die Immunglobulinsynthese durch B-Zellen (Sleasman et al., 1991). Zugleich weisen die durch Con A aktivierten CD4⁺-Zellen Helferfunktionen für B-Zellen auf. Man bezeichnet diese beiden Subpopulationen auch als Suppressor-Inducer-Zellen (CD45RA) und Helfer-Inducer-Zellen (CDw29) (Cruse und Lewis, 1995). Con A stimuliert vorwiegend die CD45RA-Expression auf CD4-Lymphozyten, wohingegen bei der Stimulation durch PHA-M eine Abhängigkeit von der T-Zell-Konzentration vorliegt. Bei nur geringem Vorkommen der T-Lymphozyten werden durch PHA-M vorrangig Helfer-Inducer-Zellen stimuliert, wohingegen die Zellen bei einem hohen Vorkommen von T-Lymphozyten Suppressorfunktion entwickeln (Dronov, 2005).

Der Nachweis stimulierter Lymphozyten erfolgte über den Einbau des Thymidin-Analogons Bromdeoxyuridin (BrdU) in neu synthetisierte DNA der proliferierenden Zellen anstelle des Thymidins. Durch die Anlagerung von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern an das BrdU kann der Anteil der neugebildeten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt werden.

Zur Detektion des eingebauten Bromdeoxyuridins wurde ein FITC-konjugierter anti-BrdU-Antikörper eingesetzt, zudem erfolgte zur näheren Spezifizierung der mit den Mitogenen stimulierten Lymphozyten eine Färbung mit einem PE-konjugierten anti-CD5-Antikörper, der hauptsächlich T-Zellen und in einem geringen Maße auch B-Zellen markiert.

Die in einem Diagramm bei der durchflusszytometrischen Messung gegeneinander aufgetragenen FITC- und PE-Färbungen ermöglichen eine genaue Charakterisierung der proliferierten Zellen. Nur die FITC- und PE-doppeltpositiven Zellen stellen demnach neugebildete Zellen dar, da die PE-einfach positiven Zellen auch T- und B-Lymphozyten enthalten, die nicht proliferiert (= BrdU negativ) sind (Abbildung 6).

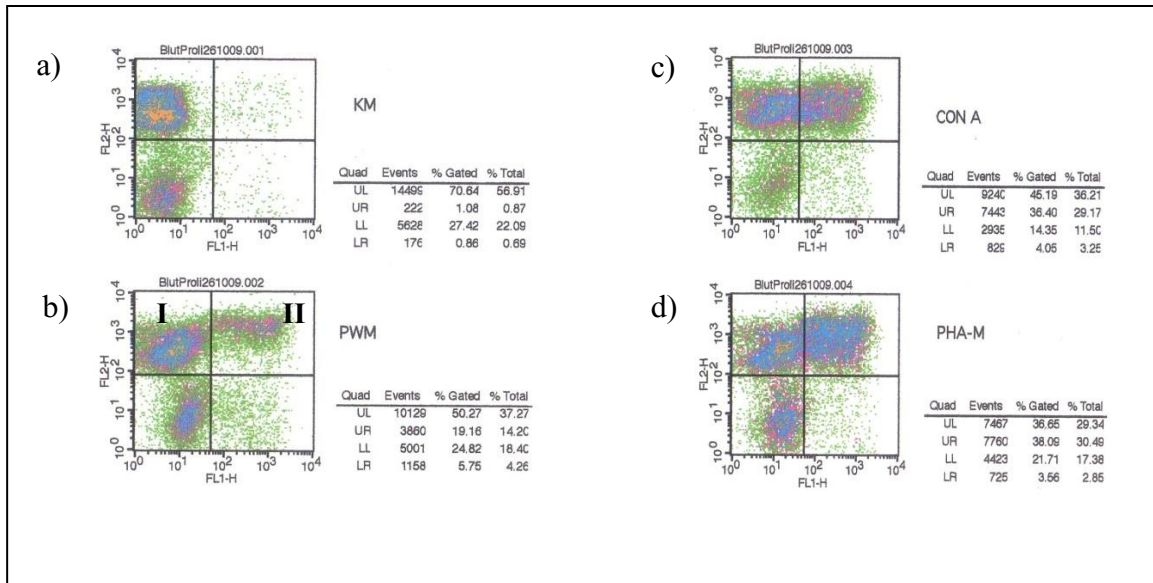


Abbildung 6: Darstellungsformen der mit PWM, Con A und PHA-M stimulierten peripheren mononukleären Blutzellen im in der vorliegenden Studie genutzten durchflusszytometrischen Verfahren. Auftragung der Färbung mit Fluoreszeinisothiozyanat (FITC, zu sehen im FL1-H Detektor) gegenüber der Färbung mit Phycoerythrin (PE, zu sehen im FL2-H Detektor). Eingesetzt wurden ein FITC-konjugierter anti-BrdU-Antikörper zur Detektion der proliferierten Zellen und ein PE-konjugierter anti-CD5-Antikörper zum Nachweis der T- und B-Lymphozyten.

- a) Nicht Mitogen-stimulierte Zellen (Kontrolle = KM)
- b) PWM-stimulierte Zellen. Nur die FITC- und PE-doppelpositiven Zellen im rechten oberen Quadranten (upper right, UR (II)) stellen proliferierte Lymphozyten dar, da die PE-einfach positiven Zellen im linken oberen Quadranten (upper left, UL (I)) T- und B-Lymphozyten enthalten, die nicht proliferiert (= BrdU negativ) sind.
- c) Con A-stimulierte Zellen (UR)
- d) PHA-M-stimulierte Zellen (UR)

Der Ansatz für den Proliferationstest erfolgte unter sterilen Bedingungen. Zunächst wurden die im Rahmen der Lymphozyten-Phänotypisierung beiseite gestellten 1 ml Zellsuspension mit 1,5 ml Zellkulturmedium auf 1×10^7 Zellen/2,5 ml eingestellt. Dies entspricht einer für den Proliferationstest gewünschten Zelldichte von 4×10^6 ml/1 ml. Anschließend wurde die Zellsuspension in einem 15 ml Greiner Röhrchen auf Eis gelagert, sodass die Mitogen-Verdünnungen hergestellt werden konnten (Tabelle 22). Jeweils 25 µl eines Mitogens wurden in die Vertiefungen (Wells) einer 96-U-Well-Zellkulturplatte pipettiert, dabei wurden pro Tier sechs Wells für ein Mitogen vorgesehen. Als Kontrolle dienten sechs Wells mit je 25 µl Zellkulturmedium. Anschließend wurden jeweils 100 µl der Zellsuspension in die Wells pipettiert und die Platte für 48 Stunden in einem CO₂-Inkubator inkubiert. Nach 48 Stunden erfolgte die BrdU-Zugabe (12 µl pro Well; Verdünnung siehe Tabelle 23) und die Platte wurde für weitere 24 Stunden in einem CO₂-Inkubator inkubiert.

Tabelle 22: Übersicht über die in der vorliegenden Studie eingesetzten Mitogene.

Mitogen	Hersteller	Verdünnung
Pokeweed Mitogen (PWM)	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH	1:80
Concanavalin A (Con A)	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH	1:40
Phythämagglutinin M (PHA-M)	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH	1:20

Tabelle 23: Übersicht über die für die Lymphozytenproliferation eingesetzten Antikörper.

Antikörper	Farbstoff	Hersteller	Verdünnung
Primärer			
α CD5 (9G12)	-	Fa. VMRD	1:100
Sekundärer			
Anti-Mouse IgG1 PE (1072-09)	Phycoerythrin (PE)	Southern Biotechnology Ass.	1:100
Mouse anti-BrdU FITC	Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)	BD Biosciences Pharmingen	1:5

Nach der erneuten Inkubationszeit wurden die Zellen aus den Wells entnommen und unsteril weiterverarbeitet. Bei der Zellentnahme wurden die Zellsuspensionen gleicher Konditionierung (sechs Wells pro Konditionierung) in ein 15 ml Greiner Röhrchen überführt, sodass pro Tier 4 Greiner Röhrchen (Kontrolle, PWM, Con A, PHA-M) vorlagen. Es folgte eine Zentrifugation bei 400 x g, 4 °C und für fünf Minuten, anschließend wurde der Überstand bei -30°C eingefroren und das Zellsediment bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Die sich nun anschließende Permeabilisierung der Zellen verlief in den beiden Versuchsdurchgängen (Versuchsdurchgang A: 2008; Versuchsdurchgang B: 2009) unterschiedlich. Im Versuchsdurchgang A wurde das Zellsediment in dem noch im Greiner Röhrchen verbliebenen Medium resuspendiert. Anschließend wurden bei gleichzeitigem Vortexen tropfenweise 1 ml eiskaltes (-30 °C) 96 %iges Ethanol hinzugegeben und die Röhrchen für 15 Minuten zurück auf Eis gestellt. Im Gegensatz dazu wurde die Permeabilisierung im Versuchsdurchgang B mit FACS Perm2 durchgeführt, indem das Zellsediment in je 250 μ l resuspendiert wurde. Die Greiner Röhrchen blieben anschließend für 18 Stunden im Kühlschrank auf Eis gelagert. Die nachfolgenden Färbeschritte waren in beiden Versuchsdurchgängen wieder identisch. Nach Zusatz des Ethanols beziehungsweise von FACS Perm2 und entsprechender Inkubationszeit wurden jeweils 2 ml FACS-Puffer in die Greiner Röhrchen pipettiert und diese anschließend zentrifugiert (452 x g, 4 °C, 5 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 50 μ l des vorverdünnten CD5-Antikörpers (Tabelle 23) resuspendiert. Nach fünfundzwanzigminütiger Inkubation auf Eis wurden in jedes Greiner Röhrchen 2 ml FACS-Puffer pipettiert und diese anschließend zentrifugiert (400 x g, 4 °C, 5 Minuten). Im Folgenden konnten der Überstand verworfen und jeweils 50 μ l des vorverdünnten sekundären Antikörpers (Tabelle 23) aufgetragen werden. Nach erneuter Inkubation (25 Minuten auf Eis und unter Lichtschutz) erfolgte ein zweimaliger Waschvorgang, indem pro Greiner Röhrchen 2 ml FACS-Puffer hinzugegeben und diese bei 400 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert wurden. Anschließend wurden die Zellsedimente in jeweils 500 μ l Fixierlösung resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis

inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang mit 2 ml FACS-Puffer und anschließender Zentrifugation (400 x g, 4 °C, 5 Minuten) wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment in 200 µl verdünnter DNase (1:10 in DNase-Puffer verdünnt) resuspendiert. Die Greiner Röhren wurden mit Parafilm abgedeckt und für 30 Minuten in einem Inkubator bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 2 ml FACS-Puffer dazu pipettiert und die Greiner Röhren zentrifugiert (400 x g, 4 °C, 5 Minuten). Nachdem der Überstand verworfen wurde, konnten die Zellsedimente in 50 µl FITC-konjugiertem anti-BrdU-Antikörper (Tabelle 23) resuspendiert und anschließend für 30 Minuten auf Eis und unter Lichtschutz inkubiert werden. Nachfolgend wurden pro Greiner Röhren 2 ml FACS-Puffer hinzugegeben und diese bei 400 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Im direkten Anschluss erfolgte die durchflusszytometrische Messung der Proliferation der Lymphozyten. Die durchflusszytometrische Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms CellQuest pro® (Becton Dickinson Bioscience, San José, USA). Zur Identifizierung der Lymphozyten wurden in einem Diagramm zunächst die Zellgröße (dargestellt im Forward Scatter, FSC-H) und Zellgranularität (dargestellt im Sideward Scatter, SSC-H) gegeneinander aufgetragen und eine Region um die detektierten Leukozyten gelegt (Leukozytengate R1, Abbildung 5a analog). Anschließend wurden die Färbungen FITC und PE in einem zweiten Diagramm gegeneinander aufgetragen und die Zellpopulationen aus R1 eingefügt. Auf diese Weise konnte anhand der Festlegung von Quadranten der relative Anteil an FITC-positiven, PE-positiven sowie FITC- und PE-doppelt positiven Zellen ermittelt werden (Abbildung 5b analog; Abbildung 6). Die Darstellung der proliferierten Zellen erfolgte hierbei im rechten oberen Quadranten (FITC- und PE-doppelt positiven Zellen). Für die Auswertung der Proliferationsleistung der Lymphozyten konnte kein Stimulationsindex (prozentualer Anteil der proliferierten Zellen mit Mitogenbehandlung/prozentualer Anteil der proliferierten Zellen ohne Mitogenbehandlung) genutzt werden, da in einigen Fällen keine proliferierten Zellen ohne Mitogenbehandlung vorlagen. Aus diesem Grund wurde für die Auswertung der absolute Anteil der proliferierten Lymphozyten von den insgesamt detektierten Zellen herangezogen.

3.5.3 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Im Rahmen des vorliegenden Versuchsvorhabens wurden mit Hilfe eines Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) die Gehalte der Immunglobuline der Klassen G, A und M in der Sauenmilch an den Tagen ein, fünf und 14 post partum ermittelt. Weiterhin erfolgte eine Bestimmung der Immunglobulingehalte im Serum der Sauen am fünften Tag post partum sowie der Ferkel am Tag der Euthanasie. Tabelle 57 gibt einen Überblick über die für die ELISA-Untersuchungen eingesetzten Geräte, Materialien und Chemikalien.

3.5.3.1 Bestimmung der Immunglobulingehalte in der Milch und im Serum

Für die Immunglobulinbestimmung in der Sauenmilch wurden die Proben zunächst für drei Stunden bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde die entstandene Fett- und Kaseinschicht mit einer Kanüle perforiert, sodass die flüssige Phase entnommen und in ein 2

ml Eppendorf Gefäß überführt werden konnte. Es folgte eine erneute dreistündige Zentrifugation (10000 x g, 4 °C), sodass die hierbei gewonnene Flüssigkeit in ein weiteres Eppendorf Gefäß überführt werden konnte, um im Anschluss die Lipoproteine zu fällen. Hierfür wurden pro einem Milliliter Flüssigkeit 20 µl Dextransulfat (10 %ig) und 100 µl Kalziumchlorid (1 molar) hinzugegeben. Die Proben wurden für zehn Minuten bei 4 °C und 1500 x g zentrifugiert. Je Probe wurden 300 µl des Überstands in ein Eppendorf Gefäß überführt und bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

Für die nachfolgenden ELISA-Untersuchungen wurden in einem ersten Schritt 100 µl des verdünnten Beschichtungsantikörpers in die Wells einer 96-U-Well-Zellkulturplatte pipettiert und für eine Stunde inkubiert. Die Platte wurde nachfolgend dreimal gewaschen, indem eine ELISA-Waschlösung in die Wells gegeben und der Inhalt der Zellkulturplatte anschließend verworfen wurde. Nach den Waschungen konnten 200 µl einer ELISA-Blockierungslösung hinzupipettiert und die Platte für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Die Platte wurde erneut dreimal gewaschen. Anschließend wurden die Proben- und Standardansätze mit einer ELISA-Verdünnungslösung verdünnt (Tabellen 58 bis 61) und jeweils 100 µl der vorverdünnten Ansätze in die Wells pipettiert; für jede Probe beziehungsweise für die Standardlösungen wurden Doppelansätze gewählt. Nach einstündiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Platte erneut fünfmal gewaschen, danach konnten 100 µl des verdünnten Nachweisantikörpers hinzupipettiert werden. Die Platte wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend fünfmal gewaschen. Nachfolgend wurden jeweils 100 µl der TMB-Substratlösung in die Wells pipettiert. Nach fünfminütiger Inkubation unter Lichtschutz konnten jeweils 100 µl einer ELISA-Stopplösung in die Wells pipettiert und innerhalb der darauffolgenden 30 Minuten schließlich die Extinktion der einzelnen Proben- und Standardansätze mit einem Plattenleser bei 450 nm gemessen werden.

Die Auswertung der ermittelten Daten erfolgte mit Hilfe der Computer-Software Magellan6 (Tecan Trading AG, Schweiz). Zunächst wurde der Mittelwert aus den erhaltenen Extinktionen der Proben- und Standardansätze gebildet. Vom Mittelwert der Standardansätze wurde jeweils die Extinktion des Kontrollansatzes (Standard 8, Tabellen 59 bis 61) subtrahiert. Anschließend wurde eine Standardkurve festgelegt, indem die Immunglobulin-Konzentrationen in den Standardansätzen gegen die ermittelten Extinktionen dieser Ansätze aufgetragen wurden (Abbildung 7). Der Computer-gestützte Vergleich der erhaltenen Extinktionen aus den Proben mit den Datenpunkten der Standardkurve ermöglichte die Bestimmung der Immunglobulinkonzentrationen in den Probenansätzen.

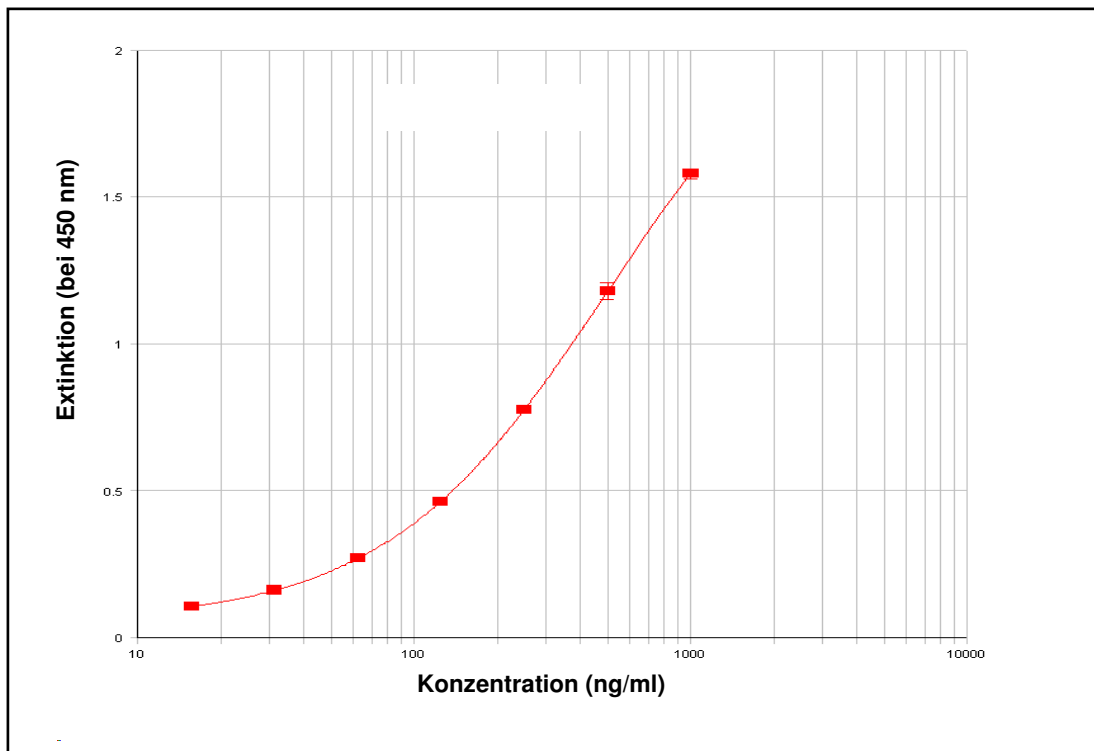


Abbildung 7: Standardkurve zur Bestimmung der IgA-Konzentration im Serum der Sauen und Ferkel (analog zur Bestimmung von IgG und IgM sowie zur Immunglobulinbestimmung in der Sauenmilch). Durch Verdünnung eines Referenzserums wurden in sieben Standardansätzen definierte Konzentrationen von IgA eingestellt. Anschließend wurden die 96-U-Well-Zellkulturplatte mit den Proben- und Standardansätzen in einem Plattenleser mit 450 nm bestrahlt und die Extinktionen der Ansätze bestimmt. Indem die IgA-Konzentrationen in den Standardansätzen gegen die ermittelten Extinktionen aufgetragen wurden, konnte eine Standardkurve festgelegt werden. Der Computer-gestützte Vergleich der erhaltenen Extinktionen aus den Proben mit den Werten der Standardkurve ermöglichte die Bestimmung der IgA-Konzentrationen in den Probenansätzen.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe von SPSS 17 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Zunächst wurde mit Hilfe des T-Tests beziehungsweise des Mann-Whitney-U-Tests auf Gleichheit der beiden Versuchsdurchgänge für die auszuwertenden Parameter geprüft. Aufgrund der gegebenen Gleichheit konnten im Rahmen des weiteren statistischen Vorgehens die Daten des ersten und zweiten Versuchsdurchgangs zusammenfassend betrachtet werden. Anschließend wurde unter Berücksichtigung der zu vergleichenden Gruppen auf Normalverteilung der Daten geprüft (Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk). Lag eine Normalverteilung vor, erfolgte die weitere statistische Auswertung anhand der ein- beziehungsweise mehrfaktoriellen Varianzanalyse, wobei das Inulin, die

unterschiedlich thermisch behandelten Ackerbohnen sowie im Fall der Milchproben der Laktationstag den jeweiligen unabhängigen Faktor und die ermittelten immunologischen Parameter die abhängigen Variablen darstellten und eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ (2-seitig) angesetzt wurde. Anschließend wurden zur Überprüfung auf Gruppenunterschiede die Post-Hoc-Tests nach Bonferroni und Scheffé bei Varianzgleichheit beziehungsweise nach Tamhane-T2 bei Varianzungleichheit genutzt. In den Fällen, in denen keine Normalverteilung gegeben war, wurden die Daten mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests verglichen, ebenfalls unter Berücksichtigung einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ (2-seitig). Aufgrund der im Rahmen des multiplen Testens problematischen Ermittlung signifikanter Gruppenunterschiede wurde für die Post-Hoc-Tests das Konfidenzintervall nach Bonferroni angepasst. Ein entsprechendes Vorgehen im Falle der Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests ist bei diesem statistischen Testverfahren nicht möglich. Die normalverteilten Daten werden in der nachfolgenden Darstellung der Ergebnisse entsprechend gekennzeichnet (*). Für die Kennzeichnung signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen werden Kleinbuchstaben verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Leistungsparameter

4.1.1 Gesundheitszustand der Tiere

Die Versuchstiere zeigten in beiden Versuchsdurchgängen keine schwerwiegenden gesundheitlichen Auffälligkeiten. Im ersten Versuchsdurchgang wurde bei einer Sau 14 Tage post partum eine erhöhte Körpertemperatur (39,7-40,0 °C) sowie eine reduzierte Futtermittelaufnahme festgestellt. Aus diesem Grund wurde von einer Milchprobennahme am 14. Tag post partum abgesehen. Da das betroffene Tier nicht medikamentös behandelt werden musste und die Symptome nach vier Tagen nicht mehr auftraten, konnten die Ferkel der Sau für die weiteren Probennahmen berücksichtigt werden.

Ebenfalls im ersten Versuchsdurchgang zeigten einige Ferkel einer anderen Sau Arthritiden, die antibiotisch behandelt werden mussten. Daher wurde auf eine Probennahme bei diesen Tieren verzichtet.

Im zweiten Versuchsdurchgang wurden keine Besonderheiten hinsichtlich des Gesundheitszustandes der Tiere festgestellt.

Aufgrund des Ausschlusses der in beschriebener Weise auffälligen Tiere vom Versuchsvorhaben wird von einer Darstellung der Beobachtungen an dieser Stelle abgesehen.

4.1.2 Reproduktionsspezifische Parameter

Bei der Erfassung reproduktionsspezifischer Merkmale konnte eine numerisch höhere Anzahl lebend geborener und abgesetzter Ferkel pro Wurf bei den Sauen der Inulingruppe aufgezeigt werden (Tabelle 24).

Tabelle 24: Vergleichende Darstellung reproduktionsspezifischer Parameter der Sauen der Kontroll- (K) und Inulingruppe (I). Anzahl der Ferkel pro Wurf, Median (Minimum-Maximum).

	K (n ¹ = 11)	I (n = 10)
*Insgesamt geborene Ferkel	10,0 (6,00-16,0)	11,5 (2,00-17,0)
*Lebend geborene Ferkel	9,00 (6,00-14,0)	11,0 (2,00-16,0)
Tot geborene Ferkel	0,00 (0,00-6,00)	0,00 (0,00-2,00)
*Abgesetzte Ferkel	8,00 (5,00-12,0)	10,5 (2,00-14,0)

¹Anzahl der gültigen Fälle; *normalverteilte Daten

4.1.3 Lebendmasse, Futtermittelaufnahme und Futtermittelaufwand

Bei den Saug- und Absetzferkeln konnten keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen hinsichtlich der Lebendmassezunahme festgestellt werden. Ebenso zeigten sich keine Unterschiede in der täglichen Futtermittelaufnahme sowie im Futtermittelaufwand. In diesem Kontext ist zu berücksichtigen, dass zur Ermittlung der durchschnittlichen täglichen Futtermittelaufnahme je Tier lediglich die tägliche Futtermittelaufnahme einer Tiergruppe mit vier bis sechs Ferkeln erfasst wurde und diese daher nicht statistisch ausgewertet werden konnte. Die Tabellen 25 und 26 fassen die ermittelten Daten im Versuchszeitraum zusammen.

Tabelle 25: Lebendmasse (kg) der Saugferkel in der zehntägigen Säugeperiode. Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I). Angaben pro Tier, Median (Minimum-Maximum).

	K (n ¹ = 8)	I (n = 8)
*Tag 1 p.p.	1,67 (1,04-1,84)	1,55 (0,97-2,03)
*Tag 3 p.p.	2,04 (1,24-2,27)	1,95 (1,07-2,45)
*Tag 7 p.p.	2,95 (2,20-4,10)	3,04 (2,06-3,59)
*Tag 10 p.p.	4,00 (2,77-4,38)	3,89 (2,34-4,47)

¹Anzahl der gültigen Fälle; *normalverteilte Daten

Tabelle 26: Übersicht über die rechnerisch¹ ermittelten Leistungsparameter bei den Absetzferkeln während des Versuchszeitraums. Vergleichende Darstellung zwischen den vier Fütterungsgruppen, die extrudierte beziehungsweise getoastete Ackerbohnen ohne (Kontrollgruppe (K)) oder mit Inulin (Inulingruppe (I)) erhielten. Angaben pro Tier, Mittelwert.

	Extrudierte Ackerbohnen		Getoastete Ackerbohnen	
	K (n ² = 8)	I (n = 8)	K (n = 8)	I (n = 8)
Futtermittelaufnahme (g)/Tag				
1. Woche	423	493	453	427
2. Woche	689	785	714	752
3. Woche	841	1005	878	976
Körpermasse (kg)				
Versuchsbeginn ³	14,8	14,3	14,2	13,5
Versuchsende ⁴	19,8	19,5	19,5	19,1
Futtermittelaufwand	2,28	2,61	2,26	2,30

¹Grundlage für die Berechnung der täglichen Einzeltierfuttermittelaufnahme bildete die täglich erfasste Futtermittelaufnahme pro Tiergruppe (n = 4-6); ²Anzahl der gültigen Fälle; ³Zeitpunkt des Absetzens (42. Tag p.p.); ⁴Tag 59 ±1 p.p.

4.2 Immunologische Parameter

4.2.1 Differentialblutbild

Für die ermittelten Blutparameter konnten sowohl bei den Saug- als auch bei den Absetzferkeln keine Unterschiede zwischen den einzelnen Fütterungsgruppen festgestellt werden (Tabellen 27 und 28).

Tabelle 27: Blutbild und Differentialblutbild der Saugferkel, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).

Messgröße	K (n¹ = 6)	I (n = 7)
*Erythrozyten (T/l)	4,46 (2,91-4,75)	3,76 (3,25-4,41)
Hämatokrit (l/l)	0,30 (0,20-0,31)	0,27 (0,23-0,30)
Hämoglobin (g/l)	86,0 (62,0-97,0)	86,0 (67,0-91,0)
*Leukozyten (G/l)	7,95 (4,80-12,6)	7,70 (5,60-11,5)
Segmentkernige Granulozyten (G/l)	3,60 (2,00-5,40)	2,90 (2,70-6,50)
*Segmentkernige Granulozyten (%)	43,0 (33,0-61,0)	50,0 (25,0-65,0)
*Lymphozyten (G/l)	3,85 (1,40-6,00)	3,20 (1,50-7,80)
*Lymphozyten (%)	48,0 (29,0-62,0)	39,0 (20,0-68,0)
*Monozyten (G/l)	0,35 (0,10-0,60)	0,30 (0,20-0,80)
Monozyten (%)	4,00 (3,00-5,00)	4,00 (2,00-9,00)
Eosinophile Granulozyten (G/l)	0,20 (0,10-0,50)	0,10 (0,00-0,80)
*Eosinophile Granulozyten (%)	3,00 (2,00-6,00)	2,00 (0,00-10,0)
Basophile Granulozyten (G/l)	0,00 (0,00-0,10)	0,00 (0,00-0,10)
Basophile Granulozyten (%)	0,00 (0,00-1,00)	0,00 (0,00-1,00)
Stabkernige Granulozyten (G/l)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,10)
Stabkernige Granulozyten (%)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-1,00)
*Thrombozyten (G/l)	376 (209-577)	565 (187-656)

¹Anzahl der gültigen Fälle; *normalverteilte Daten

Ergebnisse

Tabelle 28: Blutbild und Differentialblutbild der Absetzferkel, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen den vier Fütterungsgruppen, die extrudierte beziehungsweise getoastete Ackerbohnen ohne (Kontrollgruppe (K)) oder mit Inulin (Inulingruppe (I)) erhielten.

Messgröße	Extrudierte Ackerbohnen		Getoastete Ackerbohnen	
	K (n ¹ = 8)	I (n = 8)	K (n = 8)	I (n = 8)
Erythrozyten (T/l)	6,26 (5,28-7,71)	6,24 (5,21-6,90)	5,74 (5,25-7,36)	6,19 (5,73-6,75)
Hämatokrit (l/l)	0,31 (0,27-0,34)	0,30 (0,25-0,33)	0,30 (0,26-0,34)	0,30 (0,27-0,31)
*Hämoglobin (g/l)	105 (87,0-112)	97,5 (82,0-111)	98,0 (81,0-112)	98,0 (87,0-108)
Leukozyten (G/l)	14,2 (12,5-17,7)	15,1 (9,60-18,3)	14,8 (11,2-18,7)	16,8 (11,2-20,6)
*Segmentkernige Granulozyten (G/l)	4,80 (3,50-7,90)	4,80 (2,20-7,90)	4,95 (2,00-9,20)	6,80 (4,10-9,00)
*Segmentkernige Granulozyten (%)	31,0 (22,0-47,0)	39,0 (22,0-48,0)	36,5 (17,0-60,0)	38,5 (33,0-48,0)
Lymphozyten (G/l)	8,35 (6,00-11,7)	7,70 (4,00-12,8)	8,75 (5,20-9,40)	8,75 (6,00-11,1)
*Lymphozyten (%)	61,0 (46,0-74,0)	54,5 (42,0-72,0)	55,0 (34,0-75)	54,0 (44,0-61,0)
Monozyten (G/l)	0,60 (0,30-1,40)	0,70 (0,30-1,00)	0,75 (0,60-1,00)	0,80 (0,40-1,20)
Monozyten (%)	4,00 (2,00-9,00)	5,00 (3,00-6,00)	5,00 (4,00-9,00)	5,00 (4,00-7,00)
*Eosinophile Granulozyten (G/l)	0,25 (0,00-0,60)	0,20 (0,10-0,50)	0,20 (0,10-0,40)	0,35 (0,00-0,50)
Eosinophile Granulozyten (%)	1,50 (0,00-5,00)	1,00 (1,00-5,00)	1,50 (1,00-2,00)	2,00 (0,00-4,00)
Basophile Granulozyten (G/l)	0,00 (0,00-0,20)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,20)	0,00 (0,00-0,20)
Basophile Granulozyten (%)	0,00 (0,00-1,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-2,00)	0,00 (0,00-1,00)
Stabkernige Granulozyten (G/l)	0,00 (0,00-0,10)	0,00 (0,00-0,20)	0,00 (0,00-0,20)	0,00 (0,00-0,20)
Stabkernige Granulozyten (%)	0,00 (0,00-1,00)	0,00 (0,00-2,00)	0,00 (0,00-1,00)	0,00 (0,00-1,00)
Thrombozyten (G/l)	309 (200-415)	325 (207-416)	237 (188-480)	261 (199-426)

¹Anzahl der gültigen Fälle; *normalverteilte Daten

4.2.2 Phänotypisierung der Leukozyten in der Sauenmilch

Die Auswertung der Phänotypisierung der Leukozyten in der Sauenmilch erfolgte unter Berücksichtigung der insgesamt gemessenen Leukozyten (Leukozytengate) sowie ausschließlich für die detektierten Lymphozyten (Lymphozytengate).

Insgesamt konnte eine zeitabhängige Veränderung der Leukozytenzusammensetzung der Sauenmilch nachgewiesen werden. Mit Ausnahme der CD5⁺-Zellen und CD21⁺-Zellen sowie im Lymphozytengate zusätzlich der CD4⁺CD8⁻-Zellen zeigte sich eine für alle eingesetzten Oberflächenmarker differierende Expression im Laufe der Laktation.

Die zeitabhängigen Veränderungen betrafen insbesondere die Zeitintervalle von ersten zum fünften sowie vom ersten zum 14. Tag post partum. Darüber hinaus wurden im Leukozytengate eine zwischen dem fünften und 14. Tag post partum verschiedene Expression der CD4⁺CD25⁻-, CD5⁻MHCII⁺-, CD21⁻SWC3⁺- sowie CD14⁺- und im Lymphozytengate eine in diesem Zeitraum unterschiedliche Expression der CD4⁻CD8 α ⁺-Oberflächenmoleküle nachgewiesen.

Die Tabellen 29 und 30 zeigen die zeitabhängigen Veränderungen der Leukozytenzusammensetzung in der Sauenmilch unter Berücksichtigung aller detektierten Leukozyten auf, in den Tabellen 31 und 32 erfolgt eine fokussierte Darstellung der Lymphozytenverteilung in der Sauenmilch zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Laktation.

Ergebnisse

Tabelle 29: Leukozytenverteilung in der Sauennmilch zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Laktation. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).

Leukozyten, %	Tag 1 p.p.		Tag 5 p.p.		Tag 14 p.p.	
	K (n ¹ = 7)	I (n = 8)	K (n = 11)	I (n = 9)	K (n = 10)	I (n = 10)
CD2 ⁺ CD5 ⁻	7,31 (2,94-19,1) ^a	7,07 (1,11-17,8) ^a	2,06 (0,44-8,59) ^b	1,91 (0,25-4,17) ^b	1,10 (0,05-4,85) ^b	1,60 (0,04-4,98) ^b
CD2 ⁻ CD5 ⁺	0,25 (0,09-0,52)	0,36 (0,19-0,94)	0,46 (0,02-2,32)	0,70 (0,02-3,16)	0,54 (0,03-1,02)	0,70 (0,31-1,97)
CD2 ⁻ CD5 ⁺	2,39 (0,50-11,4) ^{ab}	3,22 (1,06-11,0) ^a	1,22 (0,36-8,16) ^{bc}	0,87 (0,16-10,0) ^{bc}	0,48 (0,13-1,46) ^{cd}	1,17 (0,17-5,20) ^{bd}
*CD4 ⁺ CD8 α ⁻	10,7 (1,29-23,8) ^{ab}	18,0 (3,55-34,9) ^a	6,95 (1,04-20,2) ^{ab}	3,49 (0,51-10,6) ^{ab}	3,17 (0,10-8,07) ^b	3,69 (1,28-9,38) ^{ab}
CD4 ⁻ CD8 α ⁺	3,53 (0,39-8,11) ^{ab}	2,75 (1,58-5,04) ^a	1,58 (0,23-5,64) ^{ab}	0,92 (0,08-7,47) ^{abcd}	0,78 (0,17-1,90) ^c	1,04 (0,55-5,06) ^{bd}
CD4 ⁺ CD8 α ⁺	1,06 (0,32-8,79) ^{ab}	2,70 (0,54-9,70) ^a	0,88 (0,39-4,56) ^b	0,32 (0,12-5,47) ^{bc}	0,43 (0,07-0,94) ^c	0,72 (0,02-4,36) ^{bc}
*CD4 ⁺ CD25 ⁻	10,1 (1,56-15,5) ^{ac}	14,8 (3,02-22,3) ^a	7,19 (0,79-15,9) ^{abc}	3,06 (0,52-9,72) ^{abc}	3,15 (0,11-6,24) ^b	3,45 (0,83-9,04) ^c
CD4 ⁺ CD25 ⁺	5,22 (0,85-16,1) ^a	5,82 (3,09-24,5) ^a	1,56 (0,41-5,90) ^b	1,00 (0,20-9,45) ^{bc}	0,49 (0,09-1,78) ^c	0,84 (0,07-2,38) ^{bc}
CD5 ⁺ MHCII ⁺	3,37 (1,57-17,8) ^a	4,16 (0,93-14,7) ^a	2,23 (0,39-8,06) ^b	1,98 (0,20-3,38) ^b	0,75 (0,09-2,41) ^c	1,23 (0,05-12,2) ^{bc}
CD5 ⁺ MHCII ⁺	1,53 (0,36-10,1) ^{ab}	2,45 (0,69-10,2) ^a	0,91 (0,25-4,26) ^{bc}	0,98 (0,08-7,21) ^{bc}	0,35 (0,09-1,09) ^c	1,16 (0,05-4,91) ^b
CD21 ⁺ SWC3 ⁻	0,11 (0,06-0,47) ^a	0,87 (0,20-2,22) ^b	0,30 (0,18-0,89) ^a	0,34 (0,03-1,39) ^{ab}	0,29 (0,04-0,54) ^a	0,51 (0,02-0,72) ^a
CD21 ⁺ SWC3 ⁺	55,6 (42,3-98,6) ^a	63,0 (7,74-89,8) ^a	15,0 (1,30-40,3) ^b	5,97 (1,23-61,6) ^b	7,50 (0,38-93,4) ^{bc}	56,3 (9,92-85,9) ^{ac}
*CD14 ⁺	76,3 (52,4-99,0) ^a	75,2 (58,6-95,4) ^{ac}	32,1 (11,3-57,1) ^b	23,8 (8,42-73,3) ^b	58,9 (11,9-86,3) ^{bc}	57,8 (20,5-97,0) ^{abc}

¹Anzahl der gültigen Fälle; *normalverteilte Daten

CD = cluster of differentiation; CD2⁺CD5⁻: NK-Zellen; CD2⁻CD5⁺: B-Zellen und CD2⁻ γ δ -T-Zellen; CD2⁺CD5⁺: α β -T-Zellen (total), CD2⁺ γ δ -T-Zellen; CD4⁺CD8⁻: T-Helfer-Zellen; CD4⁺CD8 α ⁺: zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen; CD4⁺CD8⁺: aktivierte T-Helfer-Zellen; CD4⁺CD25⁺: T-Helfer-Zellen; CD4⁺CD25⁺: aktivierte T-Helfer-Zellen; CD5⁺MHCII⁺: antigenpräsentierende Zellen (B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen, ggf. T-Zellen), NK-Zellen; CD5⁺MHCII⁺: B-Zellen, ggf. T-Zellen (ruhende CD8⁺-Zellen); CD21⁺SWC3⁻: B-Zellen; CD21⁺SWC3⁺: myeloide Zellen (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen); CD14⁺: Makrophagen

Unterschiedliche Exponenten in einer Zeile: signifikante Unterschiede (p \leq 0,05) zwischen den Gruppen

Tabelle 30: Leukozytenverteilung in der Sauenmilch zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Laktation. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Zusammenfassende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).

Leukozyten, %	Tag 1 p.p. (K+I) ¹		Tag 5 p.p. (K+I) ²		Tag 14 p.p. (K+I) ²	
CD2 ⁺ CD5 ⁻	7,31	(1,11-19,1) ^a	2,03	(0,25-8,59) ^b	1,24	(0,04-4,98) ^b
CD2 ⁻ CD5 ⁺	0,27	(0,09-0,94)	0,50	(0,02-3,16)	0,61	(0,03-1,97)
CD2 ⁺ CD5 ⁺	2,97	(0,50-11,4) ^a	1,19	(0,16-10,0) ^b	0,96	(0,13-5,20) ^b
CD4 ⁺ CD8 α ⁻	13,6	(1,29-34,9) ^a	4,37	(0,51-20,2) ^b	3,17	(0,10-9,38) ^b
CD4 ⁻ CD8 α ⁺	3,32	(0,39-8,11) ^a	1,29	(0,08-7,47) ^{ab}	0,91	(0,17-5,06) ^b
CD4 ⁺ CD8 α ⁺	1,88	(0,32-9,70) ^a	0,77	(0,12-5,47) ^b	0,64	(0,02-4,36) ^b
CD4 ⁺ CD25 ⁻	10,9	(1,56-22,3) ^a	3,99	(0,52-15,9) ^b	3,34	(0,11-9,04) ^b
CD4 ⁺ CD25 ⁺	5,68	(0,85-24,5) ^a	1,04	(0,20-9,45) ^b	0,64	(0,07-2,38) ^c
CD5 ⁻ MHCII ⁺	3,78	(0,93-17,8) ^a	2,11	(0,20-8,06) ^b	1,11	(0,05-12,2) ^c
CD5 ⁺ MHCII ⁺	2,04	(0,36-10,2) ^a	0,95	(0,08-7,21) ^b	0,83	(0,05-4,91) ^b
CD21 ⁺ SWC3 ⁻	0,43	(0,06-2,22)	0,32	(0,03-1,39)	0,37	(0,02-0,72)
CD21 ⁻ SWC3 ⁺	55,6	(7,74-98,6) ^a	12,6	(1,23-61,6) ^b	45,8	(0,38-93,4) ^c
*CD14 ⁺	76,3	(52,4-99,0) ^a	27,9	(8,42-73,3) ^b	58,9	(11,9-97,0) ^c

¹n (Anzahl der gültigen Fälle) = 15; ²n = 20; *normalverteilte Daten

CD = cluster of differentiation; CD2⁺CD5⁻: NK-Zellen; CD2⁻CD5⁺: B-Zellen und CD2⁻ $\gamma\delta$ -T-Zellen; CD2⁺CD5⁺: $\alpha\beta$ -T-Zellen (total), CD2⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen; CD4⁺CD8⁻: T-Helfer-Zellen; CD4⁻CD8 α ⁺: zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen; CD4⁺CD8⁺: aktivierte T-Helfer-Zellen; CD4⁺CD25⁻: T-Helfer-Zellen; CD4⁺CD25⁺: aktivierte T-Helfer-Zellen; CD5⁻MHCII⁺: antigenpräsentierende Zellen (B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen, ggf. T-Zellen), NK-Zellen; CD5⁺MHCII⁺: B-Zellen, ggf. T-Zellen (ruhende CD8⁺-Zellen); CD21⁺SWC3⁻: B-Zellen; CD21⁻SWC3⁺: myeloide Zellen (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen); CD14⁺: Makrophagen

Unterschiedliche Exponenten in einer Zeile: signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den Gruppen

Ergebnisse

Tabelle 31: Lymphozytenverteilung in der Saugmilch zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Laktation. Angaben in % der detektierten Lymphozyten, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).

Leukozyten, %	Tag 1 p.p.		Tag 5 p.p.		Tag 14 p.p.	
	K (n ¹ = 7)	I (n = 8)	K (n = 8)	I (n = 6)	K (n = 7)	I (n = 8)
CD2 ⁺ CD5 ⁻	11,0 (3,84-18,4) ^a	6,17 (2,44-12,0) ^a	4,32 (0,72-10,4) ^{ab}	2,94 (0,78-16,0) ^{bc}	1,13 (0,14-3,17) ^c	1,92 (0,42-7,10) ^{bc}
*CD2 ⁺ CD5 ⁺	4,93 (0,44-6,30)	6,95 (1,82-11,9)	3,58 (0,66-7,48)	2,76 (0,19-7,16)	2,89 (0,44-8,36)	6,03 (1,13-15,3)
CD2 ⁺ CD5 ⁺	55,9 (27,6-75,1) ^a	44,7 (25,0-56,8) ^a	24,5 (2,22-60,8) ^b	18,6 (1,17-68,2) ^b	7,49 (1,18-14,9) ^b	7,99 (3,43-39,3) ^b
CD4 ⁺ CD8 α ⁻	5,03 (1,52-18,3)	4,41 (0,45-10,9)	2,18 (0,39-38,9)	6,69 (0,40-44,7)	2,06 (0,26-16,5)	2,68 (0,77-26,7)
CD4 ⁺ CD8 α ⁺	36,7 (14,0-69,7) ^a	40,7 (16,7-50,8) ^a	21,2 (2,37-55,5) ^b	16,6 (0,45-54,9) ^{abbc}	7,08 (1,04-15,2) ^c	8,15 (3,57-23,4) ^b
CD4 ⁺ CD8 α ⁺	18,8 (4,05-39,0) ^a	12,9 (2,94-16,7) ^{ab}	8,44 (0,74-24,4) ^{bc}	7,42 (0,95-20,2) ^{bc}	1,66 (0,21-8,74) ^c	3,53 (0,89-11,2) ^c
CD4 ⁺ CD25 ⁻	13,2 (4,09-29,3) ^a	10,5 (4,00-12,8) ^a	3,16 (1,81-34,8) ^{ab}	11,7 (0,76-40,3) ^{ab}	3,98 (1,99-15,9) ^{ab}	5,20 (2,07-21,2) ^b
CD4 ⁺ CD25 ⁺	6,70 (4,04-39,9) ^{ac}	7,13 (6,14-16,8) ^a	4,60 (0,77-21,8) ^b	4,97 (0,12-15,9) ^{bc}	1,27 (0,36-2,67) ^b	1,75 (0,22-4,85) ^b
CD5 ⁺ MHCII ⁺	9,47 (3,00-26,8) ^a	6,07 (1,85-19,2) ^{ac}	3,38 (1,70-7,43) ^b	3,04 (0,96-7,86) ^b	1,64 (0,22-12,0) ^b	2,19 (0,52-12,7) ^{bc}
CD5 ⁺ MHCII ⁺	39,5 (21,7-59,3) ^a	29,2 (23,3-58,4) ^a	13,7 (1,55-34,9) ^{bc}	11,5 (1,13-61,5) ^{abbc}	4,76 (0,59-5,82) ^b	6,15 (1,83-42,3) ^c
CD21 ⁺	0,42 (0,06-1,21) ^a	0,87 (0,20-2,22) ^b	0,41 (0,18-0,89) ^a	0,73 (0,03-1,39) ^{ab}	0,21 (0,04-0,54) ^a	0,51 (0,09-0,72) ^a

Anzahl der gültigen Fälle; *normalverteilte Daten

CD = cluster of differentiation; CD2⁺CD5⁻: NK-Zellen; CD2⁺CD5⁺: B-Zellen und CD2⁻ γ δ -T-Zellen; CD2⁺CD5⁺: α β -T-Zellen (total), CD2⁻ γ δ -T-Zellen; CD4⁺CD8⁻: T-Helfer-Zellen; CD4⁺CD8 α ⁺: zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen; CD4⁺CD8⁺: aktivierte T-Helfer-Zellen; CD4⁺CD25⁻: T-Helfer-Zellen; CD4⁺CD25⁺: aktivierte T-Helfer-Zellen; CD5⁺MHCII⁺: antigenpräsentierende Zellen (B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen, ggf. T-Zellen), NK-Zellen; CD5⁺MHCII⁺: B-Zellen, ggf. T-Zellen (ruhende CD8⁺-Zellen); CD21⁺: B-Zellen

Unterschiedliche Exponenten in einer Zeile: signifikante Unterschiede (p \leq 0,05) zwischen den Gruppen

Tabelle 32: Lymphozytenverteilung in der Sauenmilch zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Laktation. Angaben in % der detektierten Lymphozyten, Median (Minimum-Maximum). Zusammenfassende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).

Leukozyten, %	Tag 1 p.p. (K+I) ¹	Tag 5 p.p. (K+I) ²	Tag 14 p.p. (K+I) ¹
CD2 ⁺ CD5 ⁻	8,44 (2,44-18,4) ^a	3,47 (0,72-16,0) ^b	1,35 (0,14-7,10) ^b
*CD2 ⁻ CD5 ⁺	5,13 (0,44-11,9)	3,58 (0,19-7,48)	4,33 (0,44-15,3)
CD2 ⁺ CD5 ⁺	50,3 (25,0-75,1) ^a	24,5 (1,17-68,2) ^b	7,49 (1,18-39,3) ^b
CD4 ⁺ CD8 α ⁻	4,76 (0,45-18,3)	2,94 (0,39-44,7)	2,43 (0,26-26,7)
*CD4 ⁻ CD8 α ⁺	39,9 (14,0-69,7) ^{ab}	21,1 (0,45-55,5) ^b	7,08 (1,04-23,4) ^c
CD4 ⁺ CD8 α ⁺	15,1 (2,94-39,0) ^a	8,44 (0,74-24,4) ^b	3,30 (0,21-11,2) ^b
CD4 ⁺ CD25 ⁻	11,1 (4,00-29,3) ^a	7,06 (0,76-40,3) ^{ab}	4,44 (1,99-21,2) ^b
CD4 ⁺ CD25 ⁺	7,12 (4,04-39,9) ^a	4,60 (0,12-21,8) ^b	1,37 (0,22-4,85) ^b
CD5 ⁻ MHCII ⁺	7,11 (1,85-26,8) ^a	3,38 (0,96-7,86) ^b	1,67 (0,22-12,7) ^b
CD5 ⁺ MHCII ⁺	33,9 (21,7-59,3) ^a	12,8 (1,13-61,5) ^b	5,56 (0,59-42,3) ^b
*CD21 ⁺	0,47 (0,06-2,22)	0,47 (0,03-1,39)	0,25 (0,04-0,72)

¹n (Anzahl der gültigen Fälle) = 15; ²n = 14; *normalverteilte Daten

CD = cluster of differentiation; CD2⁺CD5⁻: NK-Zellen; CD2⁺CD5⁺: B-Zellen und CD2⁻ $\gamma\delta$ -T-Zellen; CD2⁺CD5⁺: $\alpha\beta$ -T-Zellen (total), CD2⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen; CD4⁺CD8⁻: T-Helfer-Zellen; CD4⁻CD8 α ⁺: zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen; CD4⁺CD8⁺: aktivierte T-Helfer-Zellen; CD4⁺CD25⁻: T-Helfer-Zellen; CD4⁺CD25⁺: aktivierte T-Helfer-Zellen; CD5⁻MHCII⁺: antigenpräsentierende Zellen (B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen, ggf. T-Zellen), NK-Zellen; CD5⁺MHCII⁺: B-Zellen, ggf. T-Zellen (ruhende CD8⁺-Zellen); CD21⁺: B-Zellen

Unterschiedliche Exponenten in einer Zeile: signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den Gruppen

Neben den beschriebenen Veränderungen in der Leukozytenzusammensetzung der Sauenmilch in Abhängigkeit vom Laktationstag konnte darüber hinaus zu einigen Messzeitpunkten ein Unterschied zwischen den Fütterungsgruppen nachgewiesen werden ($p \leq 0,05$). Unter Berücksichtigung sowohl des Leukozyten- als auch Lymphozytengates konnten am ersten Tag p.p. eine höhere Anzahl CD21⁺-Zellen sowie am 14. Tag p.p. eine höhere Anzahl CD4⁻CD8 α ⁺- und CD5⁺MHCII⁺-Zellen in den Inulingruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen detektiert werden. Bei Betrachtung des Leukozytengates wurde zudem in der Inulingruppe eine höhere Anzahl CD4⁺CD25⁻-Zellen als in der Kontrollgruppe nachgewiesen (Tabellen 29 und 31).

4.2.3 Phänotypisierung der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)

Die Phänotypisierung der peripheren mononukleären Blutzellen der Saug- und Absetzferkel ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen. Die Tabellen 33 und 34 zeigen den Anteil der detektierten Lymphozyten im Blut der Ferkel beider Altersgruppen auf.

Tabelle 33: Leukozytenverteilung im Blut der Saugferkel am zehnten Lebenstag. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).

Leukozyten, %	K (n¹ = 8)	I (n = 8)
CD2 ⁺ CD5 ⁻	20,1 (18,0-33,6)	22,3 (11,4-39,7)
*CD2 ⁻ CD5 ⁺	20,1 (14,0-31,4)	17,6 (7,25-23,2)
CD2 ⁺ CD5 ⁺	30,2 (22,6-45,6)	28,9 (18,4-44,1)
CD4 ⁺ CD8 ^{α-}	20,2 (7,27-40,3)	14,4 (8,53-33,2)
*CD4 ⁻ CD8 ^{α+}	16,8 (0,85-27,0)	20,4 (0,35-33,4)
CD4 ⁺ CD8 ^{α+}	3,70 (1,55-31,0)	2,38 (1,96-32,8)
CD4 ⁺ CD25 ⁻	10,6 (3,50-30,3)	9,96 (2,95-34,5)
*CD4 ⁺ CD25 ⁺	3,05 (0,01-5,32)	2,60 (0,01-7,41)
CD5 ⁻ MHCII ⁺	20,1 (13,9-28,8)	15,4 (12,1-27,0)
*CD5 ⁺ MHCII ⁺	5,12 (1,46-8,93)	3,43 (1,86-7,15)
CD21 ⁺ SWC3 ⁻	16,2 (13,8-30,2)	14,7 (11,3-29,6)
*CD21 ⁻ SWC3 ⁺	8,82 (5,91-18,3)	7,31 (5,20-15,4)
*CD14 ⁺	8,21 (2,52-12,9)	7,17 (0,88-9,12)
*TCR1 ⁺	39,0 (21,2-53,6)	26,6 (12,3-58,7)
*CD45RC ⁺	77,8 (69,8-87,9)	73,8 (60,6-81,1)

¹Anzahl der gültigen Fälle; *normalverteilte Daten

CD = cluster of differentiation; CD2⁺CD5⁻: NK-Zellen; CD2⁻CD5⁺: B-Zellen und CD2⁻γδ-T-Zellen; CD2⁺CD5⁺: αβ-T-Zellen (total), CD2⁺γδ-T-Zellen; CD4⁺CD8⁻: T-Helfer-Zellen; CD4⁻CD8^{α+}: zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen; CD4⁺CD8⁺: aktivierte T-Helfer-Zellen; CD4⁺CD25⁻: T-Helfer-Zellen; CD4⁺CD25⁺: aktivierte T-Helfer-Zellen; CD5⁻MHCII⁺: antigenpräsentierende Zellen (B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, ggf. T-Zellen), NK-Zellen; CD5⁺MHCII⁺: B-Zellen, ggf. T-Zellen (ruhende CD8⁺-Zellen); CD21⁺SWC3⁻: B-Zellen; CD21⁻SWC3⁺: myeloide Zellen (Monozyten, Granulozyten, dendritische Zellen); CD14⁺: Monozyten; TCR1⁺: γδ-T-Zellen; CD45RC⁺: wird in aktivierten T-Helfer-Zellen herunterreguliert; auch Expression auf NK-Zellen und γδ-T-Zellen möglich

Tabelle 34: Leukozytenverteilung im Blut der Absetzferkel. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen den vier Fütterungsgruppen, die extrudierte beziehungsweise getoastete Ackerbohnen ohne (Kontrollgruppe (K)) oder mit Inulin (Inulingruppe (I)) erhielten.

Leukozyten, %	Extrudierte Ackerbohnen		Getoastete Ackerbohnen	
	K (n ¹ = 8)	I (n = 8)	K (n = 8)	I (n = 8)
*CD2 ⁺ CD5 ⁻	16,6 (11,1-21,0)	17,5 (10,4-23,7)	17,1 (10,3-20,0)	13,1 (8,40-22,2)
*CD2 ⁻ CD5 ⁺	25,4 (15,8-43,0)	20,3 (13,6-47,1)	24,7 (16,8-31,7)	28,9 (14,3-45,5)
*CD2 ⁺ CD5 ⁺	30,8 (24,0-38,8)	35,5 (18,1-42,3)	34,4 (23,0-40,3)	29,6 (12,9-43,4)
CD4 ⁺ CD8 α ⁻	6,67 (2,90-13,5)	5,11 (2,55-11,9)	6,72 (4,66-10,2)	6,10 (2,33-16,2)
*CD4 ⁻ CD8 α ⁺	26,1 (13,3-34,6)	26,3 (12,7-36,0)	21,5 (17,3-28,7)	20,9 (16,7-34,1)
*CD4 ⁺ CD8 α ⁺	4,53 (1,91-9,95)	7,17 (1,87-9,11)	6,63 (2,29-10,5)	6,41 (2,42-9,03)
*CD4 ⁺ CD25 ⁻	10,8 (4,97-13,8)	9,58 (4,91-17,1)	12,1 (5,65-13,6)	8,98 (3,45-17,2)
CD4 ⁺ CD25 ⁺	2,31 (0,03-3,91)	2,00 (0,02-3,04)	2,44 (0,00-4,02)	1,92 (0,01-2,87)
*CD5 ⁺ MHCII ⁺	20,3 (15,2-30,2)	24,6 (14,3-34,3)	24,1 (20,5-28,1)	19,9 (16,6-26,5)
*CD5 ⁺ MHCII ⁻	10,1 (2,82-26,4)	15,5 (6,23-19,8)	17,1 (5,82-25,8)	13,4 (5,55-22,4)
*CD21 ⁺ SWC3 ⁻	18,2 (13,6-32,3)	20,5 (15,0-24,6)	19,8 (17,2-28,8)	17,3 (8,43-23,3)
CD21 ⁺ SWC3 ⁺	6,57 (1,60-10,8)	4,95 (2,13-11,6)	6,16 (3,09-16,5)	7,86 (2,40-11,1)
CD14 ⁺	6,82 (2,96-10,7)	5,92 (2,64-10,9)	6,49 (4,18-16,2)	7,68 (4,96-9,31)
*TCRI ⁺	33,5 (15,0-57,9)	30,7 (17,9-52,6)	29,8 (20,4-46,7)	39,0 (23,2-60,8)
CD45RC ⁺	82,3 (78,4-92,5)	85,3 (73,5-88,9)	82,5 (72,6-87,6)	80,4 (76,5-91,5)

¹Anzahl der gültigen Fälle; *normalverteilte Daten

CD = cluster of differentiation; CD2⁺CD5⁻: NK-Zellen; CD2⁻CD5⁺: B-Zellen und CD2⁻ γ δ -T-Zellen; CD2⁺CD5⁺: α β -T-Zellen (total), CD2⁻ γ δ -T-Zellen; CD4⁺CD8⁻: T-Helfer-Zellen; CD4⁻CD8 α ⁺: zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen; CD4⁺CD8⁺: aktivierte T-Helfer-Zellen; CD4⁺CD25⁻: T-Helfer-Zellen; CD4⁺CD25⁺: aktivierte T-Helfer-Zellen; CD5⁺MHCII⁺: antigenpräsentierende Zellen (B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, ggf. T-Zellen), NK-Zellen; CD5⁺MHCII⁻: B-Zellen, ggf. T-Zellen (ruhende CD8⁺-Zellen); CD21⁺SWC3⁻: B-Zellen; CD21⁺SWC3⁺: myeloide Zellen (Monozyten, Granulozyten, dendritische Zellen); CD14⁺: Monozyten; TCRI⁺: γ δ -T-Zellen; CD45RC⁺: wird in aktivierten T-Helfer-Zellen herunterreguliert; auch Expression auf NK-Zellen und γ δ -T-Zellen möglich

Der Vergleich zwischen den Saug- und Absetzferkeln konnte deutliche altersabhängige Veränderungen in der Leukozytenverteilung im Blut der Ferkel aufzeigen. Insgesamt nahm der prozentuale Anteil der B-Zellen ($CD21^+SWC3^-$) sowie der zytotoxischen T-Zellen ($CD4^-CD8\alpha^+$) mit steigendem Lebensalter zu, wohingegen eine Abnahme der T-Helfer-Zellen ($CD4^+CD8\alpha^-$), NK-Zellen ($CD2^+CD5^-$) und der myeloiden Zellen ($CD21^-SWC3^+$) bei den Absetzferkeln im Vergleich zu den Saugferkeln festgestellt wurde.

Tabelle 35 gibt einen Überblick über die altersabhängigen Veränderungen in der Leukozytenverteilung im Blut der Ferkel unter Berücksichtigung der Fütterungsgruppen. In Tabelle 36 werden die altersabhängigen Effekte zusammenfassend für die Gruppen dargestellt.

Tabelle 35: Leukozytenverteilung im Blut der Saug- und Absetzferkel. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).

Leukozyten, %	Saugferkel		Absetzferkel ¹	
	K (n ² = 8)	I (n = 8)	K (n = 16)	I (n = 16)
CD2 ⁺ CD5 ⁻	20,1 (18,0-33,6) ^{ac}	22,3 (11,4-39,7) ^a	17,1 (10,3-21,0) ^b	14,5 (8,40-23,7) ^{bc}
*CD2 ⁺ CD5 ⁺	20,1 (14,0-31,4) ^{ab}	17,6 (7,25-23,2) ^a	25,4 (15,8-43,0) ^{ab}	26,9 (13,6-47,1) ^b
*CD2 ⁺ CD5 ⁺	30,2 (22,6-45,6)	28,9 (18,4-44,1)	33,1 (23,0-40,3)	34,3 (12,9-43,4)
CD4 ⁺ CD8 α ⁻	20,2 (7,27-40,3) ^a	14,4 (8,53-33,2) ^a	6,67 (2,90-13,5) ^b	5,33 (2,33-16,2) ^b
*CD4 ⁺ CD8 α ⁺	16,8 (0,85-27,0) ^a	20,4 (0,35-33,4) ^{ab}	22,5 (13,3-34,6) ^{ab}	23,9 (12,7-36,0) ^b
CD4 ⁺ CD8 α ⁺	3,70 (1,55-31,0) ^{ab}	2,38 (1,96-32,8) ^a	5,41 (1,91-10,5) ^b	6,84 (1,87-9,11) ^b
CD4 ⁺ CD25 ⁻	10,6 (3,50-30,3)	9,96 (2,95-34,5)	11,5 (4,97-13,8)	8,98 (3,45-17,2)
*CD4 ⁺ CD25 ⁺	3,05 (0,01-5,32)	2,60 (0,01-7,41)	2,44 (0,00-4,02)	2,00 (0,01-3,04)
CD5 ⁺ MHCII ⁺	20,1 (13,9-28,8)	15,4 (12,1-27,0)	23,8 (15,2-30,2)	21,4 (14,3-34,3)
*CD5 ⁺ MHCII ⁺	5,12 (1,46-8,93) ^a	3,43 (1,86-7,15) ^a	11,8 (2,82-26,4) ^b	15,1 (5,55-22,4) ^b
CD21 ⁺ SWC3 ⁻	16,2 (13,8-30,2) ^{ab}	14,7 (11,3-29,6) ^a	19,3 (13,6-32,3) ^b	19,6 (8,43-24,6) ^{ab}
*CD21 ⁺ SWC3 ⁺	8,82 (5,91-18,3)	7,31 (5,20-15,4)	6,16 (1,60-16,5)	6,08 (2,13-11,6)
CD14 ⁺	8,21 (2,52-12,9)	7,17 (0,88-9,12)	6,79 (2,96-16,2)	6,65 (2,64-10,9)
*TCRI ⁺	39,0 (21,2-53,6)	26,6 (12,3-58,7)	31,4 (15,0-57,9)	37,3 (17,9-60,8)
*CD45RC ⁺	77,8 (69,8-87,9) ^{ab}	73,8 (60,6-81,1) ^a	82,4 (72,6-92,5) ^b	81,5 (73,5-91,5) ^b

¹Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe und der Inulingruppe unter zusammenfassender Betrachtung der Gruppen, die extrudierte beziehungsweise getostete Ackerbohnen erhielten; ²Anzahl der gültigen Fälle; *normalverteilte Daten

CD = cluster of differentiation; CD2⁺CD5⁻: NK-Zellen; CD2⁺CD5⁺: B-Zellen und CD2⁻ γ δ -T-Zellen; CD2⁺CD5⁺: α β -T-Zellen (total), CD2⁺ γ δ -T-Zellen; CD4⁺CD8⁻: T-Helfer-Zellen; CD4⁺CD8 α ⁺: zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen; CD4⁺CD8⁺: aktivierte T-Helfer-Zellen; CD4⁺CD25⁻: T-Helfer-Zellen; CD4⁺CD25⁺: aktivierte T-Helfer-Zellen; CD5⁺MHCII⁺: antigenpräsentierende Zellen (B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, ggf. T-Zellen); CD5⁺MHCII⁺: B-Zellen, ggf. T-Zellen (ruhende CD8⁺-Zellen); CD21⁺SWC3⁻: B-Zellen; CD21⁺SWC3⁺: myeloide Zellen (Monozyten, Granulozyten, dendritische Zellen); CD14⁺: Monozyten; TCRI⁺: γ δ -T-Zellen; CD45RC⁺: wird in aktivierten T-Helfer-Zellen herunterreguliert; auch Expression auf NK-Zellen und γ δ -T-Zellen möglich

Unterschiedliche Exponenten in einer Zeile: signifikante Unterschiede (p \leq 0,05) zwischen den Gruppen

Tabelle 36: Leukozytenverteilung im Blut der Saug- und Absetzferkel. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Zusammenfassende Darstellung der Kontroll- (K) und Inulingruppe (I).

Leukozyten, %	Saugferkel (K+I) ¹	Absetzferkel (K+I) ²
CD2 ⁺ CD5 ⁻	20,3 (11,4-39,7) ^a	15,6 (8,40-23,7) ^b
*CD2 ⁻ CD5 ⁺	17,9 (7,25-31,4) ^a	26,8 (13,6-47,1) ^b
*CD2 ⁺ CD5 ⁺	30,2 (18,4-45,6)	33,6 (12,9-43,4)
*CD4 ⁺ CD8 α ⁻	17,2 (7,27-40,3) ^a	6,55 (2,33-16,2) ^b
*CD4 ⁻ CD8 α ⁺	18,3 (0,35-33,4) ^a	23,2 (12,7-36,0) ^b
CD4 ⁺ CD8 α ⁺	2,56 (1,55-32,8) ^a	6,39 (1,87-10,5) ^b
CD4 ⁺ CD25 ⁻	9,96 (2,95-34,5)	10,3 (3,45-17,2)
*CD4 ⁺ CD25 ⁺	2,83 (0,01-7,41)	2,41 (0,00-4,02)
*CD5 ⁻ MHCII ⁺	18,3 (12,1-28,8)	22,8 (14,3-34,3)
*CD5 ⁺ MHCII ⁺	4,34 (1,46-8,93) ^a	14,7 (2,82-26,4) ^b
CD21 ⁺ SWC3 ⁻	15,7 (11,3-30,2) ^a	19,6 (8,43-32,3) ^b
CD21 ⁻ SWC3 ⁺	8,28 (5,20-18,3) ^a	6,16 (1,60-16,5) ^b
CD14 ⁺	7,82 (0,88-12,9)	6,66 (2,64-16,2)
*TCR1 ⁺	33,4 (12,3-58,7)	32,0 (15,0-60,8)
*CD45RC ⁺	76,4 (60,6-87,9) ^a	82,2 (72,6-92,5) ^b

¹n (Anzahl der gültigen Fälle) = 16; ²n = 32; *normalverteilte Daten

CD = cluster of differentiation; CD2⁺CD5⁻: NK-Zellen; CD2⁻CD5⁺: B-Zellen und CD2⁻ γ δ -T-Zellen; CD2⁺CD5⁺: α β -T-Zellen (total), CD2⁺ γ δ -T-Zellen; CD4⁺CD8⁻: T-Helfer-Zellen; CD4⁻CD8 α ⁺: zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen; CD4⁺CD8⁺: aktivierte T-Helfer-Zellen; CD4⁺CD25⁻: T-Helfer-Zellen; CD4⁺CD25⁺: aktivierte T-Helfer-Zellen; CD5⁻MHCII⁺: antigenpräsentierende Zellen (B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, ggf. T-Zellen), NK-Zellen; CD5⁺MHCII⁺: B-Zellen, ggf. T-Zellen (ruhende CD8⁺-Zellen); CD21⁺SWC3⁻: B-Zellen; CD21⁻SWC3⁺: myeloide Zellen (Monozyten, Granulozyten, dendritische Zellen); CD14⁺: Monozyten; TCR1⁺: γ δ -T-Zellen; CD45RC⁺: wird in aktivierten T-Helfer-Zellen herunterreguliert; auch Expression auf NK-Zellen und γ δ -T-Zellen möglich

Unterschiedliche Exponenten in einer Zeile: signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den Gruppen

4.2.4 Phänotypisierung der intraepithelialen Leukozyten im Darm

Die Phänotypisierung der intraepithelialen Leukozyten im Darm der Saug- und Absetzferkel ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen. Die Tabellen 37 und 38 zeigen den Anteil der detektierten intraepithelialen Lymphozyten für die Ferkel beider Altersgruppen auf.

Tabelle 37: Verteilung der intraepithelialen Leukozyten im Darm der Saugferkel. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).

Leukozyten, %	K (n ¹ = 5)	I (n = 5)
*CD2 ⁺ CD5 ⁻	21,0 (3,88-36,2)	15,6 (8,11-23,9)
*CD2 ⁻ CD5 ⁺	1,47 (0,41-3,72)	2,59 (0,53-4,53)
*CD2 ⁺ CD5 ⁺	35,4 (4,25-41,9)	41,6 (9,80-61,6)
*CD4 ⁺ CD8 α ⁻	0,64 (0,06-1,23)	0,59 (0,00-1,74)
*CD4 ⁻ CD8 α ^{high}	32,5 (2,32-44,9)	33,5 (12,9-46,9)
*CD4 ⁺ CD8 α ^{low}	4,44 (2,09-13,5)	6,33 (0,89-7,46)
*CD5 ⁻ MHCII ⁺	10,7 (1,17-21,4)	4,71 (4,02-9,90)
*CD5 ⁺ MHCII ⁺	10,4 (0,68-19,5)	7,40 (2,84-15,6)
*CD16 ⁺	33,7 (0,92-43,7)	16,3 (6,45-59,8)
*SWC3 ⁺	2,92 (1,60-3,30)	2,02 (0,13-34,9)
*TCR1 ⁺	13,7 (1,30-25,8)	14,1 (5,15-23,5)
*CD45 ⁺	64,2 (4,76-72,2)	51,6 (13,8-86,0)

¹Anzahl der gültigen Fälle; *normalverteilte Daten

CD = cluster of differentiation; CD2⁺CD5⁻: NK-Zellen; CD2⁻CD5⁺: B-Zellen und CD2⁻ $\gamma\delta$ -T-Zellen; CD2⁺CD5⁺: $\alpha\beta$ -T-Zellen (total), CD2⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen; CD4⁺CD8⁻: T-Helfer-Zellen; CD4⁻CD8 α ^{high}: zytotoxische T-Zellen; CD4⁺CD8 α ^{low}: aktivierte T-Helfer-Zellen; CD5⁻MHCII⁺: antigenpräsentierende Zellen (B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen, ggf. T-Zellen), NK-Zellen; CD5⁺MHCII⁺: B-Zellen, ggf. T-Zellen (ruhende CD8⁺-Zellen); CD16⁺: NK-Zellen, Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen; SWC3⁺: myeloide Zellen (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen); TCR1⁺: $\gamma\delta$ -T-Zellen; CD45⁺: porcine Leukozyten

Ergebnisse

Tabelle 38: Verteilung der intraepithelialen Leukozyten im Darm der Absetzferkel. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen den vier Fütterungsgruppen, die extrudierte beziehungsweise getoastete Ackerbohnen ohne (Kontrollgruppe (K)) oder mit Inulin (Inulingruppe (I)) erhielten.

Leukozyten, %	Extrudierte Ackerbohnen		Getoastete Ackerbohnen	
	K (n ¹ = 8)	I (n = 8)	K (n = 8)	I (n = 8)
*CD2 ⁺ CD5 ⁻	22,1 (7,79-50,7)	27,7 (6,17-47,3)	26,3 (7,27-31,0)	23,4 (11,3-54,8)
CD2 ⁻ CD5 ⁺	1,36 (0,59-3,94)	1,26 (0,33-2,31)	2,24 (1,04-3,47)	2,02 (0,74-5,21)
CD2 ⁺ CD5 ⁺	68,1 (47,5-87,8)	65,6 (49,3-86,0)	67,8 (59,2-87,2)	69,1 (41,0-80,0)
CD4 ⁺ CD8 α ⁻	0,13 (0,03-0,63)	0,18 (0,02-0,69)	0,19 (0,07-0,59)	0,14 (0,05-0,27)
*CD4 ⁻ CD8 α ^{high}	57,9 (40,7-76,2)	56,4 (47,7-67,5)	61,6 (51,3-71,1)	60,4 (41,4-75,0)
*CD4 ⁺ CD8 α ^{low}	3,02 (1,33-6,35)	3,70 (1,12-9,93)	4,88 (2,42-7,89)	3,58 (1,43-9,75)
CD5 ⁺ MHCII ⁺	3,26 (0,05-26,3)	2,06 (0,56-14,5)	3,24 (0,49-15,5)	4,36 (0,99-11,3)
*CD5 ⁺ MHCII ⁺	16,6 (1,34-42,7)	17,1 (2,55-47,7)	19,5 (2,79-34,1)	26,2 (2,60-38,7)
*CD16 ⁺	26,2 (13,4-56,8)	30,6 (21,0-48,6)	28,1 (13,3-41,4)	36,1 (22,0-47,9)
SWC3 ⁺	11,7 (2,60-16,6)	7,24 (3,52-49,7)	8,90 (3,37-34,8)	11,1 (6,48-33,2)
TCR1 ⁺	17,1 (8,74-28,6)	22,2 (15,0-43,6)	19,7 (15,9-25,6)	20,1 (13,7-30,7)
CD45 ⁺	91,3 (57,7-99,0)	92,2 (84,6-96,8)	95,1 (68,4-99,0)	93,4 (63,5-98,4)

¹Anzahl der gültigen Fälle; *normalverteilte Daten

CD = cluster of differentiation; CD2⁺CD5⁻: NK-Zellen; CD2⁻CD5⁺: B-Zellen und CD2⁻ γ δ -T-Zellen; CD2⁺CD5⁺: α β -T-Zellen (total); CD2⁺ γ δ -T-Zellen; CD4⁺CD8⁻: T-Helfer-Zellen; CD4⁻CD8 α ^{high}: zytotoxische T-Zellen; CD4⁺CD8 α ^{low}: aktivierte T-Helfer-Zellen; CD5⁺MHCII⁺: antigenpräsentierende Zellen (B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen, ggf. T-Zellen), NK-Zellen; CD5⁺MHCII⁺: B-Zellen, ggf. T-Zellen (ruhende CD8⁺-Zellen); CD16⁺: NK-Zellen, Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen; SWC3⁺: myeloide Zellen (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen); TCR1⁺: γ δ -T-Zellen; CD45⁺: porzine Leukozyten

Im altersabhängigen Vergleich zeigten sich zwischen den Saug- und Absetzferkeln signifikante Unterschiede hinsichtlich der Expression der detektierten Oberflächenmoleküle. Es konnte ein im Vergleich zu den Saugferkeln höherer Anteil der $\alpha\beta$ -T-Zellen und $CD2^+$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen ($CD2^+CD5^+$) sowie der zytotoxischen T-Zellen ($CD4^-CD8^{\text{high}}$) bei den Absetzferkeln festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wiesen die Saugferkel einen etwas höheren Anteil an T-Helfer-Zellen ($CD4^+CD8\alpha^-$) auf. Die intraepithelialen NK-Zellen ($CD2^+CD5^-$) und myeloischen Zellen ($SWC3^+$) stiegen hingegen mit zunehmendem Alter der Ferkel an. Die altersabhängigen Veränderungen hinsichtlich der Verteilung der intraepithelialen Lymphozyten sind in Tabelle 39 unter Berücksichtigung der Fütterungsgruppen dargestellt. In Tabelle 40 werden die altersabhängigen Effekte zusammenfassend für die Gruppen dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 39: Verteilung der intraepithelialen Leukozyten im Darm der Saug- und Absetzferkel. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe.

Leukozyten, %	Saugferkel		Absetzferkel ¹	
	K (n ² = 5)	I (n = 5)	K (n = 16)	I (n = 16)
*CD2 ⁺ CD5 ⁻	21,0 (3,88-36,2)	15,6 (8,11-23,9)	23,9 (7,27-50,7)	26,4 (6,17-54,8)
CD2 ⁻ CD5 ⁺	1,47 (0,41-3,72)	2,59 (0,53-4,53)	1,48 (0,59-3,94)	1,82 (0,33-5,21)
*CD2 ⁺ CD5 ⁺	35,4 (4,25-41,9) ^a	41,6 (9,80-61,6) ^a	67,8 (47,5-87,8) ^b	67,7 (41,0-86,0) ^b
CD4 ⁺ CD8 α ⁻	0,64 (0,06-1,23) ^{ab}	0,59 (0,00-1,74) ^a	0,16 (0,03-0,63) ^b	0,17 (0,02-0,69) ^b
*CD4 ⁺ CD8 α ^{high}	32,5 (2,32-44,9) ^a	33,5 (12,9-46,9) ^a	61,6 (40,7-76,2) ^b	59,3 (41,4-75,0) ^b
*CD4 ⁺ CD8 α ^{low}	4,44 (2,09-13,5)	6,33 (0,89-7,46)	3,76 (1,33-7,89)	3,70 (1,12-9,93)
CD5 ⁺ MHCII ⁺	10,7 (1,17-21,4)	4,71 (4,02-9,90)	3,26 (0,05-26,3)	2,53 (0,56-14,5)
*CD5 ⁺ MHCII ⁺	10,4 (0,68-19,5) ^{ac}	7,40 (2,84-15,6) ^a	19,5 (1,34-42,7) ^{bc}	22,9 (2,55-47,7) ^b
*CD16 ⁺	33,7 (0,92-43,7)	16,3 (6,45-59,8)	26,2 (13,3-56,8)	33,7 (21,0-48,6)
SWC3 ⁺	2,93 (1,60-3,30) ^a	2,02 (0,13-34,9) ^{ab}	10,2 (2,60-34,8) ^b	9,83 (3,52-49,7) ^b
*TCR1 ⁺	13,7 (1,30-25,8)	14,1 (5,15-23,5)	18,2 (8,74-28,6)	21,1 (13,7-43,6)
CD45 ⁺	64,2 (4,76-72,2) ^a	51,6 (13,8-86,0) ^a	95,1 (57,7-99,0) ^b	92,9 (63,5-98,4) ^b

¹Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe und der Inulingruppe unter zusammenfassender Betrachtung der Gruppen, die extrudierte beziehungsweise getoastete Ackerbohnen erhielten; ²Anzahl der gültigen Fälle; *normalverteilte Daten

CD = cluster of differentiation; CD2⁻CD5⁺: NK-Zellen; CD2⁻CD5⁺: B-Zellen und CD2⁻ γ δ -T-Zellen; CD2⁺CD5⁺: α β -T-Zellen (total), CD2⁺ γ δ -T-Zellen; CD4⁺CD8⁻: T-Helfer-Zellen; CD4⁺CD8 α ^{high}: zytotoxische T-Zellen; CD4⁺CD8^{low}: aktivierte T-Helfer-Zellen; CD5⁺MHCII⁺: antigenpräsentierende Zellen (B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen, ggf. T-Zellen), NK-Zellen; CD5⁺MHCII⁺: B-Zellen, ggf. T-Zellen (ruhende CD8⁺-Zellen); CD16⁺: NK-Zellen, Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen; SWC3⁺: myeloide Zellen (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen); TCR1⁺: γ δ -T-Zellen; CD45⁺: porzine Leukozyten

Unterschiedliche Exponenten in einer Zeile: signifikante Unterschiede (p \leq 0,05) zwischen den Gruppen

Tabelle 40: Verteilung der intraepithelialen Leukozyten im Darm der Saug- und Absetzferkel. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Zusammenfassende Darstellung der Kontroll- (K) und Inulingruppe (I).

Leukozyten, %	Saugferkel (K+I) ¹	Absetzferkel (K+I) ²
*CD2 ⁺ CD5 ⁻	18,5 (3,88-36,2) ^a	25,4 (6,17-54,8) ^b
CD2 ⁻ CD5 ⁺	1,66 (0,41-4,53)	1,69 (0,33-5,21)
*CD2 ⁺ CD5 ⁺	38,5 (4,25-61,6) ^a	67,7 (41,0-87,8) ^b
CD4 ⁺ CD8 α ⁻	0,62 (0,00-1,74) ^a	0,16 (0,02-0,69) ^b
*CD4 ⁻ CD8 α ^{high}	33,0 (2,32-46,9) ^a	60,7 (40,7-76,2) ^b
CD4 ⁺ CD8 α ^{low}	5,39 (0,89-13,5)	3,72 (1,12-9,93)
CD5 ⁺ MHCII ⁺	7,63 (1,17-21,4) ^a	2,99 (0,05-26,3) ^b
*CD5 ⁺ MHCII ⁺	9,77 (0,68-19,5) ^a	22,3 (1,34-47,7) ^b
*CD16 ⁺	31,2 (0,92-59,8)	31,1 (13,3-56,8)
SWC3 ⁺	2,47 (0,13-34,9) ^a	10,1 (2,60-49,7) ^b
TCR1 ⁺	13,9 (1,30-25,8)	19,3 (8,74-43,6)
CD45 ⁺	57,9 (4,76-86,0) ^a	93,6 (57,7-99,0) ^b

¹n (Anzahl der gültigen Fälle) = 10; ²n = 32; *normalverteilte Daten

CD = cluster of differentiation; CD2⁺CD5⁻: NK-Zellen; CD2⁻CD5⁺: B-Zellen und CD2⁻ γ δ -T-Zellen; CD2⁺CD5⁺: α β -T-Zellen (total), CD2⁺ γ δ -T-Zellen; CD4⁺CD8⁻: T-Helfer-Zellen; CD4⁻CD8 α ^{high}: zytotoxische T-Zellen; CD4⁺CD8 α ^{low}: aktivierte T-Helfer-Zellen; CD5⁺MHCII⁺: antigenpräsentierende Zellen (B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen, ggf. T-Zellen), NK-Zellen; CD5⁺MHCII⁺: B-Zellen, ggf. T-Zellen (ruhende CD8⁺-Zellen); CD16⁺: NK-Zellen, Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen; SWC3⁺: myeloide Zellen (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen); TCR1⁺: γ δ -T-Zellen; CD45⁺: porcine Leukozyten

Unterschiedliche Exponenten in einer Zeile: signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den Gruppen

4.2.5 Proliferation der Lymphozyten aus dem Blut und aus dem Darm

Die mitogenstimulierte Proliferation der Leukozyten aus dem Blut der Saugferkel konnte einen durch Con A stimulierten höheren Anteil der T-Zellen in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Inulingruppe aufzeigen (Tabelle 41). Bei den Absetzferkeln wurden keine Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen nachgewiesen (Tabelle 42).

Im altersabhängigen Vergleich der Proliferation der Lymphozyten aus dem Blut ließen sich signifikante Unterschiede zwischen den Kontroll- und Inulingruppen der Saug- und Absetzferkel nachweisen (Tabelle 43). Die PWM-stimulierten Zellen wurden in einer höheren Anzahl bei den Saugferkeln der Kontrollgruppe als bei den Absetzferkeln der Kontroll- beziehungsweise Inulingruppe beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte bei den Saugferkeln der Inulingruppe eine geringere Anzahl Con A-stimulierter Zellen als bei den Absetzferkeln der Kontroll- und Inulingruppe festgestellt werden.

Bei zusammenfassender Betrachtung der beiden Altersgruppen lag bei den Saugferkeln eine geringere Anzahl Con A-stimulierter sowie eine höhere Anzahl PWM-stimulierter Zellen als bei den Absetzferkeln vor (Tabelle 44).

Die intraepithelialen Lymphozyten aus dem Darm der Saugferkel zeigten keine mitogenstimulierte Proliferation. Bei den Absetzferkeln wurde eine durch PHA-M stimulierte Proliferation der T- Lymphozyten beobachtet, mit einer höheren Anzahl der proliferierten Zellen in der Fütterungsgruppe, die getoastete Ackerbohnen und Inulin bekam, im Vergleich zu der Kontroll- und Inulingruppe, die extrudierte Ackerbohnen erhielten (Tabelle 45).

Ergebnisse

Tabelle 41: Darstellung der mitogenstimulierten Proliferation der Leukozyten aus dem Blut der Saugferkel im Alter von zehn Tagen. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).

Mitogene	K (n ¹ = 4)		I (n = 6)	
*PWM	26,1	(24,7-32,8)	20,6	(6,55-28,2)
*Con A	45,6	(27,7-50,6) ^a	27,6	(16,8-42,8) ^b
*PHA-M	42,0	(36,7-47,3)	30,9	(11,0-40,9)

¹Anzahl der gültigen Fälle; *normalverteilte Daten

PWM: Pokeweed Mitogen; Con A: Concanavain A; PHA-M: Phytthämagglutinin M

Tabelle 42: Darstellung der mitogenstimulierten Proliferation der Leukozyten aus dem Blut der Absetzferkel. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen den vier Fütterungsgruppen, die extrudierte beziehungsweise getoastete Ackerbohnen ohne (Kontrollgruppe (K)) oder mit Inulin (Inulingruppe (I)) erhielten.

Mitogene	Extrudierte Ackerbohnen		Getoastete Ackerbohnen	
	K (n ¹ = 8)	I (n = 8)	K (n = 8)	I (n = 7)
*PWM	17,4	(8,70-26,8)	17,6	(11,0-22,5)
*Con A	40,2	(27,0-56,2)	47,4	(36,1-59,1)
PHA-M	31,4	(5,98-49,8)	35,5	(7,93-42,8)

¹Anzahl der gültigen Fälle; *normalverteilte Daten

PWM: Pokeweed Mitogen; Con A: Concanavain A; PHA-M: Phytthämagglutinin M

Tabelle 43: Darstellung der mitogenstimulierten Proliferation der Leukozyten aus dem Blut der Saug- und Absetzferkel. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).

Mitogene	Saugferkel		Absetzferkel ¹	
	K (n ² = 4)	I (n = 6)	K (n = 16)	I (n = 15)
*PWM	26,1 (24,7-32,8) ^a	20,6 (6,55-28,2) ^{ab}	17,4 (8,56-26,8) ^b	15,3 (11,0-23,1) ^b
*Con A	45,6 (27,7-50,6) ^{ab}	27,6 (16,8-42,8) ^a	40,4 (15,5-56,2) ^b	47,7 (34,2-64,8) ^b
*PHA-M	42,0 (36,7-47,3)	30,9 (11,0-40,9)	34,0 (5,08-49,8)	35,3 (5,35-54,4)

¹vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe und der Inulingruppe unter zusammenfassender Betrachtung der Gruppen, die extrudierte beziehungsweise getoastete Ackerbohnen erhielten; ²Anzahl der gültigen Fälle; *normalverteilte Daten

PWM: Pokeweed Mitogen; Con A: Concanavalin A; PHA-M: Phythämagglutinin M

Unterschiedliche Exponenten in einer Zeile: signifikante Unterschiede (p ≤ 0,05) zwischen den Gruppen

Tabelle 44: Darstellung der mitogenstimulierten Proliferation der Leukozyten aus dem Blut der Saug- und Absetzferkel. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Zusammenfassende Darstellung der Kontroll- (K) und Inulingruppe (I).

Mitogene	Saugferkel (K+I) ¹		Absetzferkel (K+I) ²	
	K	I	K	I
PWM	25,2 (6,55-32,8) ^a	20,6 (6,55-28,2) ^{ab}	16,6 (8,56-26,8) ^b	15,3 (11,0-23,1) ^b
*Con A	29,4 (16,8-50,6) ^a	27,6 (16,8-42,8) ^a	44,2 (15,5-64,8) ^b	47,7 (34,2-64,8) ^b
PHA-M	37,7 (11,0-47,3)	30,9 (11,0-40,9)	35,2 (5,08-54,4)	35,3 (5,35-54,4)

¹n (Anzahl der gültigen Fälle) = 10; ²n = 31; *normalverteilte Daten

PWM: Pokeweed Mitogen; Con A: Concanavalin A; PHA-M: Phythämagglutinin M

Unterschiedliche Exponenten in einer Zeile: signifikante Unterschiede (p ≤ 0,05) zwischen den Gruppen

Ergebnisse

Tabelle 45: Darstellung der PHA-M stimulierten Proliferation der intraepithelialen Leukozyten aus dem Darm der Absetzferkel. Angaben in % der detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen den vier Fütterungsgruppen, die extrudierte beziehungsweise getoastete Ackerbohnen ohne (Kontrollgruppe (K)) oder mit Inulin (Inulingruppe (I)) erhielten.

	Extrudierte Ackerbohnen		Getoastete Ackerbohnen	
Mitogen	K (n¹ = 8)	I (n = 8)	K (n = 8)	I (n = 8)
PHA-M	0,47 (0,00-1,76) ^a	0,91 (0,00-3,10) ^a	0,94 (0,00-3,28) ^{ab}	2,62 (1,62-4,98) ^b

¹Anzahl der gültigen Fälle

PHA-M: Phythämagglutinin M

Unterschiedliche Exponenten in einer Zeile: signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den Gruppen

4.2.6 Immunglobulingehalte in der Sauenmilch

Die Ermittlung der Immunglobulingehalte in der Sauenmilch am 1., 5. (± 1) und 14. (± 1) Tag post partum konnte keinen Einfluss durch den Einsatz von Inulin im Laktationsfutter der Sauen nachweisen. Insgesamt zeigte sich eine deutliche Abnahme der gemessenen Immunglobuline von 23,6 mg/ml im Kolostrum auf 5,28 mg/ml in der Sauenmilch am 14. Laktationstag (Abbildung 8). Bei differenzierter Betrachtung der Immunglobulinklassen wurde deutlich, dass insbesondere die IgG-Konzentration von 16,5 (3,08-42,1) mg/ml am ersten Tag post partum auf 1,71 (0,78-3,23) am fünften Tag post partum und 0,25 (0,14-3,48) mg/ml am 14. Tag post partum abnahm. Auch der IgM-Gehalt (mg/ml) reduzierte sich sowohl vom ersten zum fünften als auch vom fünften zum 14. Laktationstag, wohingegen die IgA-Konzentration lediglich vom ersten zum fünften Tag signifikant abnahm und kein Unterschied zwischen dem fünften und 14. Tag ermittelt wurde. Tabelle 46 zeigt die zeitabhängigen Veränderungen der Immunglobulingehalte in der Sauenmilch unter Berücksichtigung der verschiedenen Fütterungsgruppen auf, in Tabelle 47 erfolgt eine fokussierte Darstellung der Immunglobulingehalte in der Sauenmilch zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Laktation.

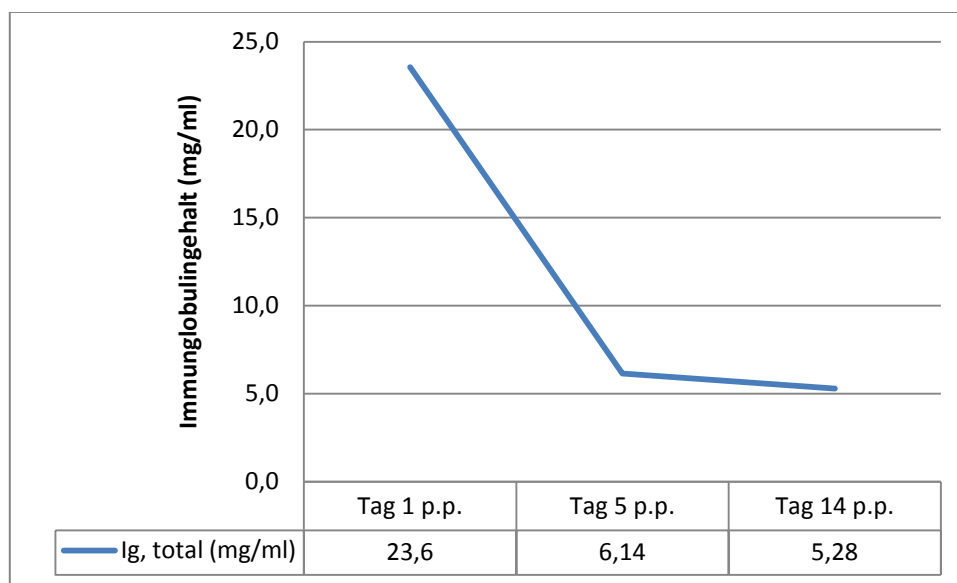


Abbildung 8: Zusammenfassende Darstellung der gemessenen Gehalte der Immunglobulinklassen G, A und M (Ig, total (mg/ml)) in der Sauenmilch an den Tagen 1, 5 (± 1) und 14 (± 1) post partum (p.p.). Die Berechnungsgrundlage bildeten die ermittelten Medianwerte der entsprechenden Immunglobulinklassen.

Ergebnisse

Tabelle 46: Immunglobulingehalt in der Sauennmilch zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Laktation. Angaben in mg/ml, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).

Immuno- globu- line	Tag 1 p.p.		Tag 5 p.p.		Tag 14 p.p.	
	K (n ¹ = 11)	I (n = 10)	K (n = 11)	I (n = 10)	K (n = 11)	I (n = 10)
IgG	20,1 (8,00-42,1) ^a	13,9 (3,08-31,0) ^a	1,62 (0,78-3,15) ^b	1,74 (0,81-3,23) ^b	0,27 (0,15-0,67) ^c	0,23 (0,14-3,48) ^c
IgA	3,76 (1,63-10,0) ^a	3,39 (0,72-11,9) ^{ab}	1,89 (0,98-3,78) ^{bc}	2,25 (0,84-4,38) ^{bd}	2,39 (1,53-4,17) ^{ad}	3,47 (0,87-6,00) ^{acd}
*IgM	3,73 (2,09-6,01) ^a	3,14 (1,44-6,11) ^a	2,52 (1,81-3,58) ^b	2,37 (1,24-3,93) ^b	2,04 (1,49-2,59) ^c	1,87 (1,00-3,85) ^{bc}

¹Anzahl der gültigen Fälle; *normalverteilte Daten

Unterschiedliche Exponenten in einer Zeile: signifikante Unterschiede (p ≤ 0,05) zwischen den Gruppen

Tabelle 47: Immunglobulingehalt in der Sauennmilch zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Laktation. Angaben in mg/ml, Median (Minimum-Maximum). Zusammenfassende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).

Immuno- globu- line	Tag 1 p.p. (K+I) ¹		Tag 5 p.p. (K+I) ¹		Tag 14 p.p. (K+I) ¹	
	IgG	16,5 (3,08-42,1) ^a	1,71 (0,78-3,23) ^b	0,25 (0,14-3,48) ^c		
IgA	3,51 (0,72-11,9) ^a	1,91 (0,84-4,38) ^b	3,07 (0,87-6,00) ^{ab}			
*IgM	3,60 (1,44-6,11) ^a	2,52 (1,24-3,93) ^b	1,96 (1,00-3,85) ^c			

¹n (Anzahl der gültigen Fälle) = 21; *normalverteilte Daten

Unterschiedliche Exponenten in einer Zeile: signifikante Unterschiede (p ≤ 0,05) zwischen den Gruppen

Neben den absoluten Gehalten veränderten sich auch die relativen Anteile der gemessenen Immunglobuline. Im Kolostrum dominierten mit rund 70 % die Immunglobuline der Klasse G, wohingegen IgA und IgM zu etwa gleichen Anteilen vorhanden waren, mit einem leicht geringeren Gehalt an IgA. Am fünften Tag post partum zeigte sich ein divergentes Verteilungsmuster, indem IgG den geringsten und IgM den höchsten Anteil der Immunglobuline in der Sauenmilch ausmachten. Am 14. Laktationstag dominierte schließlich mit 58,1 % IgA, gefolgt von 37,1 % IgM und 4,75 % IgG (Abbildung 9).

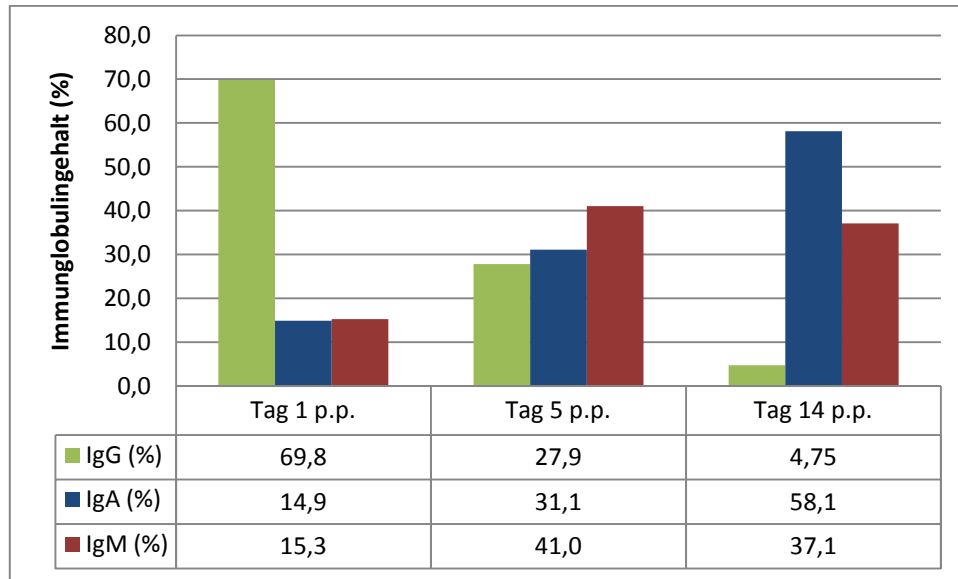


Abbildung 9: Prozentualer Anteil der gemessenen Immunglobuline IgG, IgA und IgM in der Sauenmilch an den Tagen 1, 5 (± 1) und 14 (± 1) post partum (p.p.). Die Berechnungsgrundlage bildeten die ermittelten Medianwerte der entsprechenden Immunglobulinklassen.

4.2.7 Immunglobulingehalte im Serum

Die ermittelten Immunglobulingehalte im Serum der Sauen und Saugferkel unterschieden sich nicht zwischen den Fütterungsgruppen (Tabellen 48 und 49). Bei den Absetzferkeln wiesen die Tiere aus der Inulingruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe höhere IgM-Konzentration im Serum auf (Tabelle 51).

Im altersabhängigen Vergleich konnte bei den Saugferkeln ein im Vergleich zu den Absetzferkeln höherer Gehalt an IgG sowie ein geringerer Gehalt an IgM nachgewiesen werden (Tabellen 52 und 53).

Tabelle 48: Immunglobulingehalt im Serum der Sauen am fünften Tag post partum. Angaben in mg/ml, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).

Immunglobuline	K (n¹ = 11)	I (n = 10)
*IgG	37,7 (27,3-42,9)	34,3 (26,6-57,4)
*IgA	2,54 (1,08-3,30)	2,15 (0,55-7,34)
*IgM	7,10 (3,97-9,98)	7,23 (4,11-9,58)

¹Anzahl der gültigen Fälle; *normalverteilte Daten

Tabelle 49: Immunglobulingehalt im Serum der Saugferkel am zehnten Lebenstag. Angaben in mg/ml, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).

Immunglobuline	K (n¹ = 8)	I (n = 8)
IgG	42,3 (25,4-93,7)	30,1 (9,18-55,8)
*IgA	0,82 (0,25-1,27)	0,60 (0,05-1,42)
IgM	0,62 (0,49-1,21)	0,57 (0,34-0,93)

¹Anzahl der gültigen Fälle; *normalverteilte Daten

Tabelle 50: Immunglobulingehalt im Serum der Absetzferkel am 59. (± 1) Lebenstag. Angaben in mg/ml, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen den vier Fütterungsgruppen, die extrudierte beziehungsweise getoastete Ackerbohnen ohne (Kontrollgruppe (K)) oder mit Inulin (Inulingruppe (I)) erhielten.

Immunglobuline	Extrudierte Ackerbohnen			
	K (n ¹ = 8)		I (n = 8)	
	Extrudierte Ackerbohnen		Getoastete Ackerbohnen	
	K (n ¹ = 8)	I (n = 8)	K (n = 8)	I (n = 8)
*IgG	11,3 (4,27-13,5)	13,3 (5,64-26,6)	9,58 (6,72-14,5)	11,9 (8,99-16,4)
IgA	0,73 (0,42-2,67)	0,95 (0,61-2,08)	0,98 (0,60-1,58)	0,75 (0,52-1,78)
*IgM	2,69 (1,88-3,89)	3,32 (2,75-5,00)	3,32 (2,48-4,73)	3,60 (2,25-4,63)

¹Anzahl der gültigen Fälle; *normalverteilte Daten

Tabelle 51: Immunglobulingehalt im Serum der Absetzferkel am 59. (± 1) Lebenstag. Angaben in mg/ml, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe und der Inulingruppe unter zusammenfassender Betrachtung der Gruppen, die extrudierte (A_e) beziehungsweise getoastete (A_t) Ackerbohnen erhielten.

Immunglobuline	Kontrollgruppe (A _e +A _t) ¹		Inulingruppe (A _e +A _t) ¹	
IgG	10,6 (4,27-14,5)		12,8 (5,64-26,6)	
IgA	0,77 (0,42-2,67)		0,88 (0,52-2,08)	
*IgM	2,84 (1,88-4,73) ^a		3,32 (2,25-5,00) ^b	

¹n (Anzahl der gültigen Fälle) = 16; *normalverteilte Daten

Unterschiedliche Exponenten in einer Zeile: signifikante Unterschiede (p \leq 0,05) zwischen den Gruppen

Ergebnisse

Tabelle 52: Immunglobulingehalt im Serum der Saug- und Absetzferkel. Angaben in mg/ml, Median (Minimum-Maximum). Vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe (K) und der Inulingruppe (I).

Immunglobuline	Saugferkel		Absetzferkel ¹	
	K (n ² = 8)	I (n = 8)	K (n = 16)	I (n = 16)
IgG	42,3 (25,4-93,7) ^a	30,1 (9,18-55,8) ^a	10,6 (4,27-14,5) ^b	12,8 (5,64-26,6) ^b
IgA	0,82 (0,25-1,27)	0,60 (0,05-1,42)	0,77 (0,42-2,67)	0,88 (0,52-2,08)
IgM	0,62 (0,49-1,21) ^a	0,57 (0,34-0,93) ^a	2,84 (1,88-4,73) ^b	3,32 (2,25-5,00) ^b

¹vergleichende Darstellung zwischen der Kontrollgruppe und der Inulingruppe unter zusammenfassender Betrachtung der Gruppen, die extrudierte beziehungsweise getoastete Ackerbohnen erhielten; ²Anzahl der gültigen Fälle

Tabelle 53: Immunglobulingehalt im Serum der Saug- und Absetzferkel. Angaben in mg/ml, Median (Minimum-Maximum). Zusammenfassende Darstellung der Kontroll- (K) und Inulingruppe (I).

Immunglobuline	Saugferkel (K+I) ¹		Absetzferkel (K+I) ²	
	IgG	41,7 (9,18-93,7) ^a	11,9 (4,27-26,6) ^b	
IgA	0,77 (0,05-1,42)	0,80 (0,42-2,67)		
IgM	0,59 (0,34-1,21) ^a	3,15 (1,88-5,00) ^b		

¹n (Anzahl der gültigen Fälle) = 16; ²n = 32

Unterschiedliche Exponenten in einer Zeile: signifikante Unterschiede (p ≤ 0,05) zwischen den Gruppen

Im Vergleich der absoluten Immunglobulingehalte (mg/ml) im Serum lagen bei den Sauen und Saugferkeln deutlich höhere Gehalte als bei den Absetzferkeln vor (Abbildung 10). Insbesondere wurden höhere Gehalte an IgG in diesen beiden Altersgruppen ermittelt, wohingegen sowohl die IgA- als auch die IgM-Konzentrationen bei den Sauen und Absetzferkeln höher waren als bei den Saugferkeln.

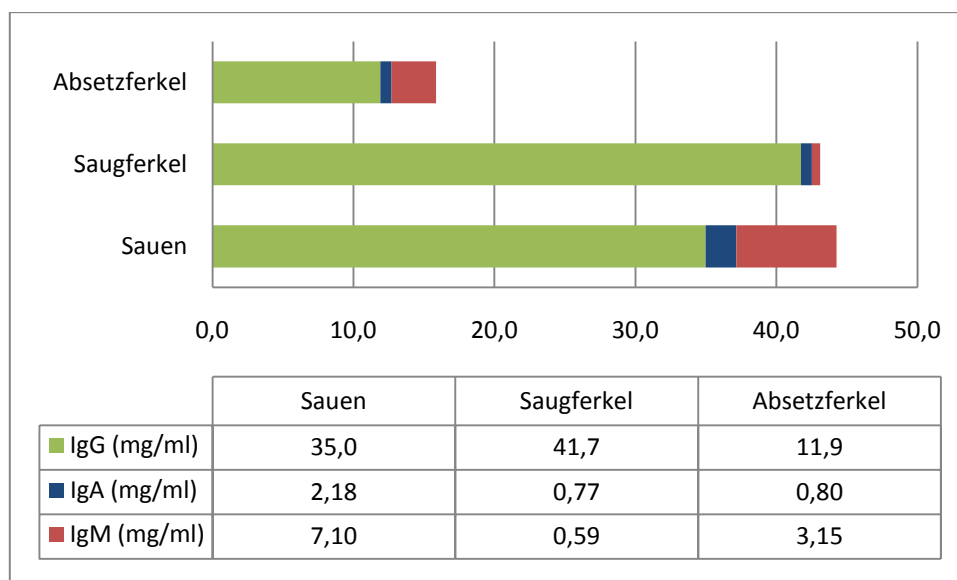


Abbildung 10: Immunglobulingehalte (mg/ml) im Serum der Sauen (Tag fünf post partum), Saugferkel (zehnter Lebenstag) und Absetzferkel (59. (± 1) Lebenstag). Die Berechnungsgrundlage bildeten die ermittelten Medianwerte der entsprechenden Immunglobulinklassen.

Die Betrachtung der relativen Anteile der gemessenen Immunglobuline im Serum zeigte ein annähernd ähnliches Verteilungsmuster bei den Sauen und Absetzferkeln, wohingegen dieses bei den Saugferkeln deutlich differierte (Abbildung 11). Insgesamt nahmen die Immunglobuline der Klasse G bei den Tieren aller Altersstufen den jeweils größten Anteil ein, bei den Sauen und Absetzferkeln konnten jedoch zudem auch höhere Gehalte an IgM nachgewiesen werden mit einem Verhältnis von IgG:IgM = 4-5:1 und IgG:IgA = 15-16:1. Im Gegensatz dazu wurden bei den Saugferkeln nur geringe Gehalte an IgM und IgA ermittelt, sodass das Verhältnis zu IgG etwa 71:1 (IgG:IgM) beziehungsweise 54:1 (IgG:IgA) betrug.



Abbildung 11: Prozentualer Anteil der gemessenen Immunglobuline IgG, IgA und IgM im Serum der Sauen (Tag fünf post partum), Saugferkel (zehnter Lebenstag) und Absetzferkel (59. (± 1) Lebenstag). Die Berechnungsgrundlage bildeten die ermittelten Medianwerte der entsprechenden Immunglobulinklassen.

5. Diskussion

Ziel der Arbeit war die Untersuchung der immunmodulatorischen Wirkung von Inulin und unterschiedlich behandelten Ackerbohnen bei Sauen, Saug- und Absetzferkeln. Fütterungsassoziierte Modifikationen des Immunsystems sind grundsätzlich von wissenschaftlichem Interesse, obgleich insbesondere die Wirkungen auf das intestinale diffuse lymphoretikuläre Gewebe (intraepitheliale Leukozyten, Leukozyten der Lamina propria) bislang nur vereinzelt untersucht wurden. Für die Interpretation der Ergebnisse sind eine grundsätzliche Beschreibung und das Wissen um immunologische Parameter unter Berücksichtigung altersabhängiger Veränderungen unerlässlich. Sie stellen die Grundlage für Untersuchungen zur Wirkung potenzieller Immunmodulatoren dar. Auch für zukünftige Studien mit immunologischen Fragestellungen bedeuten die aus dieser Arbeit hervorgegangenen Ergebnisse verbesserte Interpretationsmöglichkeiten aufgrund eines erweiterten Wissens zum immunologischen Status von Ferkeln differierenden Alters.

Aus diesen Gründen wurde ein Versuchsdesign gewählt, das die Erfassung immunologischer Kenndaten bei Sauen sowie Saug- und Absetzferkeln erlaubt. Damit konnten ein umfangreiches Probenmaterial gewonnen und anhand durchflusszytometrischer Messungen ein großes Spektrum der Leukozytensubpopulationen detektiert werden. Zusätzlich wurden die Immunglobulingehalte im Serum der Sauen, Saug- und Absetzferkel sowie in der Sauenmilch bestimmt, um ebenfalls die humorale Immunantwort und -entwicklung von Schweinen zu charakterisieren.

5.1 Kritik der Methode

5.1.1 Versuchsdesign

Es wurde ein Versuchsdesign gewählt, das eine komplexe Erfassung immunologischer Kenndaten bei Ferkeln verschiedener Altersstufen sowie bei Sauen ermöglicht. Das Vorgehen, zunächst die Sauenmilch unter dem Aspekt der passiven Immunisierung von Saugferkeln zu untersuchen, ist für die Interpretation der Ergebnisse aus der Beprobung der Saugferkel von entscheidender Bedeutung. Aufgrund der Versorgung der Tiere mit Kolostrum beziehungsweise Milch als ausschließliche Nährstoffquelle wurde es möglich, eine Interaktion zwischen der zuvor immunologisch definierten Sauenmilch und den erhaltenen Daten der Saugferkel aufzuzeigen.

Die sich anschließenden Fragestellungen fokussierten sich auf den Vergleich zwischen Saug- und Absetzferkeln hinsichtlich der Entwicklung des systemischen und intestinalen Immunsystems sowie auf die Untersuchung möglicher immunmodulatorischer Einflüsse des eingesetzten Futters. Hintergrund für die Betrachtung der Absetzferkel war, dass insbesondere zum Zeitpunkt des Absetzens aufgrund verschiedener Stressfaktoren Erkrankungen bei Ferkeln auftreten, die mit Leistungseinbußen bis hin zu Tierverlusten einhergehen. Ein Ziel der Studie war es daher, den immunologischen Status von Absetzferkeln zu beschreiben und konsekutiv den immunmodulatorischen Einfluss von Inulin und getoasteten beziehungsweise extrudierten Ackerbohnen zu bestimmen. Die mit einer thermischen Behandlung von Leguminosen einhergehende Reduktion antinutritiver Inhaltsstoffe kann zu einer

Beeinflussung des Immunsystems führen, wobei in diesem Kontext bislang keine Ergebnisse zur möglicherweise differierenden Wirksamkeit unterschiedlicher Behandlungsmethoden vorliegen. Für das Inulin wurde ein immunmodulatorischer Einfluss bei Ratten, Mäusen und Menschen beschrieben, jedoch liegen im Bereich der Tierernährung noch keine detaillierten Arbeiten zur Wirkung von Inulin auf das Immunsystem von Schweinen vor.

Grundsätzlich ist bei der Beurteilung möglicher fütterungsassoziierter modulatorischer Wirkungen neben einer Betrachtung verschiedener Immunparameter auch eine Beeinflussung der gastrointestinalen Mikrobiota zu berücksichtigen. Im Rahmen des vorliegenden Fütterungsversuchs wurden von den Sauen zu unterschiedlichen Zeitpunkten Kotproben und von den Ferkeln am Tag der Euthanasie Kot- und Ingestaproben gewonnen, um die Zusammensetzung der gastrointestinalen Mikrobiota sowie einige bakterielle Metaboliten zu bestimmen. Für die vorliegende Arbeit sollten jedoch ausschließlich die immunologischen Fragestellungen diskutiert werden, sodass die aus den mikrobiologischen Untersuchungen erhaltenen Daten nicht dargestellt wurden.

Kritisch zu betrachten ist die Aufteilung des Versuchs in zwei Versuchsdurchgänge. Obgleich äußere klimatische, haltungs- und fütterungsassozierte Veränderungen weitgehend reduziert wurden, ist ein Einfluss der differierenden Versuchsdurchgänge und genetisch verschiedenen Tiere möglich und zu berücksichtigen. Aus diesen Gründen ist die innerhalb eines Versuchsdurchgangs erfolgte Einheitlichkeit des Versuchsdesigns und der Versuchstiere hervorzuheben. Es wurde pro Fütterungsgruppe ein Ferkel pro Wurf für den Versuch herangezogen, die Ferkelzuteilung erfolgte unter Berücksichtigung der jeweils aktuellen Körpermasse der Tiere, sodass vergleichbare, homogene Fütterungsgruppen gegeben waren. Eine separate Ergebnisdarstellung für die beiden Versuchsdurchgänge wurde aufgrund der geringen Tierzahl nicht durchgeführt. Die zusammenfassende Betrachtung der Tiere beider Versuchsdurchgänge führte zu einer Erhöhung der Probenzahl und damit zu einer abgesicherten statistischen Auswertung. Weiterhin ist anzumerken, dass die in der vorliegenden Studie zu berücksichtigende Gesamtzahl unter den gegebenen Bedingungen nicht in einem einzelnen Versuchsdurchgang realisierbar ist. Um eine zeitnahe Bearbeitung der Proben sicherzustellen, wurde die täglich zu beprobende Tierzahl auf vier Ferkel beschränkt. Die aus einem einzelnen Versuchsdurchgang resultierende Gesamtzahl hätte demnach zu einer nur begrenzten statistischen Aussagekraft geführt, sodass die Aufteilung des Versuchs in zwei vergleichbare Versuchsdurchgänge sinnvoll und erklärbar ist.

Das gewählte Alter der Saug- und Absetzferkel erklärt sich aus der Intention, die immunologische Entwicklung von Ferkeln zu untersuchen und zu definieren. Durch das gewählte Versuchsdesign konnten Absetzferkel im Alter von 59 (± 1) Tagen beprobt werden. Aufgrund dessen, dass die Ferkel im Alter von 42 Tagen abgesetzt wurden, konnte unter Umständen eine relative Stabilisierung des Immunsystems erreicht und damit repräsentative Ergebnisse für Absetzferkel erhalten werden. Ein Einsatz von frühabgesetzten Ferkeln wäre nur dann sinnvoll, wenn eine vergleichsweise lang angesetzte Fütterungsperiode die Probennahme an Ferkeln mit einem Alter von durchschnittlich 59 Tagen und damit mit einem weiter entwickelten Immunsystem ermöglichen würde. Die Nutzung konventionell abgesetzter Ferkel mit 28 Tagen würde ähnliche Voraussetzungen erfordern, grundsätzlich sind jedoch beide Möglichkeiten umsetzbar. Bedingt durch die längere Fütterungsperiode bei früh- oder konventionell abgesetzten Ferkeln könnten von den vorliegenden abweichende Ergebnisse resultieren.

Im vorliegenden Versuchsdesign wurden für die Ferkelproduktion sowie zur Bestimmung immunologischer Parameter in der Milch ausschließlich Jungsauen im Alter 272 ± 24 Tagen zu Versuchsbeginn genutzt. Dies hat den Vorteil der Vergleichbarkeit, zudem wurden mögliche vorausgegangene fütterungs- und haltungsbedingte Einflussfaktoren reduziert.

Die Haltung der Tiere erfolgte während der gesamten Versuchsperiode auf Stroh, die Sauen

wurden zudem während der Trächtigkeitsperiode in Außenstallungen gehalten. Die im Vergleich zur konventionellen Sauen- und Ferkelhaltung höhere Rohfaseraufnahme durch das bereitgestellte Stroh und Heu kann einen Einfluss auf verdauungsphysiologische Parameter ausüben, insbesondere auf die bakteriellen Fermentationsmetaboliten. Weiterhin ist es denkbar, dass infolge von Verschiebungen in der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota, insbesondere im Sinne einer Förderung von Bifidobakterien, aufgrund einer erhöhten Rohfaseraufnahme auch immunologische Parameter beeinflusst werden (Gibson et al., 1995; Howard et al., 1995; Bouhnik et al., 1999). Dieser Aspekt sollte bei der Betrachtung der erhaltenen Ergebnisse aus der vorliegenden Studie berücksichtigt werden. Dennoch ist hervorzuheben, dass die Tiere der jeweiligen Fütterungsgruppen unter identischen Bedingungen gehalten wurden und aus diesem Grund eine Beeinflussung der zu vergleichenden Parameter zwischen den Versuchsgruppen nicht anzunehmen ist.

5.1.2 Probenmaterial und Untersuchungsmethoden

Die Milchproben der Sauen wurden manuell nach vorausgehender Injektion des Hormons Oxytozin gewonnen. Die Probennahme erfolgte an den Tagen 1, 5 (± 1) und 14 (± 1) post partum. In der durchflusszytometrischen Betrachtung wurde zunächst eine Region (gate) um die detektierten Leukozyten gelegt (Leukozytengate). Auf diese Weise konnte der Anteil der B-Zellen ($CD21^+$), T-Zellen ($CD2^+CD5^+$ für den Nachweis von $\alpha\beta$ -T-Zellen und $CD2^+-\gamma\delta$ -T-Zellen), NK-Zellen ($CD2^+CD5^-$) und der myeloiden Zellen ($CD21^-SWC3^+$) bestimmt werden. Weiterhin wurden Subpopulationen der genannten Immunzellpopulationen erfasst ($CD4^+CD8\alpha^-$ und $CD4^+CD25^-$ (T-Helfer-Zellen); $CD4^-CD8\alpha^+$ (zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen); $CD5^+MHCII^+$ (antigenpräsentierende Zellen und NK-Zellen)) sowie die aktivierten T-Helfer-Zellen dargestellt ($CD4^+CD8\alpha^+$; $CD4^+CD25^+$). Anzumerken ist, dass bei der Auswertung der $CD4^-CD8\alpha^+$ -Zellen in der Sauenmilch keine Unterscheidung zwischen $CD4^-CD8\alpha^{high}$ - und $CD4^-CD8\alpha^{low}$ -Zellen vorgenommen wurde, da die im Rahmen der durchflusszytometrischen Messungen generierten Grafiken hierfür nicht eindeutig waren. Gleiches gilt für die $CD4^+CD8\alpha^+$ -Zellen, bei denen keine Zuordnung zu $CD4^+CD8\alpha^{low}$ -Zellen erfolgte.

Aufgrund der im Laufe der Laktation ansteigenden Gehalte an Epithelzellen in der Milch (Schollenberger et al., 1986 a,b; Salmon et al., 2009) wurde in der durchflusszytometrischen Betrachtung nachfolgend eine Region um die detektierten Lymphozyten gelegt (Lymphozytengate). Auf diese Weise konnte der Vergleich hinsichtlich des Lymphozytengehalts zwischen den Fütterungsgruppen sowie zwischen den Laktationstagen unabhängig von dem Gesamtzellgehalt in der Sauenmilch erfolgen.

Die Blutproben der Ferkel wurden aus versuchstierethischen Gründen von den euthanasierten Tieren unmittelbar post mortem aus dem Herzen genommen und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gekühlt. Hierbei trat, mit Ausnahme der Proben für die Serumgewinnung, in keinem Fall eine (beginnende) Blutgerinnung auf. Da pro Tag vier Ferkel getötet wurden, erfolgte die weitere Probenaufbereitung unmittelbar nach der Beprobung des vierten Ferkels. Die Blutproben der Sauen wurden aus der Vena jugularis externa beziehungsweise aus der Vena auricularis gewonnen und ebenfalls direkt im Anschluss aufbereitet. Die festgelegte Probenzahl pro Tag ermöglichte eine umfangreiche Färbung mit primären und sekundären Antikörpern zur Detektion der Leukozytenpopulationen, sodass die relevanten Fragestellungen ausreichend beantwortet werden konnten. Zur zusammenfassenden Bestimmung der Immunzellpopulationen wurden die Antikörperkombinationen $CD21^+SWC3^-$

(B-Zellen), $CD2^+CD5^+$ (T-Zellen (total), mit Ausnahme der $CD2^- \gamma\delta$ -T-Zellen), $CD2^+CD5^-$ (NK-Zellen), $CD21^+SWC3^+$ (myeloide Zellen (Monozyten, Granulozyten, dendritische Zellen)) sowie $CD14^+$ (Monozyten) gewählt. Um innerhalb dieser Immunzellpopulationen weitere Spezifikationen vornehmen zu können, wurden zusätzlich die Antikörperkombinationen $CD4^+CD8\alpha^-$ und $CD4^+CD25^-$ (T-Helfer-Zellen), $CD4^-CD8\alpha^+$ (zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen), $TCR1^+$ ($\gamma\delta$ -T-Zellen) und $CD5^+MHCII^+$ (antigenpräsentierende Zellen (B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, ggf. T-Zellen), NK-Zellen) eingesetzt. Schließlich konnte mit Hilfe der Antikörperfärbungen überprüft werden, ob die T-Helfer-Zellen aktiviert wurden ($CD4^+CD8\alpha^+$; $CD4^+CD25^+$: aktivierte T-Helfer-Zellen; $CD45RC^+$: wird in aktivierten T-Helfer-Zellen herunterreguliert). Zu berücksichtigen ist, dass bei der Auswertung der $CD4^-CD8\alpha^+$ -Zellen im Blut der Saug- und Absetzferkel keine Unterscheidung zwischen $CD4^-CD8\alpha^{high}$ - und $CD4^-CD8\alpha^{low}$ -Zellen erfolgte, da die im Rahmen der durchflusszytometrischen Messungen generierten Grafiken hierfür nicht eindeutig waren. Ebenso wurden die $CD4^+CD8\alpha^+$ -Zellen nicht spezifisch den $CD4^+CD8\alpha^{low}$ -Zellen zugeordnet.

Die Proliferation der Lymphozyten aus dem Blut wurde mit den Mitogenen PWM, Con A und PHA-M stimuliert und über den Einbau von BrdU in die neu synthetisierte DNA der proliferierenden Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen. Die Aufarbeitung der Blutzellen unterschied sich hierbei zwischen den Versuchsdurchgängen in dem Permeabilisierungsschritt, der in dem ersten Durchgang mit Ethanol und im zweiten Durchgang mit FACS Perm2 erfolgte. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse, die in beiden Versuchsdurchgängen vergleichbar waren, erscheint der Einfluss des sich unterscheidenden Aufbereitungsschritts auf die Proliferationsleistung der Zellen eher gering.

Für die Auswertung der Lymphozytenproliferation konnte kein Stimulationsindex (prozentualer Anteil der proliferierten Zellen mit Mitogenbehandlung/prozentualer Anteil der proliferierten Zellen ohne Mitogenbehandlung) genutzt werden, da in der vorliegenden Studie in einigen Fällen keine proliferierten Zellen ohne Mitogenbehandlung vorlagen. Aus diesem Grund wurde für die Auswertung der absolute Anteil der proliferierten Lymphozyten von den insgesamt detektierten Zellen herangezogen.

Zur Bestimmung der Immunglobulingehalte in der Sauenmilch sowie im Serum der Sauen, Saug- und Absetzferkel wurde ein kommerzieller ELISA genutzt. Die Proben aus dem ersten und zweiten Durchgang wurden zusammen gemessen, um experimentell bedingte Unterschiede in den Messungen zu vermeiden.

Die Entnahme der Darmproben der Saug- und Absetzferkel erfolgte unmittelbar nach der Tötung der Tiere, wobei jeweils ein 20 cm langes Darmsegment des mittleren Jejunums, beginnend 25 cm oral der jejunalen Peyerschen Platten, gewählt wurde. Für die Isolierung der intraepithelialen Lymphozyten wurden die Darmstücke mehrfach in HBSS-DTT inkubiert und über Gaze gespült, sodass die Überstände überwiegend Epithelzellen und intraepitheliale Lymphozyten enthielten. Bei den intraepithelialen Zellen des Darms handelt es sich zu 90 % um $CD8^+$ -Zellen (Abreu-Martin und Targan, 1996; Iijima et al., 2001; MacDonald, 2003). Da in der vorliegenden Studie jedoch zu einem größeren Anteil myeloide Zellen ($SWC3^+$) nachgewiesen wurden, hat möglicherweise eine Kontamination der Proben mit Zellen der Lamina propria stattgefunden. Die eingesetzten Antikörper für die Phänotypisierung der intestinalen intraepithelialen Leukozyten entsprachen weitgehend den Kombinationen aus dem Blut und aus der Milch, sodass neben einer grundsätzlichen Bestimmung der Immunzellpopulationen auch Subpopulationen durchflusszytometrisch dargestellt werden konnten. Im Gegensatz zu den durchflusszytometrischen Messungen der Lymphozyten in der Sauenmilch sowie im Blut der Saug- und Absetzferkel war es im Rahmen der Detektion der intestinalen intraepithelialen Lymphozyten möglich, eine Unterscheidung zwischen $CD4^-$

CD8 α^{high} - und CD4 $^{\text{low}}$ CD8 α^{low} -Zellen vorzunehmen. Ebenso erfolgte eine Zuordnung von CD4 $^{\text{high}}$ CD8 α^{low} -Zellen.

Für die Proliferation der intestinalen intraepithelialen Lymphozyten ist analog zu den Blutproben zu berücksichtigen, dass die Permeabilisierung der Zellen in den zwei Versuchsdurchgängen verschieden war, obgleich der Einfluss auf die Proliferationsleistung der Zellen gering erscheint.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Einfluss von Inulin und thermisch behandelten Ackerbohnen auf die Leistung sowie auf immunologische Parameter bei Sauen, Saug- und Absetzferkeln

Die Fütterung von Inulin sowie getoasteten beziehungsweise extrudierten Ackerbohnen hatte keinen Einfluss auf die Leistung der Saug- und Absetzferkel. Es konnte keine zwischen den jeweiligen Fütterungsgruppen differierende Lebendmassezunahme oder Futtermittelverwertung beobachtet werden. Auch bei den Sauen zeigte sich kein Einfluss der Fütterung auf reproduktionsspezifische Parameter. Bedingt durch die für die Beurteilung von Leistungsparametern geringe Tierzahl ist die Aussagekraft der ermittelten Daten insgesamt begrenzt.

Im Gegensatz dazu konnte sowohl bei den Sauen als auch bei den Ferkeln in den verschiedenen Altersstufen ein Einfluss der Fütterung auf immunologische Parameter nachgewiesen werden. Grundsätzlich sollte bei der Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Studie berücksichtigt werden, dass zum Teil erhebliche tierindividuelle Schwankungen vorlagen, die sich in den hohen Spannweiten widerspiegeln.

Sauenmilch

In der Sauenmilch wurde am ersten Tag p.p. sowohl unter Berücksichtigung des Leukozytengates als auch des Lymphozytengates ein signifikant höherer Anteil CD21 $^{\text{high}}$ -Zellen (B-Zellen) in der Inulingruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe vorgefunden. B-Zellen sind im Rahmen der spezifischen Immunantwort von Bedeutung. Sie werden antigenspezifisch von T-Helfer-Zellen aktiviert und zur Proliferation und Differenzierung zu Plasmazellen angeregt. Die von den Plasmazellen sezernierten Immunglobuline können Pathogene opsonieren sowie über eine Komplement-vermittelte direkte Zytotoxizität pathogene Agentien entfernen (Gaskins und Kelley, 1995). In der vorliegenden Studie wurden ebenfalls die Immunglobuline in der Sauenmilch erfasst. Es konnte kein Unterschied zwischen der Kontroll- und Inulingruppe hinsichtlich der IgG-, IgA- und IgM-Gehalte im Kolostrum und in der Sauenmilch an den Tagen eins, fünf und 14 p.p. nachgewiesen werden. Offenbar führte der Einsatz von Inulin im Laktationsfutter der Sauen zwar zu einem Anstieg der B-Zellen im Kolostrum, jedoch nicht zu einem damit verbundenen höheren Gehalt an Immunglobulinen.

Vor dem Hintergrund, dass Makromoleküle aus dem Kolostrum in den ersten Stunden post natum über die Darmwand resorbiert werden (Leece, 1973) und in diesem Kontext auch diskutiert wird, ob Immunzellen das Darmepithel neugeborener Ferkel passieren können (Salmon et al., 2009), wäre eine Beeinflussung des systemischen oder intestinalen

Immunsystems bei den Saugferkeln im Sinne erhöhter B-Zell-Gehalte in der Inulingruppe denkbar. Weiterhin könnte die verstärkte Produktion immunologisch wirksamer, löslicher Faktoren durch die höhere Anzahl an B-Lymphozyten in der Sauenmilch der Inulingruppe zu Veränderungen des neonatalen Immunsystems geführt haben. Diese Vermutungen konnten in den Folgeuntersuchungen an den Saugferkeln jedoch nicht bestätigt werden, sodass insbesondere aufgrund der intensiven Absorption von Immunglobulinen in den ersten 24 Stunden post natum (Butler et al., 2009) eine fütterungsassoziierte Beeinflussung des Immunsystems von Saugferkeln über die Sauenmilch möglicherweise eher über die Ausbildung und Verteilung der Immunglobulingehalte im Kolostrum erwartet werden könnte. Neben den höheren Gehalten CD21⁺-Zellen im Kolostrum der Sauen der Inulingruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe konnte darüber hinaus am 14. Tag p.p. eine höhere Anzahl CD4⁺CD8 α ⁺- und CD5⁺MHCII⁺-Zellen (zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen beziehungsweise B-Zellen und gegebenenfalls T-Zellen) sowie unter Berücksichtigung des Leukozytengates ebenfalls an CD4⁺CD25⁻-Zellen (T-Helfer-Zellen) in der Inulingruppe als in der Kontrollgruppe detektiert werden. Obgleich es sich bei diesen Zellen um wichtige Effektorzellen des Immunsystems handelt, konnte in der vorliegenden Studie keine konsekutive Beeinflussung des neonatalen Immunsystems aufgezeigt werden. Insgesamt führte die Fütterung von Inulin demnach zwar zu einer partiellen Modifikation der immunologischen Zusammensetzung der Sauenmilch, nicht jedoch zu einer damit assoziierten Beeinflussung von Immunparametern bei den Saugferkeln.

Blut

Die im Rahmen des Differentialblutbildes ermittelten Blutparameter lagen sowohl bei den Saugferkeln als auch bei den Absetzferkeln im Bereich üblicher Referenzwerte (Nerbas, 2008).

Die Phänotypisierung der peripheren mononukleären Blutzellen der Saug- und Absetzferkel ergab keine Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen.

Im Rahmen der mitogenstimulierten Proliferation der Lymphozyten aus dem Blut konnte bei den Absetzferkeln ebenfalls kein Unterschied zwischen den Fütterungsgruppen festgestellt werden. Bei den Saugferkeln zeigte sich hingegen ein durch Con A stimulierter höherer Anteil der T-Zellen in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Inulingruppe. Das Prinzip des Proliferationstests beruht darauf, dass zuvor aktivierte Zellen bei erneuter Stimulation zur Formation von Blasten angeregt werden. Die Methode dient demnach der Bestimmung der Lymphozytenfunktion. Der Nachweis, dass in der vorliegenden Studie bei den Saugferkeln der Inulingruppe eine geringere Anzahl Con A stimulierter Lymphozyten detektierbar war, bedeutet in diesem Kontext, dass in der Gruppe weniger bereits aktivierte T-Zellen vorlagen, die durch Con A stimulierbar waren. Die ebenfalls in der Studie eingesetzten weiteren Mitogene PWM und PHA-M führten zu keinen Unterschieden zwischen den Fütterungsgruppen der Saugferkel hinsichtlich der Proliferationsleistung. Die differierende Stimulierbarkeit der Lymphozyten in Abhängigkeit vom eingesetzten Mitogen erklärt sich aus der Tatsache, dass unterschiedliche Subpopulationen der Immunzellen angeregt wurden. PWM stimuliert sowohl B- als auch T-Lymphozyten (Ruscetti et al., 1977), wohingegen PHA-M und Con A ausschließlich auf T-Zellen ausgerichtet sind (Abbas et al., 1996). Zusätzlich werden unterschiedliche Subpopulationen der T-Lymphozyten angesprochen, indem die von Con A aktivierten CD4⁺-Zellen in Anwesenheit von CD8⁺-Zellen die Immunglobulinsynthese durch B-Zellen unterdrücken (Suppressor-Inducer-Zellen, CD45RA) und zugleich Helferfunktionen für B-Zellen (Helper-Inducer-Zellen, CDw29) aufweisen (Cruse und Lewis, 1995). Con A stimuliert vorwiegend die CD45RA-Expression auf CD4⁺-Zellen, während bei der Stimulation durch PHA-M ein Bezug zur T-Zell-Konzentration besteht. Bei nur geringem Vorkommen der T-Lymphozyten werden durch PHA-M bevorzugt

Helper-Inducer-Zellen stimuliert, wohingegen die Zellen bei insgesamt hoher T-Zell-Konzentration überwiegend Suppressorfunktionen entwickeln (Dronov 2005).

Für die Immunglobulingehalte im Serum der Sauen und Saugferkel konnten keine Unterschiede zwischen den Kontroll- und Inulingruppen aufgezeigt werden. Bei den Absetzferkeln zeigte sich, dass die Tiere, unabhängig davon, ob sie ein Futter mit getoasteten oder extrudierten Ackerbohnen erhielten, in der Inulingruppe signifikant erhöhte IgM-Gehalte im Vergleich zu der Kontrollgruppe aufwiesen. Da naive B-Zellen zunächst ausschließlich IgM und zu einem geringen Anteil IgD exprimieren, werden im Frühstadium einer Infektion vorrangig Immunglobuline der Klasse M im Plasma nachgewiesen (Butler et al., 2006). Im Gegensatz dazu werden infolge eines Zytokin-vermittelten Klassenwechsels in der Synthese der Immunglobulinisotypen von Plasmazellen im Verlauf einer Immunantwort vermehrt IgG und IgA gebildet, sodass diese im Rahmen der verzögerten Immunantwort von Bedeutung sind (Janeway et al., 2002). Die Fütterung eines Futters mit 3 % Inulin hat in der vorliegenden Studie einen Anstieg der IgM-Gehalte im Serum der Absetzferkel im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe ergeben. Entsprechend wurde das Immunsystem der Ferkel der Inulingruppe aktiviert, sodass die Plasmazellen vermehrt IgM sezernierten. Da die IgM-Produktion im Rahmen der frühen Immunantwort erfolgt und die IgG-Sekretion hingegen erst etwa drei Wochen nach Antigenkontakt beginnt (Janeway et al., 2002), resultieren die erhöhten IgM-Gehalte in den Inulingruppen der Absetzferkel vermutlich aus der Fütterung des Aufzuchtfutters, das 17 (\pm 1) Tage bis zur Sektion der Tiere eingesetzt wurde. Die vorausgehende Fütterung des Saugferkelbeifutters mit und ohne Inulin hatte aufgrund der vergleichbaren IgG-Konzentrationen in den Kontroll- und Inulingruppen wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Immunglobulingehalte im Serum der Absetzferkel.

Die fokussierte Betrachtung der Immunglobulingehalte im Serum der Sauen, Saug- und Absetzferkel der Kontroll- und Inulingruppen deutet darauf hin, dass sich das noch entwickelnde Immunsystem der Absetzferkel stärker beeinflussen lässt als das bereits ausgereifte Immunsystem der Sauen. Während der Einsatz von Inulin bei den Sauen keine Unterschiede hinsichtlich der Immunglobulinkonzentrationen im Serum, Kolostrum und in der Milch induzieren konnte, wurden bei den Absetzferkeln differierende Ergebnisse zwischen den Fütterungsgruppen nachgewiesen. Unter dem Aspekt, dass Saugferkel immuninkompetent sind und ihr bestehendes Immunsystem aus der passiven Immunisierung durch die Sauenmilch resultiert, lässt sich darüber hinaus möglicherweise auch erklären, dass neben den Sauen auch die Saugferkel keine Unterschiede in den Immunglobulingehalten zwischen den Fütterungsgruppen zeigten.

Darm

Die Phänotypisierung der intraepithelialen Lymphozyten im Darm der Saug- und Absetzferkel zeigte keine Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen.

Der Lymphozytenproliferationstest ergab bei den Absetzferkeln sowohl für den Einsatz von Inulin als auch für die thermische Behandlung der Ackerbohnen signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen. Während die Lymphozyten durch die Mitogene PWM und Con A nicht zur Proliferation stimuliert wurden, konnte im Rahmen der mitogenen Stimulation durch PHA-M eine höhere Anzahl proliferierter Zellen in der Fütterungsgruppe, die getoastete Ackerbohnen und Inulin bekam, im Vergleich zu der Kontroll- und Inulingruppe, die extrudierte Ackerbohnen erhielten, nachgewiesen werden. Da durch Con A und PHA-M unterschiedliche Subpopulationen der T-Lymphozyten angesprochen werden, stellt dies eine mögliche Erklärung dafür dar, dass in der vorliegenden Studie nur durch PHA-M, nicht jedoch durch Con A eine Proliferation der intraepithelialen Lymphozyten des Darms hervorgerufen werden konnte. Während von Con A hauptsächlich Suppressor-Inducer-Zellen aktiviert werden, erfolgt dies bei PHA-M nur im Falle insgesamt hoher T-Zell-

Konzentrationen. Bei nur geringem Vorkommen der T-Lymphozyten werden durch PHA-M bevorzugt Helper-Inducer-Zellen stimuliert (Dronov, 2005), sodass diese möglicherweise in der vorliegenden Studie aktiviert wurden.

5.2.2 Immunologische Eigenschaften der Sauenmilch

Die Detektion der eingesetzten Oberflächenmarker sowie die gewählten Probennahmezeitpunkte konnten deutliche zeitabhängige Veränderungen der immunologischen Zusammensetzung der Sauenmilch aufzeigen. Grundsätzlich bestand zwischen dem ersten und fünften sowie zwischen dem ersten und 14. Laktationstag die stärkste Diskrepanz hinsichtlich der Gehalte an T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen sowie an myeloiden Zellen. In einigen Fällen konnten zusätzlich zwischen dem fünften und 14. Laktationstag Unterschiede in der Milchzusammensetzung nachgewiesen werden.

Lymphozyten

Die Detektion der $CD2^+CD5^-$ -Zellen ermöglichte den Nachweis der $\alpha\beta$ -T-Zellen sowie der $CD2^+-\gamma\delta$ -T-Zellen (Saalmüller und Bryant, 1994). Da einige $\gamma\delta$ -T-Zellen auch $CD2^-$ sind (Charentantanakul und Roth, 2007), ist anhand der gewählten Antikörperkombination keine absolute Einschätzung des T-Zell-Anteils in der Sauenmilch möglich. Die detektierten $CD2^+CD5^-$ -Zellen nahmen vom ersten zum fünften sowie vom ersten zum 14. Laktationstag signifikant ab. Bei genauerer Betrachtung der T-Zell-Subpopulationen zeigte sich, dass sowohl der Anteil der T-Helfer-Zellen ($CD4^+CD8\alpha^-$; $CD4^+CD8\alpha^+$; $CD4^+CD25^-$; $CD4^+CD25^+$) als auch der zytotoxischen T-Zellen ($CD4^-CD8\alpha^+$) im Laufe der Laktation abnahm. Zu berücksichtigen ist in diesem Zusammenhang, dass die $CD4^-CD8\alpha^+$ -Zellen sowohl zytotoxische T-Zellen als auch NK-Zellen darstellen, sodass zur Ermittlung der zytotoxischen T-Zellen der Anteil der NK-Zellen ($CD2^+CD5^-$) abgezogen werden muss. Die Zahl der NK-Zellen nahm ebenfalls vom ersten zum fünften sowie vom ersten zum 14. Laktationstag signifikant ab. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, dass bei Betrachtung der Zellpopulationen im Leukozytengate in einigen Fällen der Anteil der $CD2^+CD5^-$ -Zellen etwas höher war als der Anteil der $CD4^-CD8\alpha^+$ -Zellen, sowie der Anteil der $CD2^+CD5^-$ -Zellen geringer war als die detektierten Gehalte der T-Zell-Subpopulationen ($CD4^+CD8\alpha^-$; $CD4^+CD8\alpha^+$; $CD4^+CD25^-$; $CD4^+CD25^+$; $CD4^-CD8\alpha^+$). Obgleich es sich hierbei wahrscheinlich um messtechnisch zu begründende Diskrepanzen handelt, sollte zur Beurteilung und Differenzierung der genannten Leukozytenpopulationen das Lymphozytengate herangezogen werden, da in diesem die ermittelten Zellzahlen rechnerisch besser zu begründen sind.

Zur Bestimmung des B-Lymphozyten-Anteils in der Sauenmilch eignet sich insbesondere die Detektion der $CD21$ -Oberflächenmoleküle (Butler et al., 2006). Daneben stellen die $CD2^-CD5^+$ -Zellen B-Zellen sowie zu einem geringen Anteil $CD2^-$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen dar (Saalmüller und Bryant, 1994), und auch die $CD5^+MHCII^+$ -Zellen repräsentieren neben B-Lymphozyten beim Schwein möglicherweise ruhende $CD8^+$ -T-Lymphozyten (Saalmüller et al., 1991). Insgesamt ergab die Phänotypisierung der Lymphozyten in der Sauenmilch keine Unterschiede hinsichtlich des Anteils $CD21$ -positiver Zellen im Verlauf der Laktation. Demnach finden sich im Kolostrum und in der Sauenmilch vergleichbare B-Zell-Gehalte. Grundsätzlich wird diskutiert, ob Immunzellen das neonatale intestinale Epithel passieren können (Salmon et al., 2009), möglicherweise übernehmen die B-Lymphozyten jedoch insbesondere lokale Immunfunktionen, indem die Invasion von Pathogenen verhindert beziehungsweise reduziert

wird. Unter diesem Hintergrund ist zu vermuten, dass vergleichbare Funktionen eventuell nicht von den T-Lymphozyten ausgeführt werden, da ihr Gehalt in der Sauenmilch im Gegensatz zu den B-Lymphozyten im Laufe der Laktation abnimmt.

Myeloide Zellen, antigenpräsentierende Zellen

Auch der Gehalt an myeloiden Zellen (CD21⁻SWC3⁺) in der Sauenmilch zeigte eine von den T- und B-Lymphozyten differierende Verteilung im Verlauf der Laktation. Während im Kolostrum 55,6 (7,74-98,6) % der detektierten Leukozyten myeloide Zellen waren, reduzierte sich ihr Anteil zum fünften Tag der Laktation auf 12,6 (1,23-61,6) %. Im Gegensatz zu den T-Lymphozyten zeigte sich jedoch zum 14. Laktationstag keine weitere Abnahme der Zellgehalte, stattdessen nahm der Anteil der myeloiden Zellen auf 45,8 (0,38-93,4) % zu. Während der hohe Anteil im Kolostrum auch im Rahmen der passiven Immunität für die Saugferkel von Bedeutung sein könnte, kommt den Immunzellen nach Schluss der Darmbarriere möglicherweise eine lokale Schutzfunktion zu. Diese ist vermutlich aufgrund der zunächst beobachteten Abnahme der myeloiden Zellen vom ersten zum fünften Tag post partum eher zweitrangig. Daher erklärt sich der erneute Anstieg der myeloiden Zellen in der Milch vom fünften zum 14. Tag post partum unter Umständen vielmehr durch die zunehmende mechanische Belastung der Milchdrüse in der Säugeperiode als durch eine maternale Bereitstellung immunprotektiver Zellen.

Bei näherer Differenzierung der myeloiden Zellen konnte gezeigt werden, dass das beschriebene Verhalten auch bei den Makrophagen (CD14⁺) im Sinne einer Abnahme der Gehalte vom ersten zum fünften Tag post partum und einem erneuten Anstieg zum 14. Laktationstag vorlag.

Der Anteil der CD5⁻MHCII⁺-Zellen nahm im Verlauf der Laktation von 3,78 (0,93-17,8) % der detektierten Leukozyten auf 1,11 (0,05-12,2) % ab. Hierbei bestand eine signifikante Reduktion der Zellgehalte sowohl vom ersten zum fünften Tag post partum als auch vom fünften zum 14. Laktationstag. Bei den MHCII-positiven Zellen handelt es sich um B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen und NK-Zellen; beim Schwein haben möglicherweise auch T-Zellen antigenpräsentierende Funktionen (Saalmüller, 2006). Im Hinblick auf den relativ geringen Anteil antigenpräsentierenden Zellen in der Sauenmilch muss berücksichtigt werden, dass die Gehalte myeloider Zellen (CD21⁻SWC3⁺) mit etwa 56 % der detektierten Leukozyten im Kolostrum und rund 46 % am 14. Tag post partum deutlich höher lagen. Neben Granulozyten stellen Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen als potenziell antigenpräsentierende Zellen Populationen myeloider Zellen dar. Konsekutiv dürften die Granulozyten den Hauptanteil der CD21⁻SWC3⁺-Zellen darstellen.

Immunglobulingehalt

Die Beschaffenheit der Sauenmilch differierte sowohl in den absoluten als auch relativen Gehalten der gemessenen Immunglobulinklassen G, A und M im Laufe der Laktation. Neben einer generellen deutlichen Reduktion der Immunglobuline von 23,6 mg/ml im Kolostrum auf 5,28 mg/ml in der Sauenmilch am 14. Laktationstag konnte auch ein im Laufe der Laktation divergentes Verteilungsmuster festgestellt werden. Während im Kolostrum rund 70 % der gemessenen Immunglobuline dem Isotyp G angehörten und IgA und IgM zu etwa gleichen Anteilen vorhanden waren, machten am fünften Tag post partum IgG den geringsten (27,9 %) und IgM den höchsten (41,0 %) Anteil der Immunglobuline in der Sauenmilch aus. Am 14. Laktationstag dominierte schließlich IgA (58,1 %), gefolgt von IgM (37,1 %) und IgG (4,75 %). Die Veränderungen hinsichtlich der Immunglobulingehalte in der Sauenmilch im Verlauf der Laktationsperiode entsprechen den aus der Literatur bekannten Vorgängen im Sinne einer generellen Reduktion von IgG und einer Zunahme von IgA (Bourne und Curtis, 1973; Jensen und Pedersen, 1979; Stokes et al., 1992; Butler und Brown, 1994; Salmon, 1999; Berthon et

al., 2000). Jedoch konnten in der vorliegenden Studie deutlich geringere Immunglobulingehalte (mg/ml) im Kolostrum sowie teilweise etwas höhere Gehalte in der Milch ermittelt werden als in anderen Studien angegeben (Tabellen 2 und 51). Möglicherweise hat die im Rahmen der Aufarbeitung erfolgte starke Verdünnung der Sauenmilch (zwischen 1:10000 und 1:500000) zu den von den Literaturangaben abweichenden Ergebnissen geführt. Aufgrund der mit den Literaturangaben weitgehend übereinstimmenden relativen Immunglobulingehalte in der Sauenmilch kann dagegen auch vermutet werden, dass die absoluten Gehalte deutlich variieren können. Im Kolostrum stammen beinahe 100 % von IgG, 85 % von IgM und etwa 40 % von IgA aus dem Serum, wohingegen in der Sauenmilch rund 70 % der Immunglobuline der Klasse G und mehr als 90 % von IgA und IgM lokal in der Milchdrüse synthetisiert werden (Bourne und Curtis, 1973). Ein insgesamt geringerer Gehalt an Immunglobulinen im Kolostrum könnte daher möglicherweise auf eine verminderte Rekrutierung aus dem Blut zurückzuführen sein. Die im Vergleich zu anderen Literaturangaben festgestellten etwas höheren Gehalte an IgM in der Sauenmilch lassen eine stärkere lokale Synthese vermuten. Mögliche Einflussfaktoren für eine erhöhte systemische oder lokale Syntheserate können insbesondere haltungsassoziiert sein, da die Umgebung der Sauen ante partum das Repertoire an Immunglobulinen, das mit dem Kolostrum bereitgestellt wird, bestimmt (Porter, 1986).

5.2.3 Vergleich zwischen den Saug- und Absetzferkeln

In der vorliegenden Studie konnten deutliche Unterschiede in der Ausbildung sowohl des systemischen als auch des intestinalen Immunsystems zwischen den Saug- und Absetzferkeln festgestellt werden.

Lymphozyten im Blut

Aufgrund des für das Schwein charakteristischen Vorkommens von $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten (Yang und Parkhouse, 1996; Charentantanakul und Roth, 2007) wurden diese Subpopulationen in der vorliegenden Studie mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen. Zur Detektion der $\alpha\beta$ -T-Zellen wurden die Zellen durchflusszytometrisch bestimmt, die CD2- und CD5-positiv waren. Grundsätzlich können auch $\gamma\delta$ -T-Zellen CD2-positiv sein, diese machen jedoch mit einem Anteil von etwa 3-8 % aller Blutzellen einen relativ geringen Anteil aus (Yang und Parkhouse, 1996). Die CD2⁺CD5⁺- Zellen im Blut erreichten mit 30,2 (18,4-45,6) % der detektierten Lymphozyten bei den Saugferkeln und 33,6 (12,9-43,4) % bei den Absetzferkeln vergleichbare Werte in beiden Altersgruppen.

Im Hinblick auf die Subpopulationen der $\alpha\beta$ -T-Zellen im Blut nahmen die T-Helfer-Zellen (CD4⁺CD8⁻) bei den Saugferkeln die stärkste Fraktion ein, wohingegen bei den Absetzferkeln die zytotoxischen T-Zellen (CD4⁻CD8⁺) zu einem etwas höheren Anteil als die T-Helfer-Zellen vorlagen. Da neben zytotoxischen T-Zellen auch NK-Zellen CD8 α -Oberflächenmoleküle exprimieren, erfolgte eine zusätzliche Bestimmung der NK-Zellen (CD2⁺CD5⁻). Durch Subtraktion dieser Zellen von den CD4⁻CD8⁺-Zellen konnte der Anteil der zytotoxischen T-Zellen ermittelt werden. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass bei den Saugferkeln der Anteil der CD2⁺CD5⁻-Zellen etwas höher war als der Anteil der CD4⁻CD8⁺-Zellen, wobei es sich hierbei wahrscheinlich um messtechnisch zu begründende Diskrepanzen handelt. Insgesamt zeigte sich, dass die Saugferkel im Vergleich zu den Absetzferkeln einen höheren Anteil an T-Helfer-Zellen sowie einen geringeren Anteil an zytotoxischen T-Zellen im Blut aufwiesen. Im Rahmen bereits durchgeführter

Untersuchungen wurde ermittelt, dass bei Betrachtung der $\alpha\beta$ -T-Zellen im Blut von Schweinen die $CD4^+CD8\alpha^+$ -Zellen etwa 7-28 % aller peripheren mononukleären Zellen ausmachen (Yang und Parkhouse, 1996; Roth und Thacker, 2006), wobei der Gehalt mit zunehmendem Alter der Tiere leicht ansteigt (Charerntantanakul und Roth, 2007). Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie unter Berücksichtigung der Absetzferkel überein, wohingegen bei den zehn Tage alten Saugferkeln geringere Gehalte ermittelt wurden. Insgesamt kann vermutet werden, dass bei neonatalen Ferkeln nur ein geringer Anteil der Blutlymphozyten von zytotoxischen T-Zellen gebildet wird. Hinsichtlich der $CD4^+CD8\alpha^-$ -Anteile im Blut wurde festgestellt, dass diese etwa 3-14 % der peripheren Blutzellen ausmachen, ebenfalls mit einem leichten Anstieg der Zellzahl mit zunehmendem Alter der Tiere (Yang und Parkhouse, 1996; Zuckermann und Husmann, 1996). In der vorliegenden Studie wurde jedoch ermittelt, dass der Anteil der $CD4^+CD8\alpha^-$ -Zellen bei den Saugferkeln mit 17,2 (7,27-40,3) % aller detektierten Leukozyten signifikant höher war als bei den Absetzferkeln mit 6,55 (2,33-16,2) %. Da neben der Detektion $CD4$ -positiver und $CD8\alpha$ -negativer Zellen zusätzlich eine weitere Antikörperkombination gewählt wurde, um T-Helfer-Zellen nachzuweisen ($CD4^+CD25^-$) und hier sowohl bei den Saugferkeln (9,96 (2,95-34,5) %) als auch bei den Absetzferkeln (10,3 (3,45-17,2) %) mit den aus den bisher stattgefundenen Studien vergleichbare Ergebnisse ermittelt wurden, handelt es sich bei den Werten der Bestimmung $CD4^+CD8\alpha^-$ -Zellen möglicherweise um ein messtechnisches Artefakt.

Die $CD4^+CD8\alpha^-$ -Zellen erkennen nur Antigene, die an MHC-Klasse-II-Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen gebunden sind. Als Folge der Aktivierung proliferieren die Zellen und exprimieren $CD8$ - und MHCII-Moleküle (Saalmüller et al., 1991, 2002; Summerfield et al., 1996; Zuckermann und Husmann, 1996). Diese $CD4^+CD8\alpha^+$ -Zellen werden als T-Gedächtniszellen bezeichnet (Summerfield et al., 1996; Zuckermann und Husmann, 1996; Haverson et al., 1999; Saalmüller et al., 2002). Ihr Vorkommen im Blut steigt mit zunehmendem Alter stark an, während bei sieben Tage alten Ferkeln nur etwa 2 % der peripheren mononukleären Zellen $CD4$ - und $CD8\alpha$ -Oberflächenmoleküle exprimieren, ließen sich bei drei Jahre alten Schweinen bis zu 55 % ausmachen (Saalmüller et al., 1987; Pescovitz et al., 1994; Saalmüller und Bryant, 1994; Yang und Parkhouse, 1996; Zuckermann und Gaskins, 1996; Zuckermann und Husmann, 1996). In der vorliegenden Studie wurden bei den Saugferkeln 2,56 (1,55-32,8) % und bei den Absetzferkeln 6,39 (1,87-10,5) % $CD4^+CD8\alpha^+$ -Zellen detektiert. Grundsätzlich ist festzustellen, dass sowohl in einem Alter von zehn Tagen als auch nach 60 Tagen offenbar nur geringe Anteile der $CD4^+CD8\alpha^+$ -Zellen im Blut vorliegen. Diese Vermutung wird auch dadurch gestützt, dass der Anteil der $CD4^+CD25^+$ -Zellen mit etwa 2-3 % der detektierten Leukozyten im Blut bei den Saug- und Absetzferkeln ebenfalls gering war. Die Expression von $CD4$ - und $CD25$ -Oberflächenmolekülen zeigt wie die Expression von $CD4$ - und $CD8$ -Molekülen eine Aktivierung der T-Helfer-Zellen an (Saalmüller et al., 2002).

Die $\gamma\delta$ -T-Zellen können in $CD2$ -positive und $CD2$ -negative Zellen unterteilt werden (Yang und Parkhouse, 1996). Während die $CD2$ -positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen nur etwa 3 % der peripheren mononukleären Zellen ausmachen, nehmen die $CD2$ -negativen $\gamma\delta$ -T-Zellen mit etwa 15-25 % einen deutlich höheren Anteil ein (Yang und Parkhouse, 1996). In der vorliegenden Studie wurden die $\gamma\delta$ -T-Zellen ($TCR1^+$) nicht aufgrund ihrer Expression der $CD2$ -Oberflächenmoleküle detektiert und auf diese Weise unterschieden, jedoch konnte der Anteil der $CD2$ -positiven und -negativen $\gamma\delta$ -T-Zellen rechnerisch abgeschätzt werden. Die Subtraktion der T-Helfer-Zellen ($CD4^+CD8\alpha^-$) und zytotoxischen T-Zellen ($CD2^+CD5^- - CD4^+CD8\alpha^+$) von den $CD2^+CD5^+$ -Zellen ($\alpha\beta$ -T-Zellen (total), $CD2^+-\gamma\delta$ -T-Zellen) ergab einen ungefähren Anteil von 11-19 % $CD2$ -positiver $\gamma\delta$ -T-Zellen. Obgleich in der vorliegenden Studie demnach höhere Anteile an $CD2$ -positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen vorgefunden wurden als in der

Literatur beschrieben, stimmen die ermittelten Gesamtgehalte der $\gamma\delta$ -T-Zellen (TCR1^+) mit etwa 33 % aller detektierten Leukozyten mit den bekannten Daten (Yang und Parkhouse, 1996) weitgehend überein, sodass vermutet werden kann, dass die relativen Anteile von CD2-positiven und CD2-negativen $\gamma\delta$ -T-Zellen bei Ferkeln variieren können. Insgesamt waren die ermittelten Gesamtgehalte der $\gamma\delta$ -T-Zellen bei den Saug- und Absetzferkeln vergleichbar. Die in der Literatur beschriebene altersabhängige Reduktion der $\gamma\delta$ -T-Zellen (Binns et al., 1992; Yang und Parkhouse, 1996) ist demnach noch nicht in einem Alter der Ferkel von acht Wochen eingetreten.

Der Anteil der B-Lymphozyten im Blut ($\text{CD21}^+\text{SWC3}^-$ -Zellen) war bei den Absetzferkeln höher als bei den Saugferkeln. Grundsätzlich wurden B-Lymphozyten im Rahmen der Antikörperfärbungen der vorliegenden Studie auch anhand weiterer detektierter Oberflächenmoleküle nachgewiesen. Die Detektion von $\text{CD2}^-\text{CD5}^+$ -Zellen schließt neben B-Zellen auch CD2-negative $\gamma\delta$ -T-Zellen ein (Saalmüller und Bryant, 1994), der Nachweis von $\text{CD5}^+\text{MHCII}^+$ -Zellen umfasst neben B-Lymphozyten auch zu einem geringen Anteil ruhende CD8^+ -T-Zellen (Saalmüller et al., 1991). Sowohl bei der Detektion der $\text{CD5}^+\text{MHCII}^+$ -Zellen als auch der $\text{CD2}^-\text{CD5}^+$ -Zellen konnten höhere Gehalte dieser Zellen bei den Absetzferkeln im Vergleich zu den Saugferkeln festgestellt werden, sodass insgesamt geschlussfolgert werden kann, dass die Gehalte an B-Lymphozyten als Effektorzellen des spezifischen Immunsystems im Laufe der immunologischen Entwicklung von Ferkeln ansteigen.

Die NK-Zellen ($\text{CD2}^+\text{CD5}^-$) kamen im Blut zu einem höheren Anteil ($p \leq 0,05$) bei den Saugferkeln als bei den Absetzferkeln vor. Aufgrund des sich erst mit zunehmendem Alter entwickelnden körpereigenen Immunsystems stellt der höhere Anteil unspezifischer Effektorzellen möglicherweise einen mit dem Alter assoziierten Kompensationsmechanismus dar.

Der Vergleich der Proliferationsleistung der Lymphozyten im Blut der Saug- und Absetzferkel konnte zeigen, dass bei den Saugferkeln eine geringere Anzahl Con A- und eine höhere Anzahl PWM-stimulierter Zellen vorlag als bei den Absetzferkeln. Con A stimuliert, ebenso wie PHA-M, ausschließlich T-Lymphozyten (Abbas et al., 1996), wobei unterschiedliche Subpopulationen der T-Lymphozyten angesprochen werden. Die von Con A aktivierten CD4^+ -Zellen können in Anwesenheit von CD8^+ -Zellen die Immunglobulinsynthese durch B-Zellen unterdrücken (Suppressor-Inducer-Zellen, CD45RA) und zugleich Helferfunktionen für B-Zellen (Helper-Inducer-Zellen, CDw29) aufweisen (Cruse und Lewis, 1995). Während Con A vorwiegend die CD45RA-Expression auf CD4-Lymphozyten stimuliert, liegt bei der Stimulation durch PHA-M eine Abhängigkeit von der T-Zell-Konzentration vor. Bei nur geringem Vorkommen der T-Lymphozyten werden durch PHA-M vorrangig Helper-Inducer-Zellen stimuliert, wohingegen die Zellen bei einem hohen Vorkommen von T-Lymphozyten Suppressorfunktion entwickeln (Dronov, 2005). PWM stimuliert sowohl B- als auch T-Lymphozyten (Ruscetti et al., 1977). Insgesamt beruht das Prinzip des Proliferationstests darauf, dass bereits aktivierte Lymphozyten bei erneuter Stimulation zur Formation von Blasten angeregt werden. Der geringere Anteil durch Con A stimulierbarer T-Lymphozyten bei den Saugferkeln bedeutet in diesem Kontext, dass ein geringerer Anteil einer aktivierten Subpopulation von T-Lymphozyten vorhanden war, wohingegen die höheren Gehalte PWM-stimulierter Zellen bei den Saugferkeln auf ein stärkeres Vorhandensein aktivierter B- und/oder T-Lymphozyten hindeuten. Allerdings muss auch berücksichtigt werden, dass keine Unterschiede der Proliferationsleistung durch die Stimulation PHA-M zwischen den beiden Altersgruppen der Ferkel festgestellt wurden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Absetzferkel einen höheren Anteil CD45RC-positiver Zellen im Blut aufwiesen im Vergleich zu den Saugferkeln. Die Expression von CD45RC-Oberflächenmolekülen wird in aktivierten T-Helfer-Zellen herunterreguliert (Zuckermann et al., 1998; Saalmüller et al., 2002), zudem können auch weitere

Leukozytensubpopulationen wie NK-Zellen oder $\gamma\delta$ -T-Zellen CD45RC-Oberflächenmoleküle exprimieren (Gerner et al., 2009). Insgesamt sollte bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass sowohl mit Hilfe des Proliferationstests als auch anhand der Detektion CD45RC⁺-Zellen jeweils Subpopulationen von Lymphozyten überprüft wurden. Eine generelle Beurteilung hinsichtlich des Vorkommens aktivierter Lymphozyten im Blut der Ferkel ist daher schwierig und kann nicht abschließend geklärt werden.

Myeloide Zellen und antigenpräsentierende Zellen im Blut

Der Anteil der CD21⁻SWC3⁺-Zellen (Monozyten, Granulozyten, dendritische Zellen) im Blut der Saugferkel war signifikant höher als bei den Absetzferkeln. Aufgrund einer vergleichbaren Anzahl an CD14⁺-Zellen (Monozyten) und CD5⁻MHCII⁺-Zellen (dendritische Zellen, B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, ggf. T-Zellen) zwischen den beiden Altersgruppen ist der Unterschied in der Expression der SWC3-Moleküle wahrscheinlich auf das höhere Vorkommen von Granulozyten im Blut der Saugferkel zurückzuführen. Gestützt wird diese Vermutung durch die Blutbildanalysen (Tabellen 27 und 28), die einen höheren prozentualen Anteil segmentkerniger Granulozyten bei den Saugferkeln im Vergleich zu den Absetzferkeln aufzeigen konnten. Wie auch bei der Detektion der NK-Zellen könnte das verstärkte Vorkommen unspezifischer Effektorzellen im Blut möglicherweise infolge des noch nicht entwickelten spezifischen Immunsystems der Saugferkel resultieren.

Lymphozyten in der Lamina epithelialis des Darms

In der intestinalen Lamina epithelialis können wie im Blut sowohl $\alpha\beta$ - als auch $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten vorgefunden werden (Rothkötter et al., 1999). Insgesamt konnte bei den Absetzferkeln ein annähernd doppelt so hoher Anteil an CD2⁺CD5⁺-Zellen ($\alpha\beta$ -T-Zellen und CD2-positive $\gamma\delta$ -T-Zellen) im Vergleich zu den Saugferkeln nachgewiesen werden. Bei fokussierter Betrachtung der Subpopulationen $\alpha\beta$ -T-Zellen wurde deutlich, dass der Unterschied hinsichtlich der Gehalte an CD2⁺CD5⁺-Zellen aus einer deutlich höheren Anzahl zytotoxischer T-Zellen (CD4⁺CD8 α^{high}) bei den Absetzferkeln resultierte. Der detektierte Anteil von T-Helfer-Zellen (CD4⁺CD8 α^-) war in beiden Altersgruppen gering, obgleich bei den Saugferkeln etwas höhere Gehalte vorgefunden wurden. Grundsätzlich ist an dieser Stelle anzumerken, dass nach Literaturangaben etwa 90 % der intraepithelialen Zellen des Darms durch CD8⁺-Zellen repräsentiert werden (Abreu-Martin und Targan, 1996; Iijima et al., 2001; MacDonald, 2003). Da in der vorliegenden Studie deutlich geringere Gehalte vorgefunden wurden, hat möglicherweise eine Kontamination der Proben mit Zellen der Lamina propria stattgefunden.

Der Anteil an T-Gedächtniszellen (CD4⁺CD8 α^{low}) war bei den Ferkeln beider Altersgruppen mit etwa 4,5–5,5 % aller detektierten Leukozyten vergleichbar. Die Gehalte an CD4⁺CD8 α^{low} -Zellen können im peripheren lymphatischen Gewebe rund 3-13 % ausmachen (Lunney und Pescovitz, 1987; Saalmüller et al., 1987; Yang und Parkhouse, 1996; Zuckermann und Husmann, 1996), sodass die in der vorliegenden Studie vorgefundenen Werte mit den aus der Literatur bekannten Daten übereinstimmen.

Hinsichtlich der $\gamma\delta$ -T-Zellen kann grundsätzlich eine Unterteilung in CD2-positive und CD2-negative Zellen erfolgen (Yang und Parkhouse, 1996). Hierbei machen die CD2-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen etwa 1,2-22 % und die CD2-negativen $\gamma\delta$ -T-Zellen 1-4 % der Leukozyten im peripheren lymphatischen Gewebe aus (Yang und Parkhouse, 1996). Dies steht im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Gehalten an CD2-positiven und CD2-negativen $\gamma\delta$ -T-Zellen im Blut, da hier von einem dominierenden Anteil der CD2-negativen $\gamma\delta$ -T-Zellen im Vergleich zu den CD2-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen ausgegangen wird (Yang und Parkhouse, 1996). In der vorliegenden Studie wurden die $\gamma\delta$ -T-Zellen (TCR1⁺) nicht direkt aufgrund ihrer CD2-Expression detektiert, sondern rechnerisch differenziert. Da CD2⁺CD5⁺-Zellen neben $\alpha\beta$ -T-

Zellen (T-Helfer-Zellen und zytotoxische T-Zellen) auch CD2-positive $\gamma\delta$ -T-Zellen umfassen, führt die Differenz der addierten T-Helfer- und zytotoxischen T-Zellen ($CD4^+CD8\alpha^-$ -Zellen und $CD4^+CD8\alpha^{high}$ -Zellen) zu dem Anteil der CD2-positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen. Dieser betrug infolgedessen bei den Saugferkeln etwa 5 % und bei den Absetzferkeln etwa 7 %. Demnach dürften die CD2-negativen $\gamma\delta$ -T-Zellen in der vorliegenden Studie mit rund 9-12 % den größeren Anteil der detektierten $\gamma\delta$ -T-Zellen ($TCR1^+$) repräsentieren. Obgleich diese Ergebnisse im Vergleich zu den aus der Literatur bekannten Daten etwas höher liegen, kann festgestellt werden, dass der altersabhängige Vergleich bezüglich der prozentualen $\gamma\delta$ -T-Zellen keine Unterschiede sowohl in den relativen als auch absoluten Gehalten dieser Subpopulationen aufzeigen konnte.

Zur Bestimmung des B-Lymphozyten-Anteils in der intestinalen Lamina epithelialis wurden zwei verschiedene Färbungen eingesetzt, die jedoch nach erfolgter Messung eine nur eingeschränkte Aussagekraft besitzen. Der Nachweis von $CD2^-CD5^+$ -Zellen umfasst neben B-Zellen auch CD2-negative $\gamma\delta$ -T-Zellen und ergab sowohl bei den Saug- als auch Absetzferkeln vergleichbare Werte mit etwa 1,7 % aller detektierten Leukozyten. Im Gegensatz dazu können B-Zellen auch mittels CD5- und MHCII-Molekülen nachgewiesen werden, wobei beim Schwein auch ruhende $CD8^+$ -T-Zellen CD5- und MHCII-positiv sein können (Saalmüller et al., 1991). Der Anteil der $CD5^+$ -MHCII⁺-Zellen unterschied sich bei den Saugferkeln mit 9,77 (0,68-19,5) % signifikant von dem nachgewiesenen Gehalt bei den Absetzferkeln (22,3 (1,34-47,7) %). Möglicherweise haben die im Rahmen der Detektion von CD5- und MHCII-Oberflächenmolekülen ebenfalls nachgewiesenen ruhenden $CD8^+$ -T-Lymphozyten einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Messwerte genommen. Darüber hinaus könnte jedoch auch ein Messfehler eine Ursache für die Diskrepanzen der ermittelten B-Zell-Gehalte mit Hilfe der Nachweise von $CD2^-CD5^+$ -Zellen und $CD5^+$ -MHCII⁺-Zellen darstellen. Insgesamt ist die Beurteilung der ermittelten B-Lymphozytengehalte in der Lamina epithelialis des Darms der Saug- und Absetzferkel in der vorliegenden Studie anhand der gewählten Antikörperkombinationen schwierig zu beurteilen und kann nicht abschließend geklärt werden.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen der peripheren mononukleären Zellen konnte bei der Detektion der intraepithelialen Lymphozyten des Darms ein bei den Absetzferkeln erhöhter Anteil von NK-Zellen ($CD2^+CD5^-$) im Vergleich zu den Saugferkeln nachgewiesen werden. NK-Zellen stellen zelluläre Vertreter des unspezifischen Immunsystems dar, wohingegen T- und B-Lymphozyten dem spezifischen Immunsystem zuzuordnen sind (Gerner et al., 2009). Unter Berücksichtigung der ermittelten Gehalte der Immunzellen des spezifischen Immunsystems, insbesondere hinsichtlich der T-Zell-Gehalte, wurde trotz des bei den Absetzferkeln im Vergleich zu den Saugferkeln vorgefundenen höheren Anteils an NK-Zellen deutlich, dass die Saugferkel einen höheren Anteil an unspezifischen Effektorzellen aufwiesen als die Absetzferkel. Während bei den Saugferkeln ein Verhältnis der NK-Zellen ($CD2^+CD5^-$) zu den T-Lymphozyten ($CD2^+CD5^+$) von 1:2,1 vorlag, belief sich dieses bei den Absetzferkeln auf 1:2,7. Somit konnte auch im Rahmen der Phänotypisierung der intraepithelialen Leukozyten des Darms gezeigt werden, dass offenbar eine deutliche Entwicklung des Immunsystems der Ferkel zwischen dem zehnten und dem 59. Tag post natum stattgefunden hat.

Myeloide Zellen und antigenpräsentierende Zellen in der Lamina epithelialis des Darms

Mit der gewählten Aufbereitungsmethode des Darms mittels mehrfacher Inkubation in HBSS-DTT sowie nachfolgender Filtration über eine Gaze sollten grundsätzlich lediglich die intraepithelialen Lymphozyten isoliert werden. Bei den intraepithelialen Zellen des Darms handelt es sich zu 90 % um $CD8^+$ -Zellen (Abreu-Martin und Targan, 1996; Iijima et al., 2001; MacDonald, 2003). In der durchflusszytometrischen Bestimmung konnten jedoch zu einem

größeren Anteil myeloide Zellen (SWC3⁺; CD16⁺) nachgewiesen wurden, sodass möglicherweise eine Kontamination der Proben mit Zellen der Lamina propria stattgefunden hat. Insgesamt zeigte sich ein höherer Anteil an SWC3⁺-Zellen (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen) bei den Absetzferkeln (10,1 (2,60-49,7) %) aller detektierten Leukozyten) im Vergleich zu den Saugferkeln (2,47 (0,13-34,9) %). Die Detektion von CD16⁺-Zellen umfasst neben Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen auch NK-Zellen (Halloran et al., 1994; Aller et al., 1995; Piriou-Guzylack und Salmon, 2008), sodass sich die im Vergleich zu den SWC3⁺-Zellen höheren Gehalte bei den Absetzferkeln (31,1 (13,3-56,8) %) und bei den Saugferkeln (31,2 (0,92-59,8) %) durch einen insgesamt höheren Anteil nachgewiesener NK-Zellen erklären lassen. Für die CD5⁺MHCII⁺-Zellen (überwiegend antigenpräsentierende Zellen (B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen, ggf. T-Zellen), z.T. auch NK-Zellen) zeigte sich ein geringerer Anteil bei den Absetzferkeln als bei den Saugferkeln. Zusammenfassend lässt sich herausstellen, dass in der vorliegenden Studie innerhalb des intestinalen Immunsystems bei den Absetzferkeln etwas höhere Anteile an myeloiden Zellen, jedoch geringere Gehalte an antigenpräsentierenden Zellen vorgefunden wurden als bei den Saugferkeln. Unter Berücksichtigung der absoluten Zellgehalte haben diese Gruppen der Effektorzellen jedoch bei den Ferkeln beider Altersstufen einen im Vergleich zu den Lymphozyten eher geringen Anteil eingenommen.

Immunglobulingehalt im Serum

Die Ermittlung der Immunglobulinkonzentrationen im Serum der Saug- und Absetzferkel konnte zeigen, dass der Gesamtgehalt bei den Saugferkeln 2,7-fach höher war als bei den Absetzferkeln. Aufgrund der maternalen Immunglobulinbereitstellung mit dem Kolostrum (Salmon et al., 2009) wurde in der vorliegenden Studie ebenfalls der Immunglobulingehalt im Serum der Sauen ermittelt. Auch dieser war deutlich höher als bei den Absetzferkeln, sodass vermutet werden kann, dass die maternale Immunglobulinbereitstellung zu einer höheren Immunglobulinkonzentration im Serum der Ferkel führt als durch die Eigensynthese des sich noch entwickelnden Immunsystems der Absetzferkel erwirkt werden kann. Hinsichtlich der Immunglobulinklassen konnte zunächst festgestellt werden, dass die Saugferkel, ebenso wie die Sauen, höhere Gehalte (mg/ml) an IgG aufwiesen als die Absetzferkel. Im Gegensatz dazu lagen sowohl die IgA- als auch die IgM-Konzentrationen bei den Sauen und Absetzferkeln höher als die ermittelten Werte im Serum der Saugferkel. Bei fokussierter Betrachtung der relativen Anteile der gemessenen Immunglobuline zeigte sich, dass das Verteilungsmuster bei den Sauen und Absetzferkeln vergleichbar war, mit IgG als dominierende Immunglobulinklasse, gefolgt von IgM (IgG:IgM = ~4-5:1) und nur einem geringen Anteil an IgA (IgG:IgA = ~15-16:1). Bei den Saugferkeln war IgG mit rund 97 % die vorherrschende Immunglobulinklasse im Serum, wohingegen IgA und IgM nur zu einem sehr geringen Anteil vorlagen (IgG:IgM = ~71:1; IgG:IgA = ~54:1).

Insgesamt bedeutet die Resorption von Immunglobulinen aus dem Kolostrum für die Saugferkel eine temporäre Immunkompetenz im Sinne einer passiven Immunisierung, wohingegen das von den Saugferkeln abweichende Verteilungsmuster der Immunglobulinklassen im Serum der Sauen und Absetzferkel auf die Fähigkeit einer differenzierten Immunantwort im Kontext eines weiter entwickelten Immunsystems sowie einer aktiven Immunantwort schließen lässt.

5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist es gelungen, die Subpopulationen der Immunzellen im Blut sowie in der intestinalen Lamina epithelialis und in der Milch von Schweinen weitgehend zu quantifizieren. Dies ermöglichte, zusammen mit den ebenfalls erfassten Immunglobulingehalten im Serum und in der Milch der Tiere, eine Beschreibung der immunologischen Entwicklung von Saug- und Absetzferkeln und ist somit auch für zukünftige Studien mit immunologischen Fragestellungen von grundsätzlichem Interesse.

Weiterhin sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Inulin sowie von getoasteten und extrudierten Ackerbohnen auf immunologische Parameter untersucht werden. Insgesamt konnten nur wenige Unterschiede zwischen den Kontroll- und Versuchsgruppen ermittelt werden, sodass eine eher geringe immunmodulatorische Wirkung vermutet werden kann. Aufgrund der vereinzelt beobachteten Aktivierung des Immunsystems durch den Einsatz von Inulin im Futter der Ferkel sollte die Möglichkeit von Folgeuntersuchungen, insbesondere im Rahmen von Infektionsversuchen, überdacht werden, um die Bedeutung der nachgewiesenen Ergebnisse weiter zu ermitteln.

6. Zusammenfassung

Untersuchungen zum Einfluss von Inulin und thermisch behandelten Ackerbohnen auf immunologische Parameter bei Sauen, Saug- und Absetzferkeln

Das Immunsystem ist von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung von Ferkeln. Die Zusammensetzung des Futters sowie die Behandlung einzelner Futterkomponenten können Immunmechanismen beeinflussen. Ziel dieser Arbeit war es daher, den möglichen immunmodulatorischen Einfluss von Inulin sowie getoasteten und extrudierten Ackerbohnen (*Vicia faba L.*) zu überprüfen.

Hierfür wurden Untersuchungen an Sauen sowie Saug- und Absetzferkeln im Rahmen von zwei separaten Versuchsdurchgängen durchgeführt. Insgesamt 21 trächtige Sauen wurden gleichmäßig auf zwei Versuchsgruppen aufgeteilt. Die Sauen erhielten ein Trächtigkeitsbeziehungsweise Laktationsfutter ohne (Kontrollgruppe) oder mit (Inulingruppe) 3% Inulin. Am 1., 5. (± 1) und 14. (± 1) Tag post partum (p.p.) wurden Milchproben für eine Leukozytenphänotypisierung sowie zur Bestimmung der Immunglobulingehalte von den Sauen gewonnen, am fünften Tag p.p. erfolgte zudem eine Blutentnahme zur Bestimmung der Immunglobulingehalte im Serum der Tiere. Die Ferkel der Sauen wurden entsprechend der Fütterung der Muttertiere ebenfalls in eine Kontroll- und eine Inulingruppe eingeteilt. Die Saugferkel erhielten ab dem 14. Lebenstag ein Saugferkelbeifutter ohne beziehungsweise mit 3% Inulin. Insgesamt 16 Saugferkel wurden am zehnten Lebenstag euthanasiert, um Blut- und Darmproben für eine Leukozytenphänotypisierung und -proliferation sowie für eine Immunglobulinbestimmung im Serum zu gewinnen. Die verbliebenen Saugferkel der Kontroll- und Inulingruppe wurden mit 42 Tagen abgesetzt und, entsprechend ihrer bisherigen Fütterung ohne beziehungsweise mit Inulin, auf zwei Kontroll- sowie auf zwei Inulingruppen aufgeteilt. Jeweils eine Kontroll- und eine Inulingruppe der Ferkel erhielt ein Aufzuchtfutter mit getoasteten Ackerbohnen, die anderen beiden Gruppen erhielten das Aufzuchtfutter mit extrudierten Ackerbohnen. Das Futter der Inulingruppen enthielt zusätzlich jeweils 3% Inulin. Somit ergab sich für die Absetzferkel folgende Gruppenaufteilung: Kontrollgruppe mit getoasteten Ackerbohnen, Kontrollgruppe mit extrudierten Ackerbohnen, Inulingruppe mit getoasteten Ackerbohnen, Inulingruppe mit extrudierten Ackerbohnen. Am 59. (± 1) Lebenstag wurden pro Gruppe insgesamt acht Absetzferkel euthanasiert, um Blut- und Darmproben für eine Leukozytenphänotypisierung und -proliferation sowie für eine Immunglobulinbestimmung im Serum zu gewinnen. Die Immunzellsubpopulationen aus der Milch, dem Blut und aus der Lamina epithelialis des Darms wurden mit primären und sekundären Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Zur Beurteilung der Proliferationsleistung wurden die Lymphozyten aus dem Blut und aus dem Darm mit den Mitogenen Pokeweed Mitogen (PWM), Phythämagglutinin M (PHA-M) und Concanavalin A (Con A) stimuliert. Der Immunglobulingehalt der Klassen G, A und M in der Milch sowie im Serum wurde mit Hilfe eines Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) ermittelt. Zusätzlich zu den Bestimmungen der Immunparameter erfolgte eine Erfassung von Leistungsdaten (Anzahl der lebend und tot geborenen sowie abgesetzten Ferkel, Futteraufnahme, Futteraufwand, Lebendmassenzunahme).

Der altersassoziierte Vergleich zwischen den Saug- und Absetzferkeln ergab sowohl im Rahmen der Phänotypisierung der Lymphozyten aus dem Blut als auch aus dem Darm deutliche Unterschiede in den Gehalten der detektierten Leukozytenpopulationen (T-Zellen ($CD2^+CD5^+$), B-Zellen ($CD21^+$), NK-Zellen ($CD2^+CD5^-$) und myeloide Zellen ($SWC3^+$)) sowie der entsprechenden Subpopulationen (T-Helfer-Zellen ($CD4^+CD8\alpha^-$), zytotoxische T-Zellen ($CD4^-CD8\alpha^+$), $\gamma\delta$ -T-Zellen Zellen ($TCR1^+$) und Makrophagen/Monozyten ($CD14^+$)).

Hinsichtlich der Immunglobulingehalte im Serum wiesen die Sauen und Saugferkel höhere absolute Gehalte als die Absetzferkel auf, wohingegen das Verteilungsmuster von IgG, IgM und IgA zwischen den Sauen und Absetzferkeln ähnlich und von dem ermittelten Immunglobulinmuster im Serum der Saugferkel verschieden war.

Die Untersuchung der immunologischen Zusammensetzung der Sauenmilch ergab deutliche zeitabhängige Veränderungen hinsichtlich der Gehalte der detektierten Leukozytenmarker, mit einer generellen Abnahme der Lymphozytenmarker vom ersten zum 14. Tag p.p. sowie einer Abnahme der Marker zum Nachweis myeloider Zellen vom ersten zum fünften und einem anschließenden Anstieg vom fünften zum 14. Laktationstag. Die Immunglobulingehalte nahmen im Verlauf der Laktationsperiode deutlich ab, zudem erfolgte eine Verschiebung des Verteilungsmusters. Während im Kolostrum IgG dominierte und IgA und IgM zu etwa gleichen Anteilen vorhanden waren, machten am fünften Tag post partum IgG den geringsten und IgM den höchsten Anteil der Immunglobuline in der Sauenmilch aus. Am 14. Laktationstag dominierte schließlich IgA, gefolgt von IgM und IgG.

Hinsichtlich eines möglichen fütterungsassoziierten Einflusses auf immunologische Parameter zeigte sich in der Sauenmilch am ersten Tag p.p. ein signifikant höherer Anteil CD21⁺-Zellen sowie am 14. Tag p.p. eine höhere Anzahl CD4⁺CD8 α ⁻-, CD4⁺CD25⁻- und CD5⁺MHCII⁺-Zellen in der Inulingruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Die Fütterung von Inulin sowie getoasteten beziehungsweise extrudierten Ackerbohnen hatte keinen Einfluss auf die ermittelten Leistungsdaten der Sauen und Ferkel. Ebenfalls konnten keine Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen im Rahmen der Phänotypisierung der peripheren mononukleären Blutzellen sowie der intraepithelialen Lymphozyten des Darms festgestellt werden. Der Proliferationstest der Lymphozyten aus dem Blut ergab bei den Saugferkeln einen höheren Anteil Con A-stimulierter Zellen in der Kontrollgruppe im Vergleich zu der Inulingruppe, wohingegen bei den Absetzferkeln keine Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar waren. Die Proliferation der intraepithelialen Lymphozyten aus dem Darm führte durch den Einsatz von PHA-M zu einem höheren Anteil stimulierter Zellen in der Fütterungsgruppe, die getoastete Ackerbohnen und Inulin bekam, im Vergleich zu der Kontroll- und Inulingruppe, die extrudierte Ackerbohnen erhielten.

Für die Immunglobulingehalte im Serum der Sauen und Saugferkel konnten keine Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen festgestellt werden, wohingegen bei den Absetzferkeln die Tiere in der Inulingruppe, unabhängig davon, ob sie getoastete oder extrudierten Ackerbohnen erhielten, signifikant erhöhte IgM-Gehalte im Vergleich zu der Kontrollgruppe aufwiesen.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnten Subpopulationen der Immunzellen im Blut, in der Lamina epithelialis des Darms und in der Milch von Schweinen weitgehend quantifiziert und somit, unter zusätzlicher Bestimmung der Immunglobulingehalte im Serum und in der Milch der Tiere, Aspekte der immunologischen Entwicklung von Saug- und Absetzferkeln beschrieben werden. Der Einsatz von Inulin sowie von getoasteten und extrudierten Ackerbohnen konnte nur in wenigen Fällen eine immunmodulatorische Wirkung aufzeigen. Dennoch sollte aufgrund der beobachteten Aktivierung des Immunsystems durch den Einsatz von Inulin im Futter der Sauen und Ferkel im Rahmen von Folgeuntersuchungen die physiologische Bedeutung der nachgewiesenen Ergebnisse näher ermittelt werden.

7. Summary

Investigations on the influence of inulin and heat-processed faba beans on immunological parameters in sows, suckling and weaning piglets

The immune system is of decisive importance for an adequate development of piglets. Diet composition and condition can modulate immune function in different ways. Aim of this study was to determine the potential immunomodulatory effect of inulin and toasted or extruded faba beans (*Vicia faba L.*).

For this purpose investigations were focused on sows, suckling and weaned piglets, resulting in two separate trials in two different years. In total, 21 gravid sows were divided into two groups, receiving either a control diet or a diet with 3% inulin (total concentration). The diets were fed from three weeks ante partum (a.p.) to six weeks post partum (p.p.). On days 1, 5 (± 1) and 14 (± 1) p.p. milk samples were taken for leukocyte differentiation and immunoglobulin determination. Additionally, blood samples for immunoglobulin determination were taken on day five p.p.. Considering the feeding groups of the sows, the suckling piglets were divided into a control and inulin group. After two weeks of life, piglets were fed with an additional feed without (control group) or with a total concentration of 3% inulin (inulin group). 16 suckling piglets were sacrificed on day ten post partum and blood for leukocyte characterisation, lymphocyte proliferation test and immunoglobulin determination was drawn. Additionally, tissue samples were taken from the middle of the jejunum for leukocyte characterisation and lymphocyte proliferation test. The remaining suckling piglets of the two feeding groups were weaned with an age of 42 days and divided in two control and two inulin groups, considering the previous feeding. Piglets of one control and one inulin group each received a diet with toasted faba beans or extruded faba beans, resulting in the following group allocation: control group with toasted faba beans, control group with extruded faba beans, inulin group with toasted faba beans, inulin group with extruded faba beans. Diets of the inulin groups were supplemented with 3% inulin (total concentration). Eight weaned piglets of each feeding group were sacrificed on day 59 (± 1) post partum and blood for leukocyte characterisation, lymphocyte proliferation test and immunoglobulin determination was drawn. Tissue samples were taken from the middle of the jejunum for leukocyte characterisation and lymphocyte proliferation test. Immune cell subpopulations in milk, blood and the intestinal Lamina epithelialis were stained with a panel of primary and secondary leukocyte antibodies and determined by flow cytometry. Proliferative activity of peripheral blood and intestinal intraepithelial lymphocytes was tested after stimulation with the mitogens Pokeweed Mitogen (PWM), Phythämagglutinin M (PHA-M) and Concanavalin A (Con A). To determine the amounts of the immunoglobulins IgG, IgA and IgM in the milk and serum, a commercial Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used. In addition to the measurement of the immune parameters, performance data were assessed (living, stillborn and weaned piglets, feed intake, feed conversion ratio, weight gain).

The comparison of the suckling and weaned piglets demonstrated significant differences in expression of the measured leukocyte surface markers in the blood and intestinal Lamina epithelialis ($\alpha\beta$ -T-cells and $CD2^+$ - $\gamma\delta$ -T-cells ($CD2^+CD5^+$), B-cells ($CD21^+$), Nk-cells ($CD2^+CD5^-$), myeloid cells ($SWC3^+$), T-helper cells ($CD4^+CD8\alpha^-$), cytolytic T-cells ($CD4^+CD8\alpha^+$), $\gamma\delta$ -T-cells ($TCR1^+$) and macrophages / monocytes ($CD14^+$)). Sows and suckling piglets showed higher amounts of immunoglobulins in the serum compared to the weaned piglets; however, pattern of immunoglobulin classes (IgG, IgA, IgM) was similar in weaned piglets and sows but different to the suckling piglets.

The characterisation of leukocytes in sow milk at different time points after parturition indicated significant time dependent changes of leukocyte composition with a general trend to reduction of lymphocyte surface markers during the lactation period, but only a decrease of surface markers expressed on myeloid cells until day five p.p. and a subsequent increase until day 14 p.p.. Amounts of immunoglobulins decreased during the lactation period, and pattern of immunoglobulin classes changed. As IgG dominated in colostrum and IgA and IgM showed similar concentrations, on day five post partum amounts of IgM were distinctly higher than amounts of IgA and IgG. On day 14 post partum IgA dominated in milk with subsequently higher concentrations of IgM compared to IgG. With respect to the impact of inulin on immunological parameters in sow milk, significant higher numbers of CD21⁺-cells (day 1 p.p.), CD4⁺CD8 α ⁺-, CD4⁺CD25⁻ and CD5⁺MHCII⁺-cells (day 14 p.p.) were found in the inulin group compared to the control group.

No dietary effect was noted for performance data of sows and piglets. In addition, no differences between feeding groups were recognized for the measured immune cell populations in the blood and intestinal Lamina epithelialis. The measurement of proliferative activity of peripheral blood lymphocytes demonstrated a higher percentage of Con A-stimulated cells in the control group of the suckling piglets compared to the inulin group, but no differences between feeding groups of the weaned piglets. With respect to the proliferative activity of the intestinal intraepithelial lymphocytes, a higher number of PHA-M-stimulated cells were noted in the inulin group fed toasted faba beans compared to the control and inulin group with extruded faba beans.

No differences between feeding groups were noted for the determination of immunoglobulins in the serum of sows and suckling piglets, however, weaned piglets in the inulin groups showed higher concentrations of IgM compared to the control group, with no additional effect of heat-processed faba beans.

In conclusion, the present study provides a detailed quantification of immune cells in the blood, intestinal Lamina epithelialis and milk of pigs, and an additional determination of immunoglobulins in the serum and milk, resulting in a characterization of partial aspects of immunological development in suckling and weaned piglets. The influence of inulin or different heat-processed faba beans on immunological parameters seems to be low. However, due to the demonstrated activating effects of inulin on the immune system, continuing studies are needed for further evaluation of the physiological meaning of the present results.

8. Zitierte Literatur

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. (1996):
Molekulare Grundlagen der T-Zell-Antigenerkennung und Aktivierung. Immunologie.
Verlag Hans Huber, Bern, 169-204.

Abreu, M.T. (2003):
Immunologic regulation of toll-like receptors in gut epithelium.
Current opinion in gastroenterology 19, 559-564.

Abreu-Martin, M.T., Targan, S.R. (1996):
Regulation of immune responses of the intestinal mucosa.
Critical reviews in immunology 16, 277-309.

Aherne, F.X., Lewis, A.J., Hardin, R.T. (1977):
An evaluation of faba beans (*Vicia faba*) as a protein supplement for swine.
Canadian journal of animal science 57, 321-328.

Akira, Sh., Takeda, K., Kaisho, T. (2001):
Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity.
Nature immunology 2, 675-680.

Aller, S.C., Cho, D., Kim, Y.B. (1995):
Characterization of the cytolytic trigger molecule G7/PNK-E as a molecular complex on the
surface of porcine phagocytes.
Cellular immunology 161, 270-278.

Arriëns, M.A., Summerfield, A., McCullough, K.C. (1998):
Differential adhesion molecule expression on porcine mononuclear cell populations.
Scandinavian journal of immunology 47, 487-495.

Bach Knudsen, K.E., Jensen, B.B., Hansen, I. (1993):
Digestion of polysaccharides and other major components in the small and large intestine of
pigs fed on diets consisting of oat fractions rich in β -D-glucan.
The British journal of nutrition 70, 537-556.

Bach Knudsen, K.E., Hessov, I. (1995):
Recovery of inulin from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) in the small intestine
of man.
The British journal of nutrition 74, 101-113.

Bach Knudsen, S.E., Serena, A., Canibe, N., Juntunen, K.S. (2003):
New insight into butyrate metabolism.
The proceedings of the nutrition society 62, 81-86.

Bailey, M., Stevens, K., Bland, P.W., Stokes, C.R. (1992):
A monoclonal antibody recognizing an epitope associated with pig interleukin-2 receptors.

Journal of immunological methods 153, 85-93.

Bengala Freire, J., Hulin, J.C., Peiniau, J., Aumaitre, A. (1989):
Effet de la cuisson extrusion du pois de printemps sur la digestibilité des aliments de sevrage précoce du porcelet et conséquences sur les performances jusqu'à l'abattage.
Journées de la recherche porcine en France 21, 75-82.

Bengala Freire, J., Aumaitre, A., Peiniau, J. (1991):
Effects of feeding raw and extruded peas on ileal digestibility, pancreatic enzymes and plasma glucose and insulin in early weaned pigs.
Journal of animal physiology and animal nutrition 65, 154-164.

Berthon, P., Tanneau, G., Salmon, H. (2000):
Immune factors of mammary secretions. In: Martinet, J., Houdebine, L.M. (editors). Biology of lactation.
Paris: INRA.

Binns, R.M., Duncan, I.A., Powis, S.J., Hutchings, A., Butcher, G.W. (1992):
Subsets of null and gamma delta T-cell receptor+ T lymphocytes in the blood of young pigs identified by specific monoclonal antibodies.
Immunology 77, 219-227.

Binns, R.M. (1994):
The Null/gamma delta TCR+ T cell family in the pig.
Veterinary immunology and immunopathology 43, 69-77.

Bloom, B.R., Salgame, P., Diamond, B. (1992):
Revisiting and revising suppressor T-cells.
Immunology today 13, 131-136.

Böhmer, B.M., Branner, G.R., Roth-Maier, D.A. (2005):
Precaecal and faecal digestibility of inulin (DP 10-12) or an inulin/Enterococcus faecium mix and effects on nutrient digestibility and microbial gut flora.
Journal of animal physiology and animal nutrition 89, 388-396.

Bouhnik, Y., Flourié, B., Ouarne, F., Riottot, M., Bisetti, N., Bornet, F., Rambaud, J. (1994):
Effects of prolonged ingestion of fructo-oligosaccharides on colonic bifidobacteria, fecal enzymes and bile acids in humans.
Gastroenterology 106, A598 (abs.).

Bouhnik, Y., Vahedi, K., Achour, L., Attar, A., Salfati, J., Pochart, P., Marteau, P., Flourié, B., Bornet, F., Rambaud, J.-C. (1999):
Short-chain fructo-oligosaccharide administration dose-dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans.
The Journal of nutrition 129, 113-116.

Bourges, D., Meurens, F., Berri, M., Chevaleyre, C., Zanello, G., Levast, B., Melo, S., Gerdt, V., Salmon, H. (2008):
New insights into the dual recruitment of IgA+ B cells in the developing mammary gland.
Molecular immunology 45, 3354-3362.

Bourne, F.J., Curtis, J. (1973):
The transfer of immunoglobulins IgG, IgA and IgM from serum to colostrums and milk.
Immunology 24, 157-162.

Branner, G.R., Bohmer, B.M., Erhardt, W., Henke, J., Roth-Maier, D.A. (2004):
Investigation on the precaecal and faecal digestibility of lactulose and inulin and their influence on nutrient digestibility and microbial characteristics.
Archives of animal nutrition 58, 353-366.

Brown, G.D., Gordon, S. (2001):
A new receptor for β -glucans.
Nature 413, 36-37.

Buddington, K.K., Donahoo, J.B., Buddington, R.K. (2002):
Dietary oligofructose and inulin protect mice from enteric and systemic pathogens and tumor inducers.
The Journal of nutrition 132, 472-477.

Burnet, F.M. (1959):
The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity.
Cambridge University Press, London.

Butler, J.E., Klobasa, F., Werhahn, E. (1981):
The differential localization of IgA, IgM and IgG in the gut of suckled neonatal piglets.
Veterinary immunology and immunopathology 2, 53-65.

Butler, J.E., Brown, W.R. (1994):
The immunoglobulins and immunoglobulin genes of swine.
Veterinary immunology and immunopathology 43, 5-12.

Butler, J.E., Sun, J., Weber, P., Ford, S.P., Rehakova, Z., Sinkora, J., Lager, K. (2001):
Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. IV. Switch recombination, primary in fetal thymus occurs independent of environmental antigen and is only weakly associated with repertoire diversification.
Journal of immunology 167, 3239-3249.

Butler, J.E., Sun, J., Wertz, N., Sinkora, M. (2006):
Antibody repertoire development in swine.
Developmental and comparative immunology 30, 199-221.

Butler, J.E., Zhao, Y., Sinkora, M., Wertz, N., Kacs Kovics, I. (2009):
Immunoglobulins, antibody repertoire and B cell development.

Developmental and comparative immunology 33, 321-333.

Chabaudie, N., Le Jan, C., Olivier, M., Salmon, H. (1993):
Lymphocyte subsets in the mammary gland of sows.
Research in veterinary science 55, 351-355.

Charerntantanakul, W., Roth, J.A. (2007):
Biology of porcine T lymphocytes.
Animal health research reviews 7, 81-96.

Cherayil, B.J. (2003):
How not to get bugged by bugs: mechanisms of cellular tolerance to microorganisms.
Current opinion in gastroenterology 19, 572-577.

Christodoulou, V., Bampidis, V.A., Sossidou, E., Ambrosiadis, J., Hučko, B., Iliadis, C.,
Kodeš, A. (2006):
The use of extruded chickpeas in diets for growing-finishing pigs.
Czech journal of animal science 51, 334-342.

Conan, L., Carré, B. (1989):
Effect of autoclaving on metabolizable energy value of smooth pea seed (*Pisum sativum*) in
growing chicks.
Animal feed science and technology 26, 337-345.

Cruse, J.M., Lewis, R.E. (1995):
Illustrated Dictionary of Immunology.
CRC Press, Boca Raton 76 und 234.

Cummings, J.H., Macfarlane, G.T., Englyst, H.N. (2001):
Prebiotic digestion and fermentation.
The American journal of clinical nutrition (Suppl.) 73, 415-420.

DeBruin, T.G., Van Rooij, E.M., De Visser, Y.E., Bianchi, A.T. (2000):
Cytolytic function for pseudorabies virus-stimulated porcine CD4⁺ CD8^{dull} lymphocytes.
Viral immunology 13, 511-520.

Debruyn, A., Alvarez, A.P., Sandra, P., De Leenheer, L. (1992):
Isolation and identification of β -D-fructofuranosyl-(2,1)-D-fructose, a product of enzymatic
hydrolysis of the inulin from *Cichorium intybus*.
Carbohydrate research 235, 303-308.

Delzenne, N.M. (2003):
Oligosaccharides: state of the art.
The proceedings of the nutrition society 62, 177-182.

De Schrijver, R., De Vos, S. (2003):
Effects of dietary supplemented oligosaccharides on digestion in ileal cannulated pigs.

In: Ball, R.A. (editor). Proceedings of the 9th symposium on digestive physiology in pigs, vol.2. Banff, Canada: University of Alberta, 274-276.

DeWitt, R.C., Kudsk, K.A. (1999):

The gut's role in metabolism, mucosal barrier function, and gut immunology. Infectious disease clinics of north america 13, 465-481.

Djouzi, Z., Andrieux, C. (1997):

Compared effects of three oligosaccharides on metabolism of intestinal microflora in rats inoculated with a human faecal flora.

The British journal of nutrition 78, 313-324.

Dronov, A. (2005):

Funktionelle und molekularbiologische Parameter zum Nachweis immunmodulatorischer Wirkungen: Dargestellt an unterschiedlichen Zellpopulationen von Pferden mit und ohne Sommererkzem.

Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation.

Duncan, I.A., Binns, R.M., Duffus, W.P.H. (1989):

The null T cell in pig blood is not an NK cell.

Immunology 68, 392.

Ellegård, L., Andersson, H., Bosaeus, I. (1997):

Inulin and oligofructose do not influence the absorption of cholesterol, or the excretion of cholesterol, Ca, Mg, Zn, Fe, or bile acids but increases energy excretion in ileostomy subjects. European journal of clinical nutrition 51, 1-5.

Evans, P.A., Newby, T.J., Stokes, C.R., Bourne, F.J. (1982):

A study of cells in the mammary secretions of sows.

Veterinary immunology and immunopathology 3, 515-527.

Farnworth, E.R., Modler, H.W., Jones, J.D., Cave, N., Yamazaki, H., Rao, A.V. (1992):

Feeding Jerusalem artichoke flour rich in fructooligosaccharides to weanling pigs.

Canadian journal of animal science 72, 977-980.

Femia, A.P., Luceri, C., Dolara, P., Giannini, A., Biggeri, A., Salvadoir, M., Clune, Y., Collins, K.J., Paglierani, M., Caderni, G. (2002):

Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats.

Carcinogenesis 23, 1953-1960.

Filteau, S.M. (2001):

Milk components with immunomodulatory potential.

In: Woodward, B., Draper, H.H. (editors). Advances in nutritional research. Volume 10: Immunological properties of milk. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 327-344.

Flis, M., Lewicki, C., Tywoczuk, J., Bednarska, A. (1989):
Effect of various methods of preparing field bean seeds on protein quality, nutrient digestibility and nitrogen balance in growing pigs.
Acta academiae agriculturae ac technicae olstenensis, zootechnica 33, 213-225.

Franck, A. (2002):
Technological functionality of inulin and oligofructose.
The British journal of nutrition 87, 287-291.

Fraser, I.P., Koziel, H., Ezekowitz, R.A. (1998):
The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity.
Seminars in immunology 10, 363-372.

Fukushima, Y., Kawata, Y., Mizumachi, K., Kurisaki, J., Mitsuoka, T. (1999):
Effect of bifidobacteria feeding on fecal flora and production of immunoglobulins in lactating mouse.
International journal of food microbiology 46, 193-197.

Gaskins, H.R., Kelley, K.W. (1995):
Immunology and neonatal mortality.
In: Varley, M.A. (editor). *The neonatal pig: development and survival*. CAB International, UK, 39-55.

Gaskins, H.R. (1998):
Immunological development and mucosal defense in the pig intestine.
In: Wiseman, J., Varley, M.A., Chadwick, J.P. (editors). *Progress in pig science*. Nottingham University Press, UK, 81-101.

Gatel, F. (1994):
Protein quality of legume seeds for non-ruminant animals: a literature review.
Animal feed science and technology 45, 317-348.

Gerner, W., Kaser, T., Saalmüller, A. (2009):
Porcine T lymphocytes and NK cells - An update.
Developmental and comparative immunology 33, 310-320.

Gibson, G.R., Wang, X. (1994):
Enrichment of bifidobacteria from human gut contents by oligofructose using continuous culture.
FEMS Microbiology letters 118, 121-128.

Gibson, G.R., Beatty, E.B., Wang, X., Cummings, J.H. (1995):
Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin.
Gastroenterology 108, 975-982.

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

Dietary modulation of the human colonic microbiota - Introducing the concept of prebiotics.
The Journal of nutrition 125, 1401-1412.

Gibson, G.R., Probert, H.M., Van Loo, J., Rastall, R.A., Roberfroid, M.B. (2004):
Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics.
Nutrition research reviews 17, 259-275.

Girrbach, S., Schröder, B., Breves, G., Rechkemmer, G., Watzl, B. (2005):
Short and long-term supplementation of pre- and probiotics modulate T-cell mediated
immunity of the porcine GALT.
The FASEB Journal 19, A444-445.

Green, D.R., Webb, D.R. (1993):
Saying the 'S' word in public.
Immunology today 14, 523-525.

Griffiths, D.W. (1984):
The trypsin and chymotrypsin inhibitor activities of various pea (*Pisum* spp.) and field bean
(*Vicia faba*) cultivars.
Journal of the science of food and agriculture 35, 481-486.

Grimm, D.R., Richerson, J.T., Theiss, P.M., LeGrand, R.D., Misfeldt, M.L. (1993):
Isolation and characterization of gamma delta T lymphocyte cell lines from Sinclair swine
peripheral blood.
Veterinary immunology and immunopathology 38, 1-20.

Grosjean, F., Gatel, F. (1989):
Feeding value of *Pisum sativum* for pigs: influence of technology, influence of genotype
(trypsin inhibitor activity).
In: Huisman, J., van der Poel, A.F.B., Liener, I.E. (editors). Proceedings of the 1st
international workshop on antinutritional factors in legume seeds, Wageningen, Netherlands,
23-25 November 1988. PUDOC, Wageningen, 239-242.

Guillaume, J. (1978):
Digestibilité des protéines, de l'amidon et des lipides de deux types de fèves (*Vicia faba*
L.) crue ou autoclavée chez le poussin.
Archiv für Geflügelkrankheiten 42, 179-182.

Halloran, P.J., Sweeney, S.E., Strohmeier, C.M., Kim, Y.B. (1994):
Molecular cloning and identification of the porcine cytolytic trigger molecule G7 as a Fc
gamma RIII alpha (CD16) homologue.
Journal of immunology 153, 2631-2641.

Hammerberg, C., Schurig, G.G. (1986):
Characterization of monoclonal antibodies directed against swine leukocytes.
Veterinary immunology and immunopathology 11, 107-121.

- Haverson, K., Bailey, M., Stokes, C.R. (1999):
T-cell populations in the pig intestinal lamina propria: memory cells with unusual phenotypic characteristics.
Immunology 96, 66-73.
- He, G., Baidoo, S.K., Yang, Q., Golz, D., Tunland, B. (2002):
Evaluation of chicory inulin extracts as feed additive for early-weaned pigs.
Journal of animal science 80, Suppl. 1, 81.
- Hermiston, M.L., Zikherman, J., Zhu, J.W. (2009):
CD45, CD148, and Lyp/Pep: Critical Phosphatases Regulating Src Family Kinase Signaling Networks in Immune Cells.
Immunological reviews 228, 288-311.
- Herre, J., Gordon, S., Brown, G.D. (2004):
Dectin-1 and its role in the recognition of β -glucans by macrophages.
Molecular immunology 40, 869-876.
- Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokunaga, T., Tashiro, Y. (1986):
Effects of fructo-oligosaccharides on intestinal flora and human health.
Bifidobacteria microflora 5, 37-50.
- Hosono, A., Ozawa, A., Kato, R., Ohnishi, Y., Nakanishi, Y., Kimura, T., Nakamura, R. (2003):
Dietary fructooligosaccharides induce immunoregulation of intestinal IgA secretion by murine Peyer's Patch cells.
Bioscience, biotechnology, and biochemistry 67, 758-764.
- Houdijk, J.G., Bosch, M.W., Tamminga, S., Verstegen, M.W., Berenpas, E.B., Knoop, H. (1999):
Apparent ileal and total-tract nutrient digestion by pigs as affected by dietary nondigestible oligosaccharides.
Journal of animal science 77, 148-158.
- Houdijk, J.G., Hartemink, R., Verstegen, M.W., Bosch, M.W. (2002):
Effects of dietary non-digestible oligosaccharides on microbial characteristics of ileal chyme and faeces in weaner pigs.
Archives of animal nutrition 56, 297-307.
- Howard, M.D., Kerley, M.S., Gordon, L.W., Pace, L.W., Garleb, K.A. (1993):
Effects of dietary addition of fructooligosaccharide on colonic microflora populations and epithelial cell proliferation in neonatal pigs.
Journal of animal science 71, Suppl. 1, 71.
- Howard, M.D., Gordon, D.T., Garleb, K.A., Kerley, M.S. (1995):
Dietary fructooligosaccharide, xylooligosaccharide and gum arabic have variable effects on cecal and colonic microbiota and epithelia cell proliferation in mice and rats.

The Journal of nutrition 125, 2604-2609.

Huyghebaert, G., Fontaine, G., de Groote, G. (1979):
Détermination de la valeur alimentaire des pois (*Pisum sativum*) et de féveroles (*Vicia faba*)
au moyen d'essais de digestibilité avec des coqs adultes.
Reviews of agriculture 32, 759-777.

Iijima, H., Takahashi, I, Kiyono, H. (2001):
Mucosal immune network in the gut for the control of infectious diseases.
Reviews in medical virology 11, 117-133.

Ishizaka, S., Kikuchi, E., Tsujii, T. (1993):
Effects of acetate on human immune system.
Immunopharmacology and immunotoxicology 15, 151-162.

Ivan, M., Bowland, J.P. (1976):
Digestion of nutrients in the small intestine of pigs fed diets containing raw and autoclaved
faba beans.
Canadian journal of animal science 56, 451-456.

Janeway, C., Travers, P. (1997):
Immunology – The Immune System in Health and Disease.
Garland Publishing Inc., New York, USA.

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2002):
Immunologie.
Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.

Jensen, P.T., Pedersen, K.B. (1979):
Studies on immunoglobulins and trypsin inhibitor in colostrum and milk from sows and in
serum of their piglets.
Acta veterinaria scandinavica 20, 60-72.

Jeroch, H., Drochner, W., Simon, O. (2008):
Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere.
Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.

Jungi, T. W. (2000):
Klinische Veterinärimmunologie.
Enke Verlag, Stuttgart.

Kagnoff, M.F. (1987):
Immunology of the digestive system.
In: Johnson, L.R. (editor). Physiology of the Gastrointestinal Tract. Raven Press, New York,
1699-1728.

Kagnoff, M.F. (1993):

Immunology of the intestinal tract.
Gastroenterology 105, 1275-1280.

Kamphues, J., Coenen, M., Iben, C., Kienzle, E., Pallauf, J., Simon, O., Wanner, M., Zentek, J. (2009):
Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung.
Verlag M. & H. Schaper GmbH, Hannover.

Käser, T., Gerner, W., Hammer, S.E., Patzl, M., Saalmüller, A. (2008):
Phenotypic and functional characterization of porcine CD4+CD25^{high} regulatory T cells.
Veterinary immunology and immunopathology 122, 153-158.

Kaur, N., Gupta, A.K. (2002):
Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition.
Journal of biosciences 27, 703-714.

Kelly-Quagliana, K.A., Nelson, P.D., Buddington, R.K. (2003):
Dietary oligofructose and inulin modulate immune function in mice.
Nutrition research 23, 257-267.

Kerr, M.A. (1990):
The structure and function of human IgA.
Biochemical journal 271, 285-296.

King, M.R., Kelly, D., Morel, P.C.H., Pluske, J.R. (2003):
Aspects of intestinal immunity in the pig around weaning.
In: Pluske, J.R., Le Dividich, J., Verstegen, M.W.A. (editors). Weaning the pig. Concepts and consequences. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands, 219-257.

Kleesen, B., Noack, J., Zunft, H.J. (1994):
Effect of inulin on colonic bifidobacteria of elderly man.
The FASEB journal 8, A185 (abs.).

Klein Gebbink, G.A.R., Sutton, A.L., Williams, B.A., Patterson, J.A., Richert, B.T., Kelly, D.T., Verstegen, M.W.A. (2001):
Effects of oligosaccharides in weanling pig diets on performance, microflora and intestinal health.
In: Lindberg, J.E., Ogle, B. (editors). Proceedings of the 8th symposium of digestive physiology of pigs. CABI publishing, Uppsala, Sweden, 269-271.

Klobasa, F., Habe, F., Werhahn, E., Butler, J.E. (1985):
Changes in the concentration of serum IgG, IgA and IgM of sows throughout the reproductive cycle.
Veterinary immunology and immunopathology 10, 341-353.

Kolida, S., Tuohy, K., Gibson, G.R. (2002):
Prebiotic effects of inulin and oligofructose.

The British journal of nutrition 87, Suppl. 2, 193-197.

König, H. E., Liebich, H.-G. (2005):
Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis.
Schattauer, Stuttgart.

Laissue, J.A., Gebbers, J.-O. (1992):
The intestinal barrier and the gut-associated lymphoid tissue.
Current studies in hematology and blood transfusions 59, 19-43.

Langkamp-Henken, B., Glezer, J.A., Kudsk, K.A. (1992):
Immunologic structure and function of the gastrointestinal tract.
Nutrition in clinical practice 7, 100-108.

Lee, C.S., McCauley, I., Hartmann, P.E. (1983):
Light and electron microscopy of cells in pig colostrum, milk and involution secretion.
Acta anatomica (Basel) 116, 126-135.

Leece, J.G. (1973):
Effect of dietary regimen on cessation of uptake of macromolecules by piglet intestinal
epithelium (closure) and transport to the blood.
The Journal of nutrition 103, 751-756.

Lehmann, J. (1996):
Kohlenhydrate - Chemie und Biologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 186 und 192.

Liener, I.E. (1983):
Removal by processing of naturally occurring toxicants and antinutrients.
In: Shemit, L.W. (editor). Chemistry and World Food Supplies: the New Frontiers. Pergamon,
New York, 453-463.

Lunney, J.K., Pescovitz, M.D. (1987):
Phenotypic and functional characterization of pig lymphocyte populations.
Veterinary immunology and immunopathology 17, 135-144.

Lunney, J.K. (1993):
Characterization of swine leukocyte differentiation antigens.
Immunology today 14, 147-148.

MacDonald, T.T. (2003):
The mucosal immune system.
Parasite immunology 25, 235-246.

Macfarlane, G.T., Cummings, J.H. (1999):
Probiotics and prebiotics: Can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health?
BMJ 318, 999-1003.

- Magnusson, U., Rodriguez-Martinez, H., Einarsson, S. (1991):
A simple, rapid method for differential cell counts in porcine mammary secretions.
The veterinary record 129, 485-490.
- Magnusson, U. (1999):
Longitudinal study of lymphocyte subsets and major histocompatibility complex-class II
expressing cells in mammary glands of sows.
American journal of veterinary research 60, 546-548.
- Manhart, N., Spittler, A., Bergmeister, H., Mittlböck, M., Roth, E. (2003):
Influence of fructooligosaccharides on Peyer's patch lymphocyte numbers in healthy and
endotoxemic mice.
Nutrition 19, 657-660.
- Marlier, L., Focant, M., Allart, B., Vanbelle, M. (1989):
Effets du floconnage et de l'extrusion sur la valeur alimentaire du pois protéagineux pour le
porc charcutier.
Annual zootechnology 38, 237-245.
- Marquardt, R.R., Campbell, L.D., Stothers, S.C., McKirdy, J.A. (1974):
Growth responses of chicks and rats fed diets containing four cultivars of raw or autoclaved
faba beans.
Canadian journal of animal science 54, 177-182.
- Martín de la Fuente, A.J., Gutiérrez-Martín, C.B., Rodríguez-Barbosa, J.I., Martínez-
Martínez, S., Frandoloso, R., Tejerina, F., Rodríguez-Ferri, E.F. (2009):
Blood cellular immune response in pigs immunized and challenged with *Haemophilus*
parasuis.
Research in veterinary science 86, 230-234.
- Martins, C.L., Lawman, M.J., Scholl, T., Mebus, C.A., Lunney, J.K. (1993):
African swine fever virus specific porcine cytotoxic T cell activity.
Archives of virology 129, 211-225.
- McGuirk, P., Mills, K.H.G. (2002):
Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to
infectious diseases.
Trends in immunology 23, 450-455.
- McNab, J.M., Wilson, B.J. (1974):
Effects of micronizing on the utilization of field beans (*Vicia faba* L.) by the young chick.
Journal of the science of food and agriculture 25, 395-400.
- Menne, E., Guggenbühl, M., Absolonne, J., DuPont, A. (1997):
Prebiotic effect of the (fructosyl-fructose) F_m-type inulin hydrolysate in humans.
Book of abstracts, NDO Symposium, December 4-5, Wageningen, The Netherlands, 164.

- Mitsuoka, T., Hata, Y., Takahashi, Y. (1986):
Effects of long-term intake of Neosugar on intestinal flora and serum lipids.
Proceedings of the 3rd neosugar research conference, Tokyo, Japan, Topic 1-4.
- Mitsuoka, T., Hidaka, H., Eida, T. (1987):
Effect of fructo-oligosaccharides on intestinal microflora.
Nahrung 31, 426-436.
- Murata, H., Namioka, S. (1977):
The duration of colostral immunoglobulin uptake by the epithelium of the small intestine of neonatal piglets.
Journal of comparative pathology 87, 431-439.
- Murosaki, S., Muroyama, K., Yamamoto, Y., Kusaka, H., Liu, T., Yoshika, Y. (1999):
Immunopotentiating activity of nigerooligosaccharides for the T helper 1-like immune response in mice.
Bioscience, biotechnology, and biochemistry 63, 373-378.
- Myer, R.O., Froseth, J.A., Coon, C.N. (1982):
Protein utilization and toxic effects of raw beans (*Phaseolus vulgaris*) for young pigs.
Journal of animal science 55, 1087-1098.
- Myer, R.O., Froseth, J.A. (1983):
Heat-processed small red beans (*Phaseolus vulgaris*) in diets for young pigs.
Journal of animal science 56, 1088-1096.
- Myer, R.O., Froseth, J.A. (1989):
Extruded mixtures of beans (*Phaseolus vulgaris*) and soybeans as protein sources in swine and chick diets.
In: Huisman, J., van der Poel, A.F.B., Liener, I.E. (editors). Proceedings of the 1st international workshop on antinutritional factors in legume seeds, Wageningen, Netherlands, 23-25 November 1988. PUDOC, Wageningen, 254-258.
- Naumann, C., Bassler, C. (2004):
Die chemische Untersuchung von Futtermitteln 3. Aufl., 5. Ergänzungslieferung 2004.
VDLUFA-Verlag, Darmstadt.
- Nerbas, E. (2008):
Aktualisierung von Blutparametern beim Schwein.
Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation.
- Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E. (1996):
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band III: Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane.
Parey Buchverlag im Blackwell Wissenschaftsverlag GmbH, Berlin.
- Nilsson, U., Bjorck, I. (1988):
Availability of cereal fructans and inulin in the rat intestinal tract.

The Journal of nutrition 118, 1482-1486.

Niness, K.R. (1999):

Inulin and oligofructose: what are they?
The Journal of nutrition 129, 1402-1406.

Osman, N., Adawi, D., Molin, G., Ahrne, S., Berggren, A., Jeppsson, B. (2006):

Bifidobacterium infantis strains with and without a combination of oligofructose and inulin attenuate inflammation in DSS-induced colitis in rats.
BMC gastroenterology 6, 31.

Owusu-Asiedu, A. (2002):

Effect of heat processing on nutrient digestibility in pea and supplementing amylase and xylanase to raw, extruded or micronized pea-based diets on performance of early-weaned pigs.
Canadian journal of animal science 82, 367-374.

Pabst, R. (1987):

The anatomical basis for the immune function of the gut.
Anatomy and embryology (Berl) 176, 135-144.

Pabst, R., Rothkötter, H.J. (1999):

Postnatal development of lymphocyte subsets in different compartments of the small intestine of piglets.
Veterinary immunology and immunopathology 72, 167-173.

Pauly, T., Weiland, E., Hirt, W., Dreyer-Bux, C., Maurer, S., Summerfield, A., Saalmüller, A. (1996):

Differentiation between MHC-restricted and non-MHC-restricted porcine cytolytic T lymphocytes.
Immunology 88, 238-246.

Pescovitz, M.D., Lunney, J.K., Sachs, D.H. (1985):

Murine anti-swine T4 and T8 monoclonal antibodies: distribution and effects on proliferative and cytotoxic T cells.
Journal of immunology 134, 37-44.

Pescovitz, M.D., Sakopoulos, A.G., Gaddy, J.A., Husmann, R.J., Zuckermann, F.A. (1994):

Porcine peripheral blood CD4+/CD8+ dual expressing T-cells.
Veterinary immunology and immunopathology 43, 53-62.

Pescovitz, M.D., Book, B.K., Aasted, B., Dominguez, J., Bullido, R., Trebichavsky, I., Novikov, B., Valpotic, I., Tomaskovic, M., Nielsen, J., Arn, S., Sachs, D.H., Lunney, J.K., Boyd, P.C., Walker, J., Lee, R., Saalmüller, A. (1998):

Analyses of monoclonal antibodies reacting with porcine CD5: results from the Second International Swine CD Workshop.
Veterinary immunology and immunopathology 60, 269-273.

Piriou-Guzylack, L., Salmon, H. (2008):

Membrane markers of the immune cells in swine: an update.
Veterinary research 39, 54.

Porter, P. (1986):

Immune system.

In: Leman, A.D. (editor). *Diseases of Swine*, 6th edition, Iowa State University Press, USA, 44-57.

Pratt, V.C., Tappenden, K.A., McBurney, M.I., Field, C.J. (1996):

Short-chain fatty acid-supplemented total parenteral nutrition improves nonspecific immunity after intestinal resection in rats.

Journal of parenteral and enteral nutrition 20, 264-271.

Qiao, H., Duffy, L.C., Griffiths, E., Dryja, D., Leavens, A., Rossman, J., Rich, G., Riepenhoff-Talty, M., Locniskar, M. (2002):

Immune responses in rhesus rotavirus-challenged Balb/c mice treated with bifidobacteria and prebiotic supplements.

Pediatric research 51, 750-755.

Riedel-Caspari, G. (2001):

The antimicrobial and immunomodulating actions of milk leukocytes.

In: Woodward, B., Draper, H.H. (editors). *Advances in nutritional research. Volume 10: Immunological properties of milk*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 287-307.

Roberfroid, M.B., Bornet, F., Bouley, C., Cummings, J.H. (1995):

Colonic microflora: nutrition and health.

Nutrition reviews 53, 127-130.

Roberfroid, M.B. (1997):

Health benefits of non-digestible oligosaccharides.

Advances in experimental medicine and biology 427, 211-219.

Roberfroid, M.B., Van Loo, J., Gibson, G.R. (1998):

The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products.

The Journal of nutrition 128, 11-19.

Roberfroid, M. B. (2005):

Introducing inulin-type fructans.

The British journal of nutrition 93, 13-25.

Roitt, I., Borstoff, J., Male, D. (1995):

Kurzes Lehrbuch der Immunologie.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland.

Roller, M., Femia, A.P., Caderni, G., Rechkemmer, G., Watzl, B. (2004a):

Intestinal immunity of rats with azoxymethane-induced colon cancer is modulated by inulin enriched with oligofructose combined with *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*.

The British journal of nutrition 92, 931-938.

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

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

The Journal of nutrition 134, 153-156.

Ross, G.D., Větvička, V. (1993):

CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions.

Clinical and experimental immunology 92, 181-184.

Rossi, F., Cox, E., Goddeeris, B., Portetelle, D., Wavreille, J., Théwis, A. (2001):

Inulin incorporation in the weaned pig diet: intestinal coliform interaction and effect on specific systemic immunity.

In: Lindberg, J.E., Ogle, B. (editors). Proceedings of the 8th symposium of digestive physiology of pigs. CABI publishing, Uppsala, Sweden, 299-301.

Roth, J.A., Thacker, E.L. (2006):

Immune system.

In: Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (editors). Diseases of Swine. Ames, IA: Iowa State University Press, 15-36.

Rothkötter, H.J., Möllhoff, S., Pabst, R. (1999):

The influence of age and breeding conditions on the number and proliferation of intraepithelial lymphocytes in pigs.

Scandinavian journal of immunology 50, 31-38.

Roux, M.E., McWilliams, M., Phillips-Quagliata, J.M., Weisz-Carrington, P., Lamm, M.E. (1977):

Origin of IgA-secreting plasma cells in the mammary gland.

The Journal of experimental medicine 146, 1311-1322.

Ruscetti, F.W., D.A. Morgan and R.C. Gallo (1977):

Functional and morphologic characterization of human T cells continuously grown in vitro.

Journal of immunology 119, 131-138.

Saalmüller, A., Reddehase, M.J., Buhning, H.J., Jonjic, S., Koszinowski, U.H. (1987):

Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocytes.

European Journal of Immunology 17, 1297-1301.

Saalmüller, A. Hirt, W., Reddehase, M.J. (1989):

Phenotypic discrimination between thymic and extrathymic CD4-CD8- and CD4+CD8+ porcine T lymphocytes.
European journal of immunology 19, 2011-2016.

Saalmüller, A., Weiland, F., Reddehase, M.J. (1991):
Resting porcine T lymphocytes expressing class II major histocompatibility antigen.
Immunobiology 183, 102-114.

Saalmüller, A., Bryant, J. (1994):
Characteristics of porcine T lymphocytes and T-cell lines.
Veterinary immunology and immunopathology 43, 45-52.

Saalmüller, A., Hirt, W., Maurer, S., Weiland, E. (1994):
Discrimination between two subsets of porcine CD8+ cytolytic T lymphocytes by the expression of CD5 antigen.
Immunology 81, 578-583.

Saalmüller, A. (1996):
Characterization of swine leukocyte differentiation antigens.
Immunology today 17, 352.

Saalmüller, A., Werner, T., Fachinger, V. (2002):
T-helper cells from naive to committed.
Veterinary immunology and immunopathology 87, 137-145.

Saalmüller, A. (2006):
New understanding of immunological mechanisms.
Veterinary microbiology 117, 32-38.

Salmon, H. (1984):
Immunity in the fetus and the newborn infant: a swine model.
Reproduction, nutrition, développement 24, 197-206.

Salmon, H. (1987):
The intestinal and mammary immune system in pigs.
Veterinary immunology and immunopathology 17, 367-388.

Salmon, H. (1999):
The mammary gland and neonate mucosal immunity.
Veterinary immunology and immunopathology 72, 143-155.

Salmon, H., Berri, M., Gerds, V., Meurens, F. (2009):
Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine.
Developmental and comparative immunology 33, 384-393.

Sampaio, S.O., Li, X., Takeuchi, M., Mei, C., Francke, U., Butcher, E.C., Briskin, M.J. (1995):

Organization, regulatory sequences, and alternatively spliced transcripts of the mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) gene.
Journal of immunology 155, 2477-2486.

Sanno, T. (1986):

Effects of Neosugar on constipation, intestinal microflora and gallbladder contraction in diabetics.

Proceedings of the 3rd neosugar research conference, Tokyo, Japan.

Schneeman, B.O. (1999):

Fiber, inulin and oligofructose: similarities and differences.

The Journal of nutrition 129, 1424-1427.

Schollenberger, A., Degorski, A., Frymus, T., Schollenberger, A. (1986a):

Cells of sow mammary secretions. I. Morphology and differential counts during lactation.

Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe A 33, 31-38.

Schollenberger, A., Frymus, T., Degorski, A., Schollenberger, A. (1986b):

Cells of sow mammary secretions. II. Characterization of lymphocyte populations.

Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe A 33, 39-46.

Shelton, J.L., Hemann, M.D., Strobe, R.M., Brashear, G.L., Ellis, M., McKeith, F.K., Bidner, T.D., Southern, L.L. (2001):

Effect of different protein sources on growth and carcass traits in growing-finishing pigs.

Journal of animal science 79, 2428-2435.

Shimoyama, T., Hori, N., Kawaura, A., Shiomi, H., Shoya, T., Hirakawa, H., Yamazaki, K. (1984):

Relationship between Neosugar P and chronic constipation.

Proceedings of the 2nd neosugar research conference, Tokyo, Japan, Topic 3-2.

Sinkora, M., Sinkora, J., Rehakova, Z., Butler, J.E. (2000):

Early ontogeny of thymocytes in pigs: sequential colonization of the thymus by T cell progenitors.

Journal of immunology 165, 1832-1839.

Sleasman, J.W., Henderson, M., Barrett, D.J. (1991):

Con A-induced suppressor cell function depends on the activation of the CD4+CD45RA inducer T cell subpopulation.

Cellular immunology 1333, 67-78.

Sterzl, J., Silverstein, A.M. (1967):

Developmental aspects of immunity.

Advances in immunology 6, 337-459.

Stirling, C.M.A., Charleston, B., Takamatsu, H., Claypool, S., Lencer, W., Blumberg, R.S., Wileman, T.E. (2005):

Characterization of the porcine neonatal Fc receptor – potential use for trans-epithelial protein delivery.

Immunology 114, 542-553.

Stokes, C.R., Vega-López, M.A., Bailey, M., Telemo, E., Miller, B.G. (1992):

Immune development in the gastrointestinal tract of the pig.

In: Varley, M.A., Williams, P.E.V., Lawrence, T.L.J. (editors). Neonatal Survival and Growth. British Society of Animal Production, Occasional Publication 15, 9-12.

Summerfield, A., Rziha, H.J., Saalmüller, A. (1996):

Functional characterization of porcine CD4+CD8+ extrathymic T lymphocytes.

Cellular immunology 168, 291-296.

Takahashi, Y. (1986):

Effects of Neosugar in the chronic renal failure patient.

Proceedings of the 3rd neosugar research conference, Toyko, Japan, Topic 1-3.

Takahashi, T., Nakagava, E. Nara, T., Yajima, T., Kuwata, T. (1998):

Effects of orally ingested *Bifidobacterium longum* on the mucosal IgA response of mice to dietary antigens.

Bioscience, biotechnology, and biochemistry 62, 10-15.

Takamatsu, H.H., Denyer, M.S., Wileman, T.E. (2002):

A subpopulation of circulating porcine gammadelta T cells can act as professional antigen presenting cells.

Veterinary immunology and immunopathology 87, 223-224.

Takimoto, H., Nakamura, T., Takeuchi, M., Sumi, Y., Tanaka, T., Nomoto, K., Yoshikai, Y. (1992):

Age-associated increase in number of CD4+CD8+ intestinal intraepithelial lymphocytes in rats.

European journal of immunology 22, 159-164.

Tizard, I.R. (2009):

Veterinary immunology. An introduction.

Saunders Elsevier, Missouri.

Van der Poel, A.F.B. (1990):

Effect of processing on antinutritional factors and protein nutritional value of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). A review.

Animal feed science and technology 29, 179-208.

Vanhoof, K., De Schrijver, R. (1996):

Availability of minerals in rats and pigs fed non-purified diets containing inulin.

Nutrition research 16, 1017-1022.

Van Loo, J., Cummings, J., Delzenne, N., Englyst, H., Franck, A., Hopkins, M., Kok, N., Macfarlane, G., Newton, D., Quigley, M., Roberfroid, M., van Vliet, T., van den Heuvel, E. (1999):

Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095).

The British journal of nutrition 81, 121-132.

Van Zuilichem, D.J., van der Poel, A.F.B. (1989):

Effect of HTST treatment of *Pisum sativum* on the inactivation of antinutritional factors.

In: Huisman, J., van der Poel, A.F.B., Liener, I.E. (editors). Proceedings of the 1st international workshop on antinutritional factors in legume seeds, Wageningen, Netherlands, 23-25 November 1988. PUDOC, Wageningen, 263-267.

Von Böhmer, H., Melchers, F. (2010):

Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease.

Nature immunology 11, 14-20.

Watzl, B., Girrbach, S., Roller, M. (2005):

Inulin, oligofructose and immunomodulation.

The British journal of nutrition 93, Suppl. 1, 49-55.

Weström, B.R., Svendsen, J., Ohlsson, B.G., Tagesson, C., Karlsson, B.W. (1984):

Intestinal transmission of macromolecules (BSA and FITC-labelled dextrans) in the neonatal pig: influence of age of piglet and molecular weight of markers.

Biology of the neonate 46, 20-26.

Wetscherek, W., Zollitsch, W., Lettner, F. (1995):

Einsatz von getoasteten und extrudierten Ackerbohnen in der Schweinemast.

Bodenkultur 46, 331-335.

Wing, K., Sakaguchi, S. (2010):

Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity.

Nature immunology 11, 7-13.

Yang, H., Parkhouse, R.M. (1996):

Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues.

Immunology 89, 76-83.

Yang, H., Parkhouse, R.M. (1997):

Differential expression of CD8 epitopes amongst porcine CD8-positive functional lymphocyte subsets.

Immunology 92, 45-52.

Yasuda, K., Maiorano, R., Welch, R.M., Miller, D.D., Gen Lei, X. (2007):

Cecum is the major degradation site of ingested inulin in young pigs.

The Journal of nutrition 137, 2399-2404.

Youinou, P., Durand, V., Renaudineau, Y., Pennec, Y.-L., Saraux, A., Jamin, C. (2002):
Pathogenetic effects of anti-Fc gamma receptor IIIb (CD16) on polymorphonuclear
neutrophils in non-organ-specific autoimmune diseases.
Autoimmunity reviews 1, 13-19.

Zuckermann, F.A., Zsak, L., Mettenleiter, T.C., Ben-Porat, T. (1990):
Pseudorabies virus glycoprotein gIII is a major target antigen for murine and swine virus-
specific cytotoxic T lymphocytes.
Journal of virology 64, 802-812.

Zuckermann, F.A., Gaskins, H.R. (1996):
Distribution of porcine CD4/CD8 double-positive T lymphocytes in mucosa associated
lymphoid tissues.
Immunology 87, 493-499.

Zuckermann, F.A., Husmann, R.J. (1996):
Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T
cells.
Immunology 87, 500-512.

Zuckermann, F.A., Peavey, C., Schnitzlein, W.M., Schabacker, D., Husmann, R.J., Yang, H.,
Saalmüller, A., Lunney, J.K. (1998):
Definition of the specificity of monoclonal antibodies against porcine CD45 and CD45R:
report from the CD45/CD45R and CD44 subgroup of the Second International Swine CD
Workshop.
Veterinary immunology and immunopathology 60, 367-387.

9. Anhang

Tabelle 54: Für die Futtermitteluntersuchungen eingesetzten Geräte und Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
I Geräte	
Analysewaage: Typ Genius	Genius Sartorius AG Göttingen, Deutschland
Atomabsorptionsspektrometer vario 6	Analytik Jena GmbH Jena, Deutschland
Exsikkator: Typ Novus NS 24 / 29	Schott/Duran Mainz, Deutschland
Heraeus® Trockenschrank T5042	Heraeus electronic Hanau, Deutschland
Makro-Elementaranalysator: vario max CN	Elementar Analysesystem GmbH Hanau, Deutschland
Muffelofen: Heraeus®Thermicon®P	Thermo Scientific Karlsruhe, Deutschland
Photometer: Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech Freiburg, Deutschland
Rohfaser-Analysator: Ankom ²⁰⁰⁰ Fibre Analyser	Ankom Technology Macedon, USA
II Chemikalien	
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat	Carl Roth GmbH&Co.KG Karlsruhe, Deutschland
Ammoniummonovanadat	Merck, KGaA Darmstadt, Deutschland
Natronlauge	Carl Roth GmbH&Co.KG Karlsruhe, Deutschland
Petroleumbenzin, reinst.	Merck, KGaA Darmstadt, Deutschland
Salpetersäure (65 %)	Merck, KGaA Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (37-38 %)	J.T.Baker Griesheim, Deutschland
Schwefelsäure (95-97 %)	J.T.Baker Griesheim, Deutschland

Tabelle 55: Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen eingesetzten Geräte, Materialien und Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
I Geräte, Materialien	
Brutschrank	Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland
CellQuest pro®	Becton Dickinson Bioscience, San José, USA
Cellstar® 96-Well-Microplates	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
CO2-Inkubator:biocenter BC170	SalvisLab, Rotkreuz, Schweiz
FACS Calibur®	Becton Dickinson Bioscience, San José, USA
FACS-Röhrchen	Falcon (Becton Dickinson), Franklin Lake, USA
Gaze (NITEX-03-200/47)	Sefar GmbH, Wasserburg, Deutschland
Greiner Röhrchen 15 und 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Heraeus®Megafuge®1.0R	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Modifizierte Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Schüttelinkubator	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
II Chemikalien	
Bromdeoxyuridin	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Concanavalin A (Con A)	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland
DNase	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland
DNase-Puffer	Siehe unten
Ethanol (96 %)	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
FACS-Puffer	Siehe unten
FACS Perm2	Becton Dickinson Bioscience, San José, USA
Histopaque®-1077	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Ficoll	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Fixierlösung	Siehe unten
HBSS-DTT-Medium	Siehe unten
HBSS-EDTA-Medium	Siehe unten
Lysispuffer	Siehe unten
PBS	Siehe unten
Percoll (25 %)	Siehe unten
Phythämagglutinin M (PHA-M)	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Pokeweed Mitogen (PWM)	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland
RPMI 1640 Medium (für die Aufbereitung der intraepithelialen Leukozyten mit 2% Penicillin/Streptomycin ergänzt)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Trypanblau, 0,5 %	Biochrom AG Berlin, Deutschland

Tabelle 56: Für die ELISA-Untersuchungen eingesetzten Geräte, Materialien und Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
I Geräte, Materialien	
Eppendorf Gefäße Cellstar® 96-Well-Microplates	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland
ELISA-Plattenleser	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
II Chemikalien	
Dextransulfat (10 %ig)	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kalziumchlorid (1 molar)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
ELISA-Verdünnungslösung 50 mM Tris buffered saline	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland
1 % BSA	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
0,05 % Tween 20	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
ELISA-Waschlösung (pH 8,0) 50 mM Tris buffered saline	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland
0,05 % Tween 20	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
ELISA-Blockierungslösung (pH 8,0) 50 mM Tris buffered saline	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland
1 % BSA	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
ELISA-Stopplösung 0,18 M H ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Puffer für den Beschichtungsantikörper (pH 9,6) 0,05 M Carbonat-Bicarbonat	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland
TMB-Substratlösung	Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, USA
Beschichtungsantikörper „Affinity purified Pig IgA Coating Antibody“ „Affinity purified Pig IgG Coating Antibody“ „Affinity purified Pig IgM Coating Antibody“	Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, USA
Referenzserum „Pig Reference Serum“ (0,65 mg/ml IgA) (16,5 mg/ml IgG) (4,7 mg/ml IgM)	Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, USA
Nachweisantikörper „HRP Conjugated Pig IgA Detection Antibody“	Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, USA

Tabelle 57: Im Rahmen der ELISA-Untersuchungen eingesetzten Verdünnungen der Antikörper und Proben.

Antikörper, Serumproben, Milchproben	Verdünnung
Beschichtungsantikörper	Mit Carbonat-Bicarbonat-Puffer
„Affinity purified Pig IgA Coating Antibody“	1:100
„Affinity purified Pig IgG Coating Antibody“	1:100
„Affinity purified Pig IgM Coating Antibody“	1:100
Nachweisantikörper	Mit ELISA-Verdünnungslösung
„HRP Conjugated Pig IgA Detection Antibody“	
Serumproben	Mit ELISA-Verdünnungslösung
zur Bestimmung von IgA	1:10000
zur Bestimmung von IgG	1:200000
zur Bestimmung von IgM	1:20000
Milchproben	Mit ELISA-Verdünnungslösung
zur Bestimmung von IgA	1:40000
zur Bestimmung von IgG	1:500000 (Tag 1 p.p.)
	1:40000 (Tag 5 p.p.)
	1:10000 (Tag 14 p.p.)
zur Bestimmung von IgM	1:40000

Tabelle 58: Verdünnung der Standardansätze zur Bestimmung von IgA im Serum der Schweine.

Standard	IgA-Konzentration (ng/ml)	Menge des Referenzserums	Menge der ELISA- Verdünnungslösung
1	1000	5 mcl	3,25 ml
2	500	500 mcl von Standard 1	500 mcl
3	250	500 mcl von Standard 2	500 mcl
4	125	500 mcl von Standard 3	500 mcl
5	62,5	500 mcl von Standard 4	500 mcl
6	31,25	500 mcl von Standard 5	500 mcl
7	15,6	500 mcl von Standard 6	500 mcl
8 (Kontrolle)	0	0	500 mcl

Tabelle 59: Verdünnung der Standardansätze zur Bestimmung von IgG im Serum der Schweine.

Standard	IgG-Konzentration (ng/ml)	Menge des Referenzserums	Menge der ELISA- Verdünnungslösung
„Start“	10000	5 mcl	8,25 ml
1	500	100 mcl von Standard „Start“	1,9 ml
2	250	500 mcl von Standard 1	500 mcl
3	125	500 mcl von Standard 2	500 mcl
4	62,5	500 mcl von Standard 3	500 mcl
5	31,25	500 mcl von Standard 4	500 mcl
6	15,6	500 mcl von Standard 5	500 mcl
7	7,8	500 mcl von Standard 6	500 mcl
8 (Kontrolle)	0	0	500 mcl

Tabelle 60: Verdünnung der Standardansätze zur Bestimmung von IgM im Serum der Schweine.

Standard	IgM-Konzentration (ng/ml)	Menge des Referenzserums	Menge der ELISA- Verdünnungslösung
1	1000	5 mcl	23,5 ml
2	500	500 mcl von Standard 1	500 mcl
3	250	500 mcl von Standard 2	500 mcl
4	125	500 mcl von Standard 3	500 mcl
5	62,5	500 mcl von Standard 4	500 mcl
6	31,25	500 mcl von Standard 5	500 mcl
7	15,6	500 mcl von Standard 6	500 mcl
8 (Kontrolle)	0	0	500 mcl

Lösungen für die durchflusszytometrischen Messungen

10 x PBS

NaCl	80 g
KCl	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	12,6 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

DNase-Puffer (0,15 M NaCl / 4,2 mM MgCl₂ / 10 µM HCl (500 ml))

NaCl (MW 58,44)	4,383 g
MgCl ₂ (MW 203,3)	0,427 g
HCl (1 M)	5 µl
Aqua bidest.	ad 500 ml

FACS-Puffer (0,5 % BSA / 0,1 % Natriumazid in PBS (1000 ml))

Bovines Serumalbumin (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland)	5 g
Aqua dest.	800 ml
10 x PBS	100 ml
Natriumazid (10 % ig) (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)	10 ml
Aqua bidest.	ad 1000 ml
Durch einen Faltenfilter filtrieren	

Fixierlösung (1 % Paraformaldehyd / 0,1 % Tween20 in PBS (50 ml))

Paraformaldehyd (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)	0,5 g
Aqua dest.	30 ml
Unter Erhitzen auf dem Magnetrührer lösen Nach dem Abkühlen:	
10 x PBS	5 ml
Tween 20 (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)	5 µl
Aqua dest.	ad 50 ml

HBSS-DTT-Medium

DTT (Dithioreitol; 2mM) (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland)	
Hepes (0,01 M) (Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland)	
In: HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), ohne Ca und Mg, pH 7,2 (Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland)	

HBSS-EDTA-Medium

EDTA (1mM)
(Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland)
Hepes (1 mM)
(Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland)
In: HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), ohne Ca und Mg, pH 7,2
(Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland)

Lysis-Puffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA)

NH ₄ Cl	8,3 g
KHCO ₃	1,0 g
EDTA	0,03 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Percoll (25%)

Percoll (100%)	900 ml
(GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden)	
10 x HBSS (ohne NaHCO ₃)	100 ml
NaHCO ₃	0,35 g
Das so hergestellte Percoll (90%) mit 1 x HBSS auf 25% verdünnen	

Zellkulturmedium

VLE RPMI 1640	500 ml
(Biochrom AG, Berlin, Deutschland)	
Fötale Kälberserum (FCS)	50 ml
(Biochrom AG, Berlin, Deutschland)	
Penicillin/Streptomycin	5 ml
(PAA Laboratories GmbH Pasching, Österreich)	
L-Glutamin	5 ml
(PAA Laboratories GmbH Pasching, Österreich)	
Hepes (2 mM)	5 ml
(Biochrom AG, Berlin, Deutschland)	

Publikationsverzeichnis

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits bei Tagungen als Vortrag oder Poster vorgestellt.

Vorträge

Passlack, N., Kröger, S., Tedin, L., Zentek, J. (2009):
Characterisation of immune parameters in the blood and intestine of weaned piglets fed a combination of inulin and heat-processed faba beans (*Vicia faba* L.).
13th Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition, Sardinia/Italy, 15.10. - 17.10.2009. Congress Proceedings, 91.

Passlack, N., Kröger, S., Tedin, L., Zentek, J. (2009):
Lymphocyte surface markers in the blood and intestine of 10-days-old piglets.
13th Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition, Sardinia/Italy, 15.10. - 17.10.2009. Congress Proceedings, 90.

Passlack, N., Kröger, S., Tedin, L., Zentek, J. (2009):
Characterization of leukocytes in sow milk at different time points after parturition.
13th Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition, Sardinia/Italy, 15.10. - 17.10.2009. Congress Proceedings, 64.

Passlack, N., Kröger, S., Tedin, L., Zentek, J. (2009):
Untersuchungen zur Leukozytenverteilung in der Sauenmilch zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Laktation.
4. Doktoranden-Symposium Berlin/Deutschland, 06.11.2009. Berichtsband, 37.

Poster

Passlack, N., Kröger, S., Tedin, L., Zentek, J. (2009):
Untersuchungen zur Leukozytenverteilung in der Sauenmilch zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Laktation.
Nutztierernährung morgen – gesunde Tiere, effiziente und nachhaltige Erzeugung - wertvolle Produkte, Zürich, Schweiz, 02.-04.09.2009. Schriftenreihe Institut für Nutztierwissenschaften Ernährung - Produkte – Umwelt ETH Zürich, Band 32, 276-277.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Jürgen Zentek, der die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht und mich stets unterstützt hat. Ich bedanke mich besonders für sein Vertrauen und für seine uneingeschränkte Bereitschaft, Fragen mit mir zu klären und zu diskutieren.

Ich danke Frau Corinna Schmidt, Frau Ines Bebert und Frau Sandra Fischer für die Betreuung der Tiere und insbesondere für die wirklich großartige Unterstützung bei den Probennahmen. Frau Petra Huck danke ich für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft im Labor. Ebenfalls möchte ich Frau Dr. Lydia Tedin und Frau Dr. Susan Kröger für die Hilfe an den Versuchstagen danken.

Herrn Professor Dr. Armin Saalmüller danke ich für die unkomplizierte und schnelle Bereitstellung einiger Antikörper. Ich bedanke mich bei Frau Sybille Patzelt und Herrn Dr. Gerhard Stalljohann für die freundliche Unterstützung bei der Umsetzung des Versuchsvorhabens.

Meinen Eltern, Großeltern und Freunden danke ich aufrichtig für ihre Unterstützung und ihr Verständnis. Ohne ihren Rückhalt wäre die Anfertigung dieser Arbeit in jeder Hinsicht schwieriger gewesen. Danke!

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 19.03.2010

Nadine Paßlack