

### **I III. Ergebnisse**

#### **III. 1 Durchflusszytometrische Charakterisierung von Leukozyten-subpopulationen und IFN- $\gamma$ produzierenden Zellen im Blut**

Mittels Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll wurde aus Zitratblut die lymphozytenreiche Fraktion gewonnen. Nach Erythrolyse und Entfernung der Thrombozyten wurden die Zellen entweder mit PMA stimuliert oder unverzüglich mit fluorchrom-konjugierten Antikörpern, die spezifisch an CD-Oberflächenmoleküle binden, inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. In die Analyse gingen nur Blutproben ein, die nach dem Inkubationsprotokoll eine, für die durchflusszytometrische Analyse, ausreichende Menge lebender Zellen aufwiesen. Daher variiert die Stichprobengröße der einzelnen Messungen.

Die Ergebnisse aus der durchflusszytometrischen Analyse werden von dem Durchflusszytometer-Analyseprogramm als „Dotplot“ und Histogramm grafisch dargestellt. Die Verteilung der Messwerte von Probiotikagruppe im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe wird anhand von Boxplot und Balkendiagrammen beschrieben. Als Lagemaße und Streuungsmaße wurden Median und Perzentile angegeben (siehe Statistik II.2.7).

Im Dotplot werden zwei Parameter gegeneinander aufgetragen (die Intensität von zwei Fluoreszenzsignalen, die jede Zelle emittiert) und bei jeder Schnittstelle der beiden Werte ein Punkt angezeigt (korrelierte Zweiparameterdarstellung). Werden Vorwärtstreulicht (Forward Scatter) und Seitwärtstreulicht (Sideward Scatter, siehe Kap. II.2.5) gegeneinander aufgetragen, stellen sich morphologisch ähnliche Zellen als zusammenhängende Wolken dar (Abbildung 13-1). Es ist darüber hinaus möglich, durch eine Vorauswahl bestimmte Populationen oder Teilbereiche von diesen zu definieren und nur Messwerte dieser Population zu erfassen. So kann eine Fluoreszenzanalyse auf Zellen beschränkt werden, die in Bezug auf Viabilität, Größe und Granularität in einem bestimmten Bereich liegen („Gating“). In einem Histogramm wird der Parameter Fluoreszenz auf der x-Achse dargestellt, die Häufigkeit (Anzahl der Zellen mit dem gleichen x-Wert) auf der y-Achse (Abbildung 13-4).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen nach ihren Streulichteigenschaften im Dotplot abgebildet (Abbildung 13-1) und Lymphozytenpopulationen dargestellt. In die weiteren Kalkulationen gingen nur lebende Zellen ein. Tote Zellen wurden nach ihrer Propidiumiodidaufnahme (PI) identifiziert (siehe II.2.5.1, Tab. 8: Absorptions- und Emissionsmaxima). PI dringt bei fortgeschrittenem Zelluntergang in die Zellen ein. Zellen, die PI aufgenommen haben, lassen sich im Dotplot aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaften

von lebenden Zellen unterscheiden und wurden von der Kalkulation ausgeschlossen (Abbildung 13-2).

Diese lebenden Lymphozyten wurden nun hinsichtlich der Expression ihrer Oberflächenmarker analysiert (Abbildungen 13-3 und 13-4).

Abbildung 13 veranschaulicht die Vorgehensweise und den Ablauf der Auswertung am Beispiel der Färbung mit Antikörpern gegen CD4 und CD8. Die Frequenzen der Subpopulationen sind in den Dotplots angegeben.

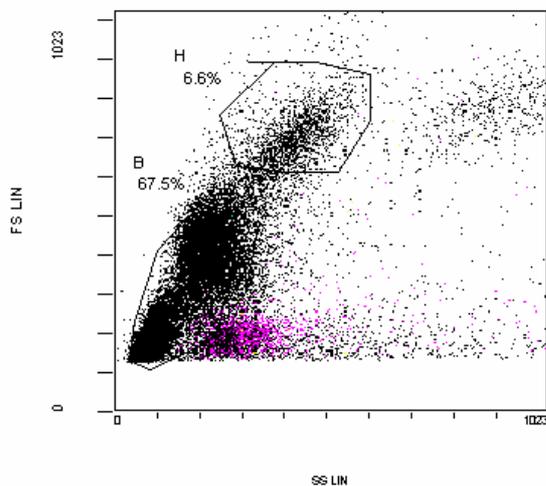


Abbildung 13-1: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf peripheren Blutmononukleären Zellen (PBMCs). Darstellung der Zellen nach ihren Streulichteigenschaften. (B) und (H) bezeichnen Analysefenster von Lymphozyten (**B**) und Monozyten (**H**); Y-Achse = Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC), X-Achse = Seitwärtsstreulicht (Sideward Scatter, SSC)

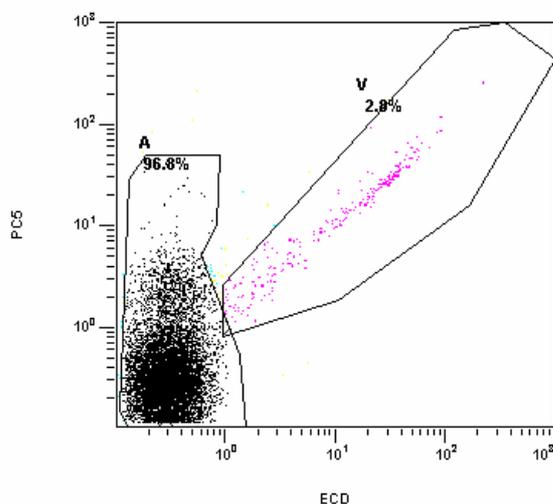


Abbildung 13-2: Gating der lebenden Zellen (**A**) nach Inkubation mit PC5-konjugierten CD3-Antikörpern und Propidiumiodidaufnahme in tote Zellen (**V**). In die weitere Analyse gingen nur Zellen aus dem Analysefenster A ein

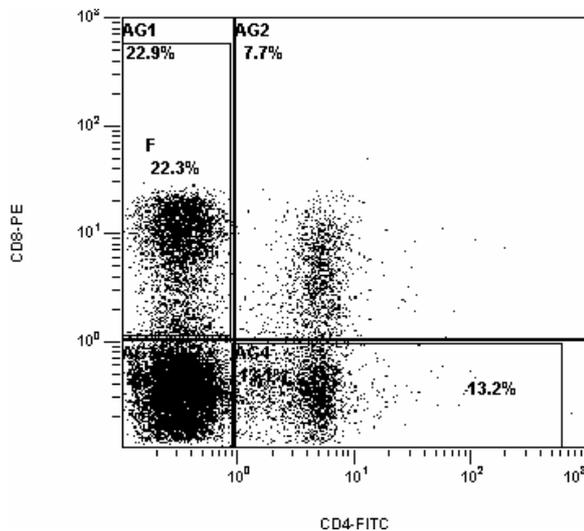


Abbildung 13-3: Dotplot-Darstellung der Koexpression von CD4 mit FITC-gekoppelten Antikörpern und CD8 mit PE-gekoppelten Antikörpern; Y-Achse = Intensität der PE-Fluoreszenz, X-Achse = Intensität der FITC-Fluoreszenz

In dieser durchflusszytometrischen Analyse waren 30,6% der PBMCs CD8<sup>+</sup> Zellen (Region AG1 und AG2) und 20,9% CD4<sup>+</sup> Zellen (Region AG2 und AG4). Doppelt positive CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Zellen sind in der Region AG2 mit einer Häufigkeit von 7,7% dargestellt. Region AG3 (links unten) zeigt Zellen, die weder CD4<sup>+</sup> noch CD8<sup>+</sup> exprimieren.

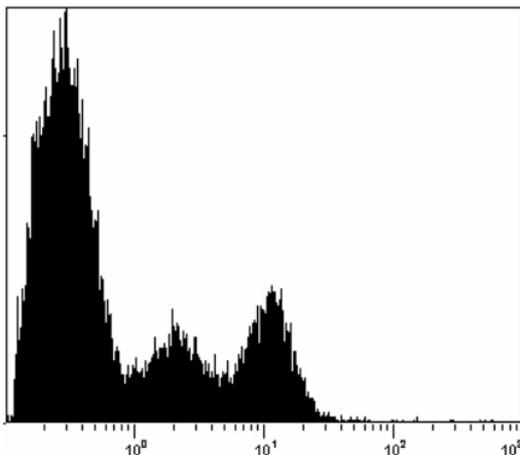


Abbildung 13-4: Histogramm-Darstellung der CD8 Expression mit PE-gekoppelten Antikörpern. X-Achse = Intensität der PE-Fluoreszenz, Y-Achse = Häufigkeit (Anzahl der Zellen mit dem gleichen x-Wert)

Aus dieser Darstellung ist zu ersehen, dass sich die CD8<sup>+</sup> Population in dieser Messung aus zwei Subpopulationen unterschiedlich intensiver PE-Fluoreszenzen zusammensetzt.

### III. 1. 1 Analyse der CD45<sup>+</sup> Zellen

Betrachtet man die Ergebnisse aller Messungen wurde das CD45-Antigen von mindestens 19,7% der Zellen exprimiert und maximal von 99,5% der Zellen (n=27). Im Boxplot in Abbildung 15 ist jedoch zu erkennen, dass der überwiegende Anteil aller Messwerte über dem Wert von 80% liegt. Wie man im Dotplot und im Histogramm sehen kann, tendiert die Population dazu zwei Gruppen unterschiedlicher Fluoreszenzintensität zu bilden (zweigipfliges Histogramm).

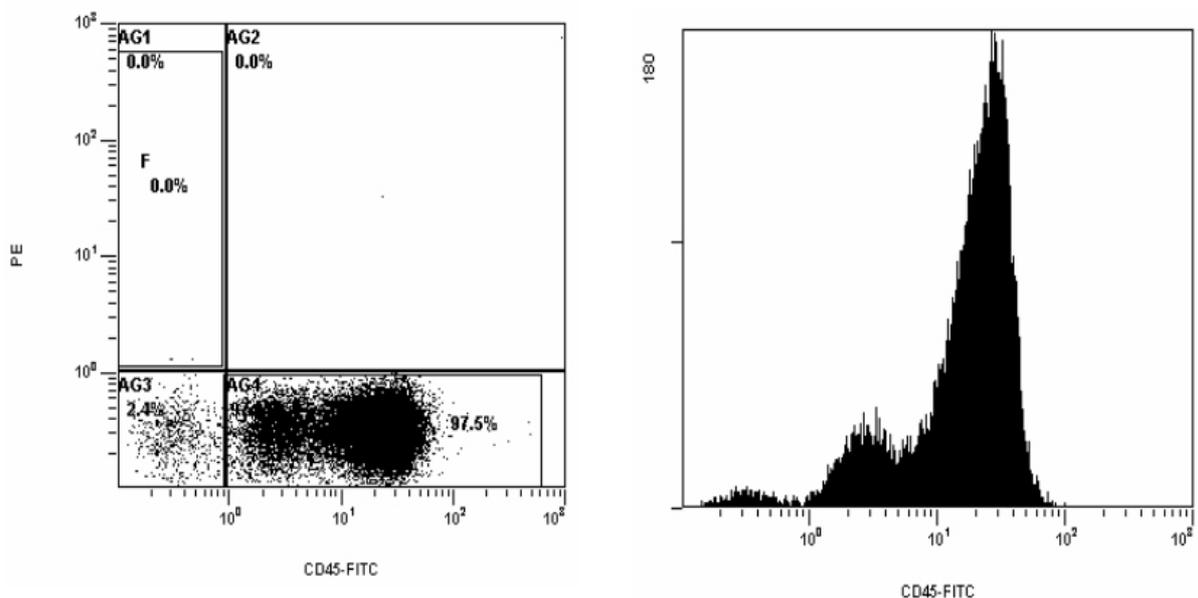


Abbildung 14: Darstellung von CD45<sup>+</sup> Zellen (FITC) in der über Ficoll gereinigten Zellfraktion eines probiotisch gefütterten Tieres am 35. Lebenstag

Links: Darstellung der Ergebnisse im Dotplot; Rechts: Darstellung der CD45<sup>+</sup> Zellen im Histogramm derselben Messung

Im Boxplot ist die Verteilung aller Messwerte der probiotisch behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe grafisch dargestellt. Die ähnlichen Medianwerte der Gruppen und die

verhältnismäßig kleinen Interquartilbereiche in beiden Gruppen weisen auf einen geringen Unterschied zwischen Probiotika- und Kontrollgruppe hin, falls die Fütterungsgruppen nicht in ihre Altersgruppen weiter unterteilt werden.

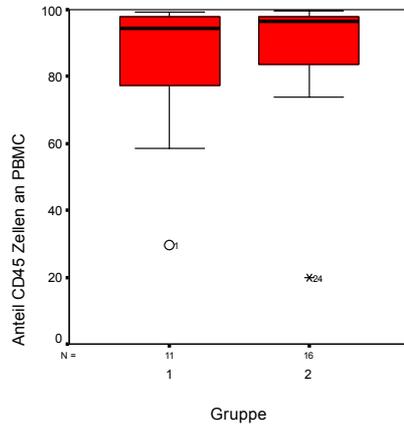
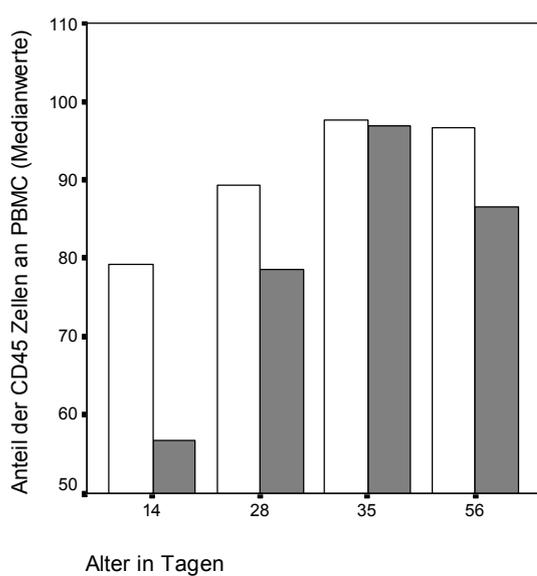


Abbildung 15: Anteil der CD45<sup>+</sup> Zellen in der über Ficoll gereinigten Zellfraktion von Versuchstieren (Gruppe 1) und Kontrolltieren (Gruppe 2) (Die Stichprobengröße ist an der X-Achse angezeigt).

Das Balkendiagramm in Abbildung 16 zeigt nun die Medianwerte der CD45<sup>+</sup> Zellen in den Fütterungsgruppen, die nach Alter der Tiere weiter differenziert wurden.



CD45			
14	1	N	2
		Perzentil 25	29,6
		75	83,9
	2	N	3
		Perzentil 25	73,7
		75	93,0
28	1	N	2
		Perzentil 25	58,4
		75	98,8
	2	N	4
		Perzentil 25	81,8
		75	96,9
35	1	N	3
		Perzentil 25	94,9
		75	98,9
	2	N	5
		Perzentil 25	97,4
		75	98,8
56	1	N	4
		Perzentil 25	76,8
		75	98,1
	2	N	4
		Perzentil 25	38,6
		75	98,0

Abbildung 16: Altersabhängiger Anteil CD45<sup>+</sup> Zellen an in der über Ficoll gereinigten Zellfraktion von probiotisch behandelten Tieren (Gruppe 1, rechte Balken) und Kontrolltieren (Gruppe 2, linke Balken) mit Angabe der Perzentilwerte und Stichprobengröße

Die Häufigkeit der CD45<sup>+</sup> Zellen nahm demnach in beiden Gruppen mit dem Alter zunächst zu, um dann am 56. Tag geringfügig abzufallen. Die Messwerte lagen am 14. Tag in der Kontrollgruppe deutlich höher, dieser (zu keinem Zeitpunkt signifikante) Unterschied wurde bis zum 35. Tag geringer. Zu allen Zeitpunkten war die CD45 Expression in der Kontrollgruppe höher, als in der altersgleichen Gruppe probiotisch behandelter Tiere.

### III. 1. 2 Analyse der CD3<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen

Nach der Inkubation mit PC5-konjugierten Antikörpern gegen CD3 und FITC-konjugierten Antikörpern gegen CD8 konnten weitere Subpopulationen differenziert werden, von denen hier die Gruppe der CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten und CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten beschrieben werden sollen.

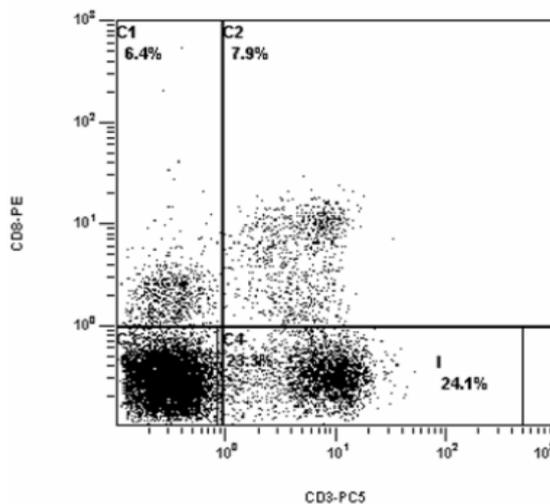


Abbildung 17: Darstellung der Koexpression von CD3 und CD8 in der über Ficoll gereinigten Zellfraktion eines Probiotikatieres

Der Anteil von CD3<sup>+</sup> Lymphozyten an PBMCs schwankte zwischen 7,4% in der probiotisch behandelten Gruppe am 14. Lebenstag und maximal 44% in der Kontrollgruppe am 28. Lebenstag. Die Unterschiede zwischen Versuchsgruppe und Kontrollgruppe waren zu den jeweiligen Beobachtungszeitpunkten nicht signifikant, es ist jedoch zu bemerken, dass die CD3-Expression in der probiotisch behandelten Gruppe vom 14. zum 35. Lebenstag hin stark zunimmt (siehe Abbildung 18). In der Kontrollgruppe steigt der Anteil CD3<sup>+</sup> Lymphozyten mit dem Alter ebenfalls an, wenn auch weniger ausgeprägt. Zu Beginn und am

Ende des Beobachtungszeitraums überwiegen die Messwerte in der Kontrollgruppe, um den Absetzzeitpunkt zwischen dem 28. und 35. Lebensstag wurde CD3 in der probiotisch gefütterten Gruppe stärker exprimiert.

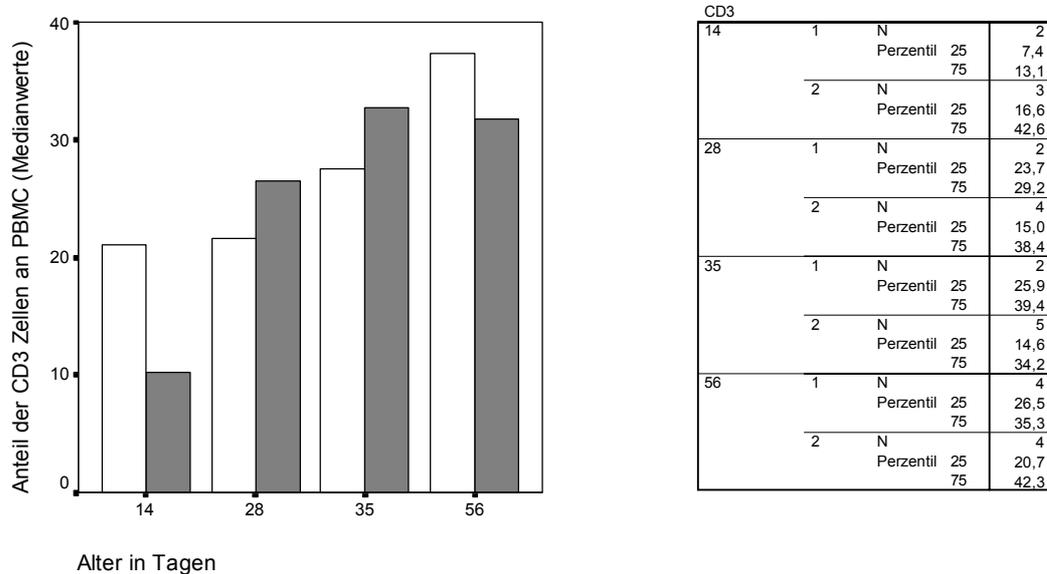


Abbildung 18: Altersabhängiger Anteil CD3<sup>+</sup> Zellen in der über Ficoll gereinigten Zellfraktion von probiotisch behandelten Tieren (Gruppe 1, rechte Balken) und Kontrolltieren (Gruppe 2, linke Balken) mit Angabe der Perzentilwerte und Stichprobengröße

Die Differenzen zwischen den Medianen der probiotisch behandelten Tiergruppe und der Kontrollgruppe erscheinen zunächst nicht bedeutend, es bestanden jedoch Unterschiede der Messwertverteilung zwischen den Fütterungsgruppen. Dies war am 35. Lebensstag besonders deutlich ausgeprägt. Das Streudiagramm in Abbildung 19 verdeutlicht für diesen Tag, dass vier von fünf Messwerten in der Kontrollgruppe unter 30% liegen. Dies deutet darauf hin, dass die Tiergruppen nur einen kleinen Übereinstimmungsbereich hatten, der in der alleinigen Betrachtung von Lagemaßen wie Medianen oder Mittelwerten unzureichend widerspiegelt wird.

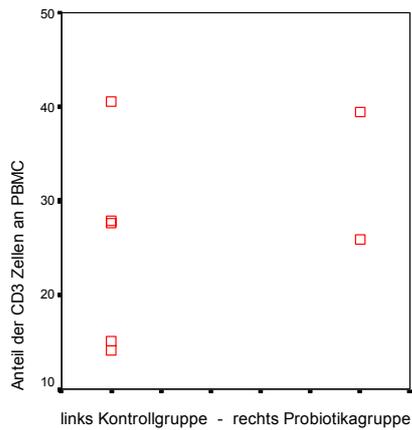
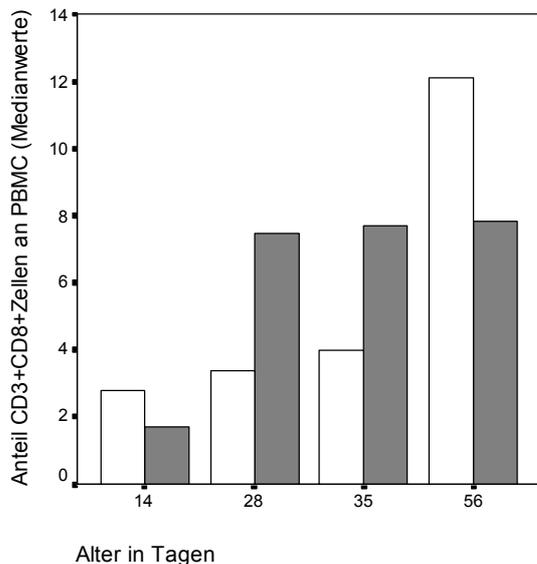


Abbildung 19: Verteilung der Messwerte aus der CD3 Detektion in der über Ficoll gereinigten Zellfraktion von Versuchstieren (Gruppe 1, rechts) und Kontrolltieren (Gruppe 2, links) am 35. Lebenstag

Zytotoxische T-Zellen wurden durch die gleichzeitige Inkubation mit Antikörpern gegen CD3 und CD8 erfasst. Dabei zeigte sich zum einen, dass der Anteil der CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Zellen in der über Ficoll gereinigten Zellfraktion in der probiotisch behandelten Gruppe zunächst stark zunahm. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass am 28. und 35. Tag CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> in der probiotisch behandelten Gruppe doppelt so viele zytotoxische Zellen gemessen wurden, wie in der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 20). Dieser Unterschied war nicht signifikant. In der Kontrollgruppe stieg der Medianwert zwischen dem 35. und 56. Tag um das dreifache an, während sich die entsprechenden Werte in der probiotisch gefütterten Gruppe kaum veränderten.



CD3+CD8+			
14	1	N	2
		Perzentil 25	,6
14	2	N	3
		Perzentil 25	,9
14	75	N	6,0
		Perzentil 75	2,8
28	1	N	2
		Perzentil 25	6,9
28	2	N	4
		Perzentil 25	2,6
28	75	N	13,3
		Perzentil 75	8,0
35	1	N	2
		Perzentil 25	5,4
35	2	N	5
		Perzentil 25	3,9
35	75	N	7,4
		Perzentil 75	10,0
56	1	N	4
		Perzentil 25	5,2
56	2	N	4
		Perzentil 25	5,9
56	75	N	17,7
		Perzentil 75	16,5

Abbildung 20: Altersabhängiger Anteil  $CD3^+CD8^+$  Zellen an in der über Ficoll gereinigten Zellfraktion von probiotisch behandelten Tieren (Gruppe 1, rechte Balken) und Kontrolltieren (Gruppe 2, linke Balken) mit Angabe der Perzentilwerte und Stichprobengröße

Betrachtet man nun die  $CD3^-CD8^+$  Expression in den Versuchsgruppen, konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Es fällt jedoch auf, dass die Medianwerte der Kontrollgruppe stets über denen der altergleichen probiotisch gefütterten Gruppe lagen (siehe Abbildung 21).

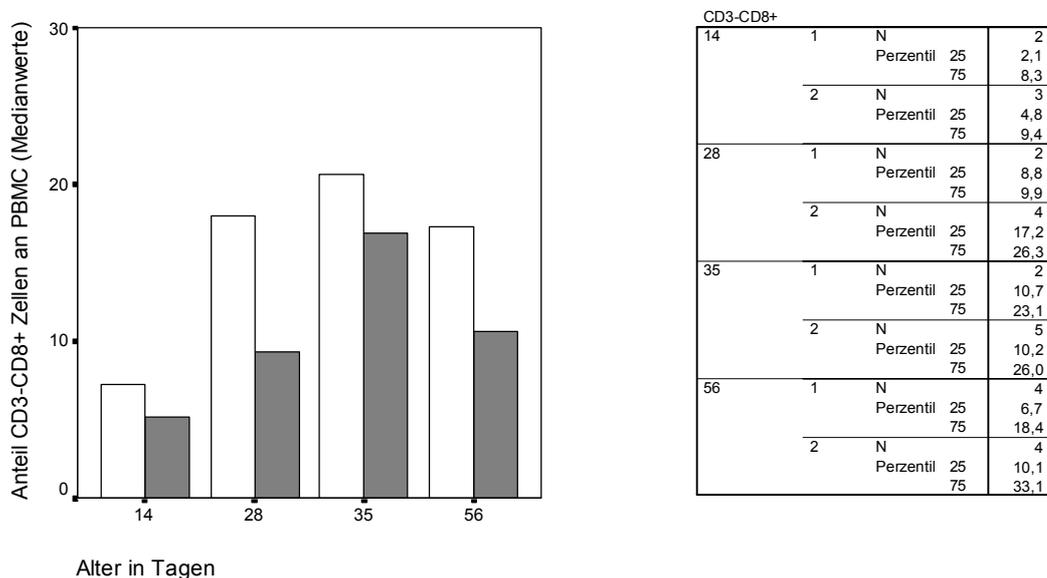


Abbildung 21: Altersabhängige Häufigkeit von  $CD3^-CD8^+$  Zellen in der über Ficoll gereinigten Zellfraktion von probiotisch behandelten Tieren (Gruppe 1, rechte Balken) und Kontrolltieren (Gruppe 2, linke Balken) mit Angabe der Perzentilwerte und Stichprobengröße

### III. 1. 3 Analyse der $CD4^+$ Zellen und $CD4^+CD8^+$ Zellen

T-Helferzellen wurden mit Antikörpern gegen CD4 erfasst. Durch Doppelfärbung mit Antikörpern gegen CD8 konnte zusätzlich der Anteil von  $CD4^+CD8^+$  Lymphozyten in der über Ficoll gereinigten Zellfraktion bestimmt werden.

Betrachtet man die Tiere gleichen Alters, waren  $CD4^+$  Zellen weniger häufig als  $CD8^+$  Zellen zu messen (siehe Tabelle 11, Kap. III.1.4). Der Anteil von T-Helferzellen in der über Ficoll gereinigten Zellfraktion nahm in der Kontrollgruppe mit dem Alter stetig zu. Außer am 35. Tag wurde CD4 in PBMCs der Kontrollgruppe häufiger gemessen, als in der altersgleichen

Gruppe probiotisch behandelter Tiere (siehe Abbildung 22a). Auffällig ist der starke Anstieg von CD4<sup>+</sup> Zellen in der mit *Bacillus cereus* var. *toyoi* gefütterten Ferkelgruppe am 35. Tag.

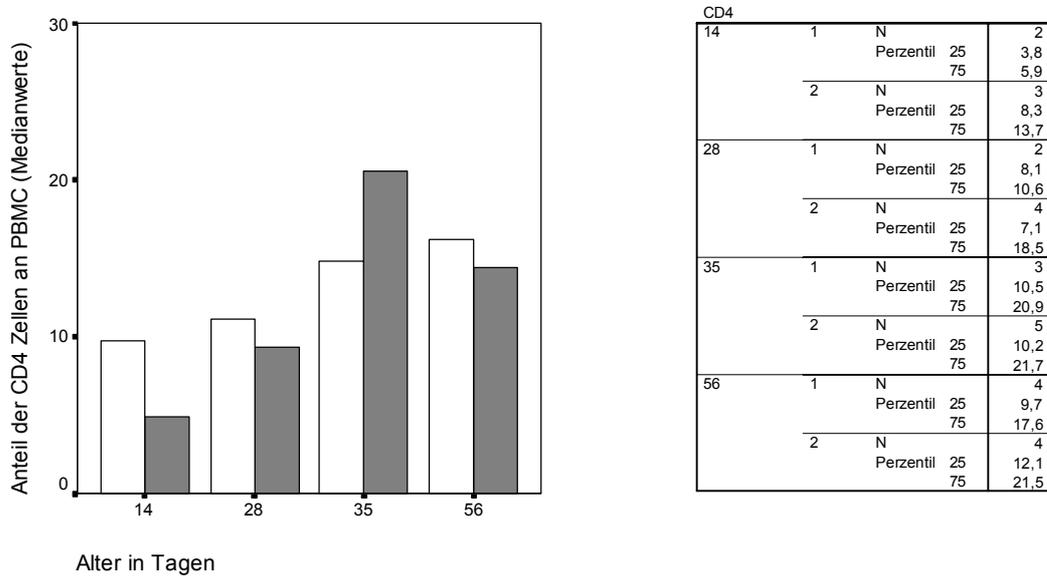


Abbildung 22a: Altersabhängiger Anteil von CD4<sup>+</sup> Zellen in der über Ficoll gereinigten Zellfraktion von probiotisch behandelten Tieren (Gruppe 1, rechte Balken) und Kontrolltieren (Gruppe 2, linke Balken) mit Angabe der Perzentilwerte und Stichprobengröße

In Abbildung 24 sind CD4<sup>+</sup> Lymphozyten und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten nach ihren Fluoreszenzintensitäten aufgetragen. Die Subpopulation CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> doppelt positiver T-Zellen konnte eindeutig identifiziert werden.

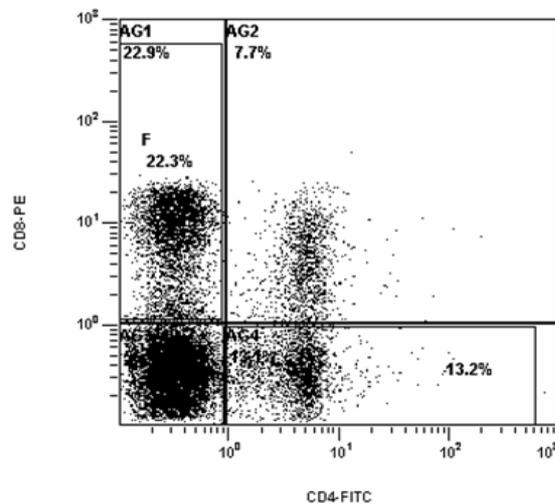


Abbildung 24: Darstellung der Koexpression von CD4 und CD8 in der über Ficoll gereinigten Zellfraktion eines Kontrolltieres

Der Anteil  $CD4^+CD8^+$  Lymphozyten schien in beiden Gruppen mit dem Alter zuzunehmen. In der Kontrollgruppe war diese Population stets stärker ausgeprägt, als in der altersgleichen Gruppe probiotisch gefütterter Tiere. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraums stellten doppelt positive  $CD4^+CD8^+$  T-Zellen einen geringen Anteil der gesamten  $CD4^+$  Zellpopulation dar (siehe Abbildung 22 und Abbildung 25). Interessanterweise fiel der Anteil  $CD4^+CD8^+$  Lymphozyten in beiden Fütterungsgruppen am 35. Tag ab, während der Anteil  $CD4^+$  Lymphozyten an diesem Tag anstieg. Die Zunahme  $CD4^+$  Zellen ist also nicht durch eine Zunahme  $CD4^+CD8^+$  Zellen zu erklären.

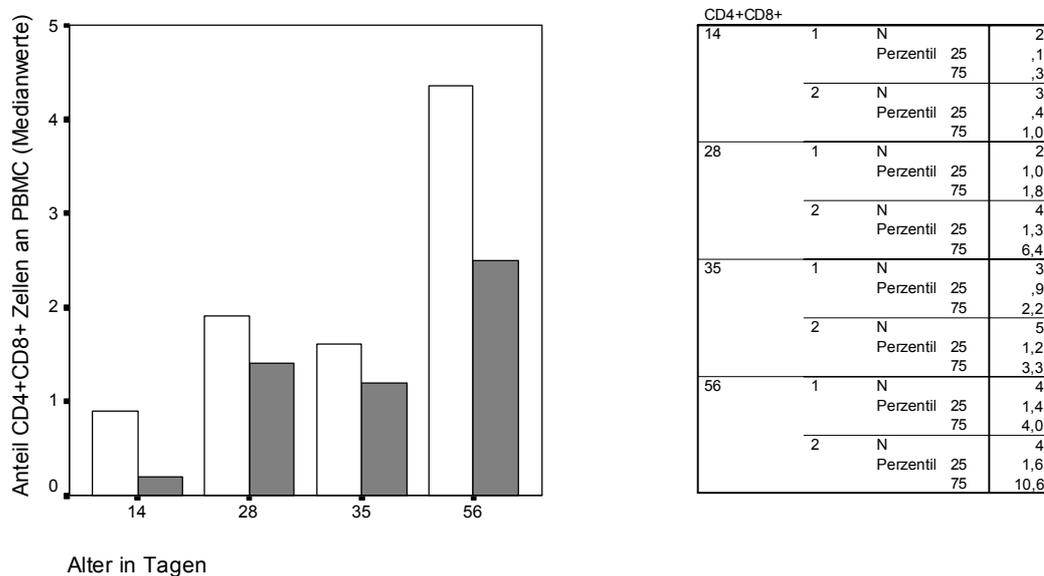


Abbildung 25: Altersabhängiger Anteil  $CD4^+CD8^+$  Zellen in der über Ficoll gereinigten Zellfraktion von probiotisch behandelten Tieren (Gruppe 1, rechte Balken) und Kontrolltieren (Gruppe 2, linke Balken) mit Angabe der Perzentilwerte und Stichprobengröße

Der starke Anstieg von  $CD4^+$  Zellen in der mit *B. cereus* var. *toyoi* gefütterten Ferkelgruppe am 35. Tag könnte durch die Zunahme naiver  $CD4^+CD8^-$  T-Lymphozyten erklärt werden, wie Abbildung 22b zeigt.

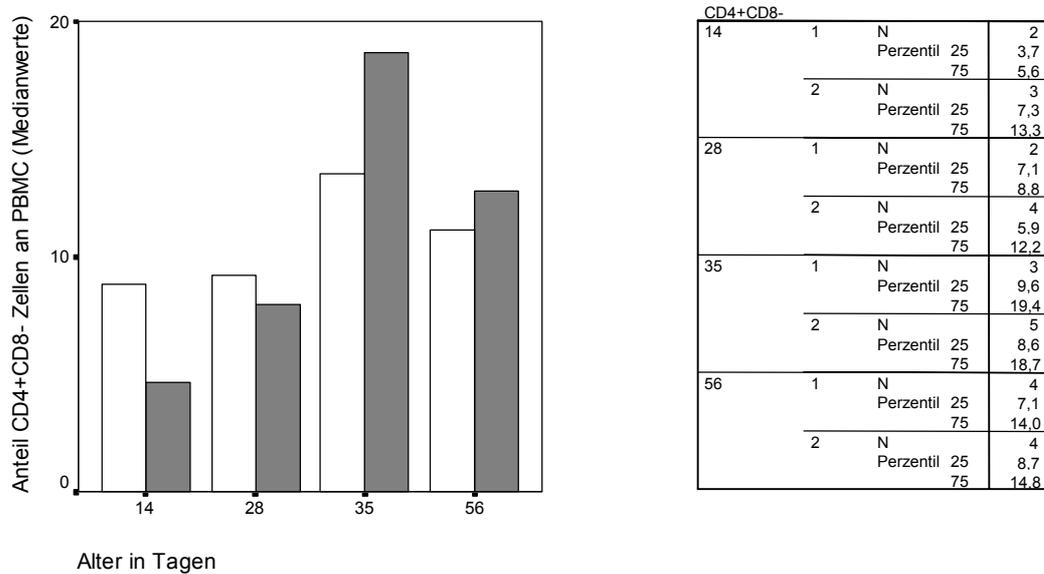


Abbildung 22b: Altersabhängiger Anteil  $CD4^+CD8^-$  Zellen in der über Ficoll gereinigten Zellfraktion von probiotisch behandelten Tieren (Gruppe 1, rechte Balken) und Kontrolltieren (Gruppe 2, linke Balken) mit Angabe der Perzentilwerte und Stichprobengröße

In der Versuchsgruppe waren  $CD4^+CD8^-$  T-Lymphozyten zunächst weniger häufig, als in der Kontrollgruppe. Ihr Anteil stieg nach dem Absetzen aber deutlich stärker an und lag am 35. Tag über den Werten der Kontrollgruppe. Zum 56. Tag hin fiel in beiden Gruppen der Anteil naiver T-Lymphozyten ab, die Werte der Versuchsgruppe lagen auch am 56. Tag über den Werten der Kontrollgruppe.

### III. 1. 4 Analyse der $\gamma\delta$ - T-Zellen

Die  $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation konnte in der Auftragung nach Lichtstreuung im Lymphozytenbereich lokalisiert werden (Abbildung 26). Betrachtet man die Zellentwicklung in den ersten 60 Lebenstagen der beiden Fütterungsgruppen, scheint der Anteil von  $\gamma\delta$  - T-Lymphozyten in der über Ficoll gereinigten Zellfraktion in der probiotisch behandelten Gruppe mit dem Alter zuzunehmen. In der Kontrollgruppe konnte diese Entwicklung nicht gezeigt werden (Abbildung 27). Es schien sich vielmehr eine Abnahme des Anteils von  $\gamma\delta$  - T-Lymphozyten anzudeuten.

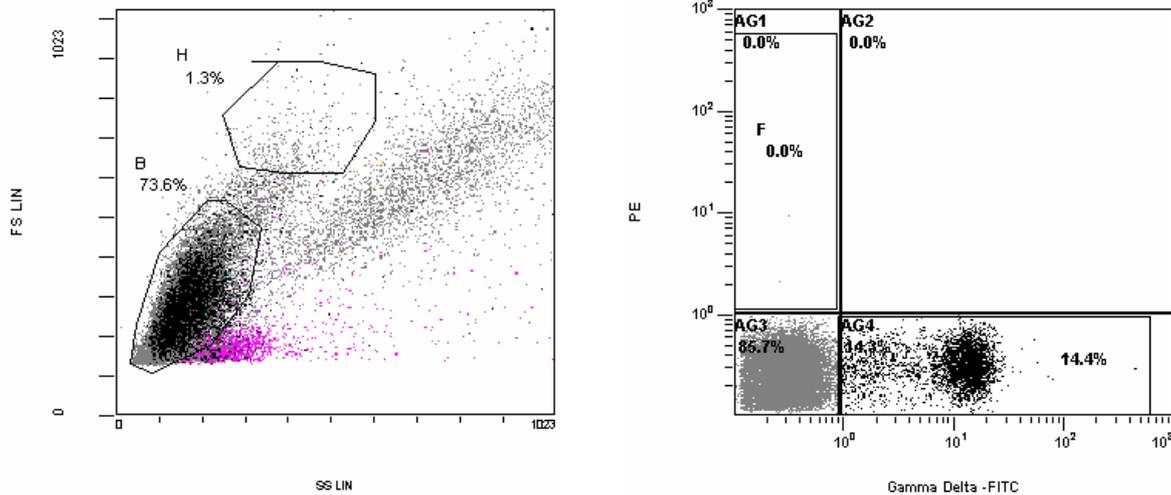
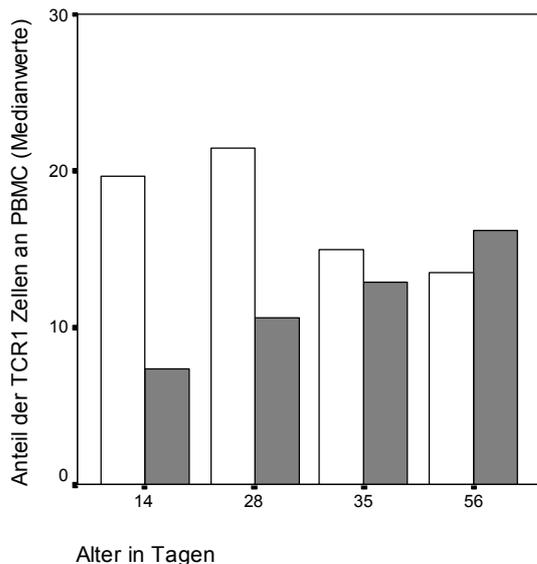


Abbildung 26: Darstellung der  $\gamma\delta$  - T-Zellen (schwarz) eines Probiotikatieres.

Links: Lokalisation  $\gamma\delta$  - T-Zellen im Lymphozytengate B; Rechts: Darstellung der  $\gamma\delta$  - T-Zellen (schwarz) im Dotplot

Der größte Unterschied zwischen probiotisch behandelten Tieren und konventionell gefütterter Gruppe bestand zu Beginn des Beobachtungszeitraums. Am 14. Lebenstag exprimierten deutlich mehr Lymphozyten in der Kontrollgruppe den  $\gamma\delta$  - T-Zellrezeptor. Am 56. Lebenstag zeigte sich nur ein kleiner Unterschied zwischen den Fütterungsgruppen.



GammaDelta					
14	1	N	2		
		Perzentil 25	5,2		
	Perzentil 75	9,5			
	2	N	3		
Perzentil 25		11,1			
28	1	N	2		
		Perzentil 25	9,7		
	Perzentil 75	11,5			
	2	N	4		
Perzentil 25		17,7			
35	1	N	3		
		Perzentil 25	12,3		
	Perzentil 75	14,5			
	2	N	5		
Perzentil 25		8,4			
56	1	N	4		
		Perzentil 25	12,7		
	Perzentil 75	19,2			
	2	N	4		
Perzentil 25		10,2			
		Perzentil 75	22,6		

Abbildung 27: Altersabhängiger Anteil TCR1<sup>+</sup> Zellen an PBMCs von probiotisch behandelten Tieren (Gruppe 1, rechte Balken) und Kontrolltieren (Gruppe 2, linke Balken) mit Angabe der Perzentilwerte und Stichprobengröße

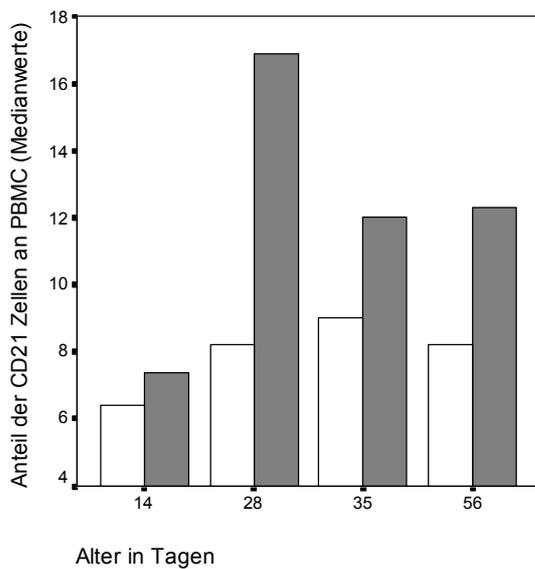
Vergleicht man den Anteil der  $\gamma\delta$  - T-Lymphozyten an PBMCs mit dem Anteil der anderen erfassten T-Zellsubpopulationen an PBMCs fällt der absolut gesehen große Anteil von  $\gamma\delta$  - T-Lymphozyten auf. Bei der Interpretation gilt es jedoch zu bedenken, dass sich in der  $\gamma\delta$  - T-Zellpopulation auch Lymphozyten befinden können, die CD8 exprimieren. In Tabelle 11 sind die Medianwerte der Expression von  $\gamma\delta$  - T-Zellrezeptor, CD4 und CD8 auf den untersuchten Lymphozyten gegenübergestellt.

Alter in Tagen	Gruppe	$\gamma\delta$ - TCR	CD4	CD8
14	P	7,35 %	4,8 %	14,35 %
	K	19,7 %	9,7 %	11,8 %
28	P	10,6 %	9,35 %	18,25 %
	K	21,45 %	11,1 %	26,85 %
35	P	12,9 %	20,6 %	18 %
	K	15 %	14,8 %	25,4 %
56	P	16,15 %	14,45 %	17,65 %
	K	13,5 %	16,15 %	25,75 %

Tabelle 11: Anteil der  $\gamma\delta$  - T-Lymphozyten, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten an PBMCs der mit *B. cereus* var. *toyoi* behandelten Gruppe (Gruppe P) und der Kontrollgruppe (Gruppe K)

### III. 1. 5 Analyse der CD21<sup>+</sup> Zellen

Um den Anteil von B-Zellen an PBMCs durchflusszytometrisch zu ermitteln, wurden Antikörper gegen den Komplementrezeptor CD21 verwendet. Dabei zeigte sich zum einen, dass der prozentuale Anteil der B-Lymphozyten an PBMCs deutlich geringer war, als der Anteil von T-Lymphozyten (siehe III.1.2 Analyse der CD3<sup>+</sup> Zellen). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass CD21 auf PBMCs probiotisch behandelter Tieren häufiger exprimiert wurde, als in der altersgleichen Kontrollgruppe (Abbildung 28).



CD21			
14	1	N	2
		Perzentil 25	5,5
		75	9,3
2	2	N	3
		Perzentil 25	6,0
		75	10,6
28	1	N	2
		Perzentil 25	15,3
		75	18,5
2	2	N	4
		Perzentil 25	7,8
		75	12,1
35	1	N	3
		Perzentil 25	6,2
		75	17,8
2	2	N	5
		Perzentil 25	7,5
		75	13,1
56	1	N	4
		Perzentil 25	7,7
		75	20,4
2	2	N	4
		Perzentil 25	6,6
		75	11,9

Abbildung 28: Altersabhängiger Anteil CD21<sup>+</sup> Zellen in der über Ficoll gereinigten Zellfraktion von probiotisch behandelten Tieren (Gruppe 1, rechte Balken) und Kontrolltieren (Gruppe 2, linke Balken) mit Angabe der Perzentilwerte und Stichprobengröße

Diese Differenz war in allen Altersstufen zu sehen, sie war jedoch nicht signifikant. Das Streudiagramm hingegen verdeutlicht, dass sich die Messwerte zwischen den Gruppen sehr unterschieden. Am 28. Tag war dieser Unterschied besonders ausgeprägt. Hier lagen alle Messwerte in der mit *B. cereus* var. *toyoi* behandelten Gruppe über den Werten der Kontrollgruppe (Abbildung 29).

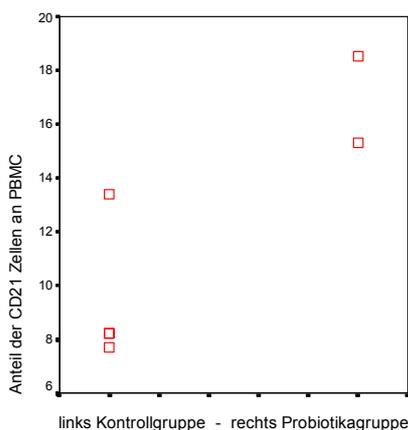


Abbildung 29: Verteilung der Messwerte von CD21<sup>+</sup> Zellen im Blut von Versuchstieren (Gruppe 1, rechts) und Kontrolltieren (Gruppe 2, links) am 28. Tag

### III. 1. 6 Analyse der CD14<sup>+</sup> Zellen

Der Antikörper gegen CD14 wurde eingesetzt, um porcine Monozyten zu detektieren, die dieses Protein auf ihrer Oberfläche exprimieren. In der Auftragung nach ihren Streulichteigenschaften konnten CD14<sup>+</sup> Zellen im Analysefenster H (Monozyten) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 30).

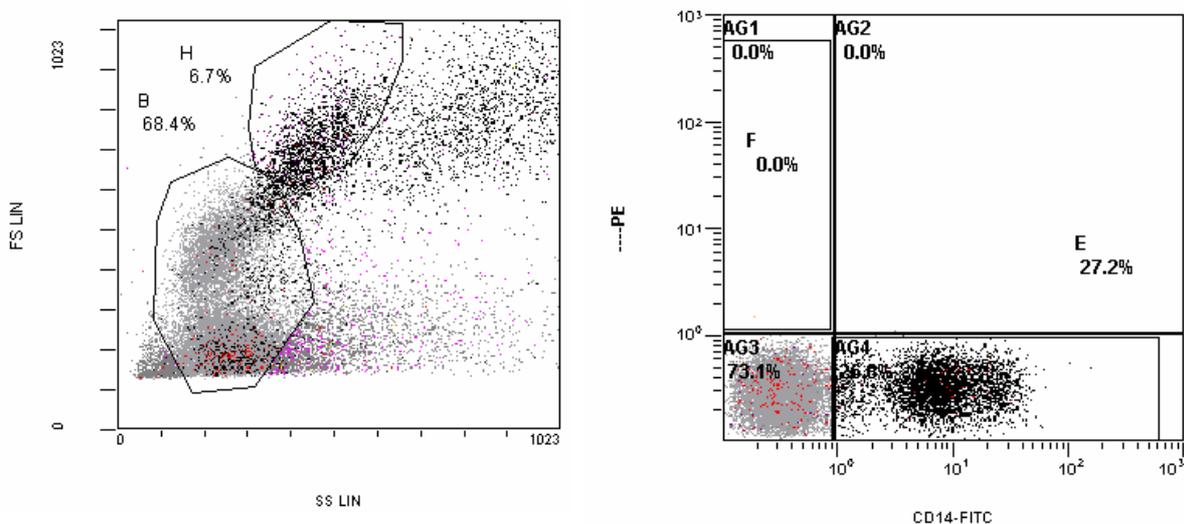
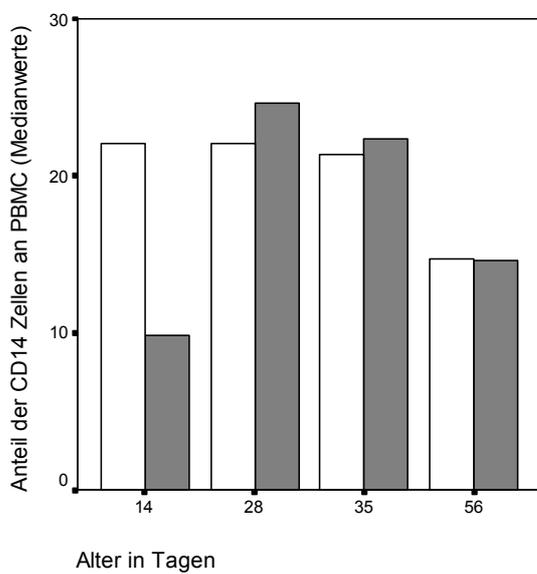


Abbildung 30: Darstellung der Expression von CD14 (schwarz) auf PBMCs eines Probiotikatieres.

Links: Lokalisation der CD14 positiven Monozyten im Analysefenster H; Rechts: Darstellung der CD14<sup>+</sup> Zellen (schwarz) im Dotplot

Der Anteil CD14<sup>+</sup> Zellen an PBMCs nahm nach einem anfänglichen Anstieg in beiden Fütterungsgruppen mit dem Alter ab. Zu Beginn des Beobachtungszeitraums stellten die CD14<sup>+</sup> Zellen in der Kontrollgruppe zwar einen größeren Anteil an PBMCs dar, als in der mit *B. cereus* var. *toyoi* behandelten Gruppe. So war der Medianwert am 14. Lebenstag in der Kontrollgruppe bedeutend höher als in der probiotisch behandelten Gruppe. Im weiteren Verlauf waren jedoch keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen zu beobachten.



CD14			
14	1	N	2
		Perzentil 25	4,3
		75	15,3
2		N	3
		Perzentil 25	16,5
		75	22,3
28	1	N	2
		Perzentil 25	17,4
		75	31,8
2		N	4
		Perzentil 25	15,5
		75	26,0
35	1	N	3
		Perzentil 25	11,8
		75	37,6
2		N	5
		Perzentil 25	17,6
		75	51,8
56	1	N	4
		Perzentil 25	12,2
		75	17,5
2		N	4
		Perzentil 25	13,3
		75	24,0

Abbildung 31: Altersabhängiger Anteil CD14<sup>+</sup> Zellen an PBMCs von probiotisch behandelten Tieren (Gruppe 1, rechte Balken) und Kontrolltieren (Gruppe 2, linke Balken) mit Angabe der Perzentilwerte und Stichprobengröße

Vergleicht man ausschließlich Medianwerte miteinander, wird man jedoch der realen Verteilung von Messwerten nicht vollkommen gerecht, deshalb soll die tatsächliche Messwertverteilung für den 14. und 35. Tag im Streudiagramm aufgeführt werden. Am 14. Tag lagen alle Messwerte der Kontrollgruppe über denen der Probiotikagruppe. Am 35. Tag lag der Medianwert in der probiotisch behandelten Gruppe geringfügig über dem vergleichbaren Wert der Kontrollgruppe. (siehe Abbildungen 32 und 33).

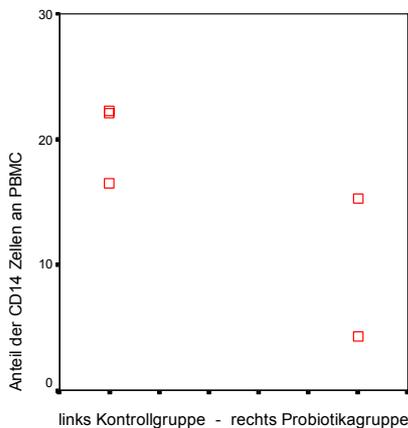


Abbildung 32: Verteilung der Messwerte von CD14<sup>+</sup> Zellen im Blut von Versuchstieren (Gruppe 1, rechts) und Kontrolltieren (Gruppe 2, links) am 14. Lebenstag

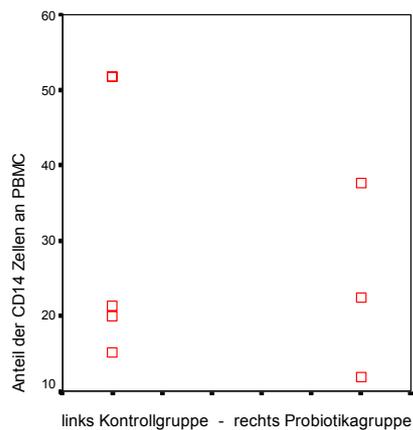


Abbildung 33: Verteilung der Messwerte von CD14<sup>+</sup> Zellen im Blut von Versuchstieren (Gruppe 1, rechts) und Kontrolltieren (Gruppe 2, links) am 35. Lebenstag

Die Abnahme des Monozytenanteils an PBMCs und die gleichzeitige Zunahme des Anteils von Lymphozyten an den PBMCs könnte auf die fortschreitende Ausreifung des Darmimmunsystems hinweisen. Zum Geburtszeitpunkt dominieren vor allem unspezifische, angeborene Abwehrmechanismen, während es in der zunehmenden Spezialisierung der Immunantwort zu einer stärkeren Gewichtung der spezifischen, erworbenen Immunantwort kommen könnte.

### III. 1. 7 Analyse der IFN- $\gamma$ produzierenden Zellen

Bei der intrazellulären Detektion von IFN- $\gamma$  wurde eine gleichzeitige Inkubation mit FITC-konjugierten fluoreszierenden CD45 Antikörpern durchgeführt. Nach der Vorauswahl („Gating“) auf IFN- $\gamma$  produzierende Zellen konnte gezeigt werden, dass 66,3 - 94,6% aller CD45<sup>+</sup> Zellen nach Stimulation mit PMA IFN- $\gamma$  produziert haben (siehe Abbildung 34). In der Kontrollgruppe war die Frequenz IFN- $\gamma$  produzierender Zellen geringgradig höher, als in der Probiotikagruppe.

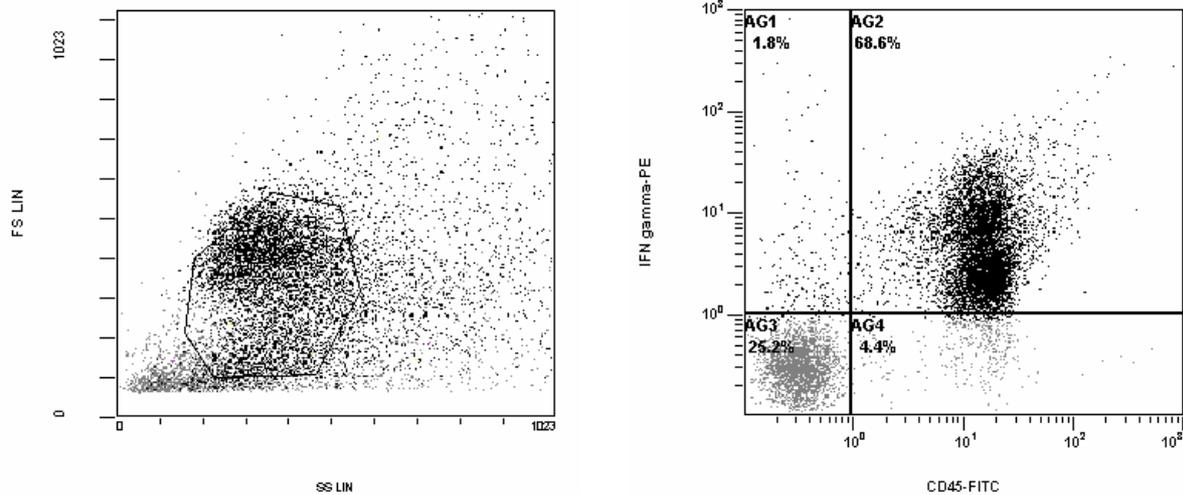
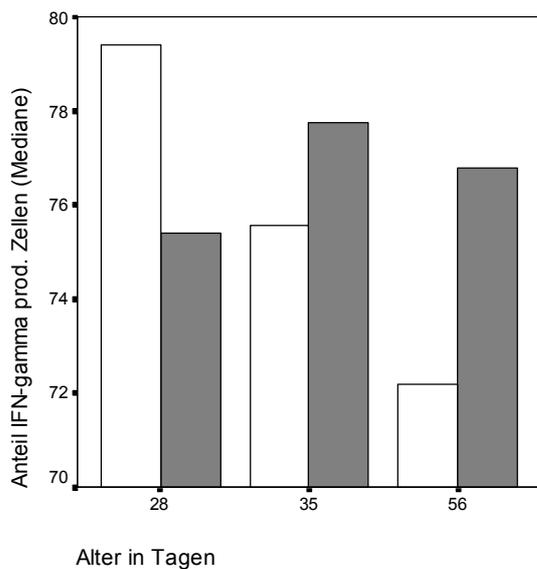


Abbildung 34: Darstellung von IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen (schwarz) eines Probiotikatiertes nach Stimulation mit PMA

Links: Lokalisation IFN- $\gamma$  produzierender Zellen im Lymphozytenfenster; Rechts: Darstellung der IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen (schwarz) im Dotplot

Betrachtet man den Anteil IFN- $\gamma$  produzierender Zellen in den Altersgruppen der Versuchstiere scheinen sich die Fütterungsgruppen tendenziell gegensätzliche zu entwickeln. In der Kontrollgruppe nahm der mittlere Anteil IFN- $\gamma$  produzierender Zellen mit dem Alter ab, während die Häufigkeit dieser Zellen in der probiotisch behandelten Gruppe durchschnittlich tendenziell zuzunehmen schien (siehe Abbildung 35). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren jedoch gering und zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant.



IFN-gamma			
28	1	N	1
		Perzentil 25	75,4
		Perzentil 75	75,4
2	N	3	
		Perzentil 25	68,9
		Perzentil 75	94,6
35	1	N	2
		Perzentil 25	69,3
		Perzentil 75	86,2
2	N	2	
		Perzentil 25	70,1
		Perzentil 75	81,0
56	1	N	2
		Perzentil 25	72,3
		Perzentil 75	81,3
2	N	2	
		Perzentil 25	66,3
		Perzentil 75	78,1

Abbildung 35: Altersabhängiger Anteil von IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen an PBMCs von probiotisch behandelten Tieren (Gruppe 1, rechte Balken) und Kontrolltieren (Gruppe 2, linke Balken) mit Angabe der Perzentilwerte und Stichprobengröße (am 14. LT konnten keine Daten erhoben werden, da der Anteil lebender Zellen nach dem Stimulierungsprotokoll für eine durchflusszytometrische Analyse zu gering war)

### III. 2 Detektion von Leukozytensubpopulationen in Darmgewebe

Von Darmproben des proximalen Jejunums euthanasierter Ferkel wurden Kryostatgewebeschnitte hergestellt, die nach Acetonfixierung und Serumvorinkubation mit Antikörpern behandelt wurden. Diese Antikörper waren spezifisch für porcine Leukozytenoberflächenmoleküle und wurden über PE- oder FITC-konjugierte Sekundärantikörper detektiert. Jeder Schnitt wurde zusätzlich mit dem fluoreszierenden Kernfarbstoff DAPI angefärbt. In einem Fluoreszenzmikroskop, das mit einer Digitalkamera ausgestattet war, wurden digitale Bilder erstellt, die gespeichert und mit Hilfe einer Analysesoftware ausgewertet wurden. Von jedem Schnitt wurden Aufnahmen erstellt, mit den entsprechenden Filtern für die Farbstoffe DAPI, FITC und PE. Die folgenden morphometrischen Erhebungen wurden mit der Analysesoftware MetaMorph<sup>®</sup> durchgeführt. Durch Bildung von so genannten Bilder-Stacks konnten alle Aufnahmen einer Lokalisation exakt übereinander gelegt werden. Markierte man nun eine Struktur auf der DAPI-Ansicht, wurde diese Markierung auf die FITC- und PE-Ansicht ortsrichtig übertragen. In der vorliegenden Arbeit wurden nur positive Zellen gewertet, die in einem vordefinierten Messrahmen lokalisiert waren. Um diesen Messrahmen festzulegen, wurde zunächst ein geeigneter Gewebebereich (intakte Zotte mit umgrenzendem Kryptbereich von Zottenspitze bis zur *Lamina muscularis mucosae*) auf der DAPI-Ansicht mit dem Cursor umfahren und dessen Fläche bestimmt. Dann wurden FITC- oder PE-positive Zellen per Mausklick gekennzeichnet und gezählt. Für die Analyse wurden daher nur Gewebeschnitte ausgewählt, die nach dem Inkubationsprotokoll eine, für die morphometrische Analyse, ausreichend intakte Gewebestruktur aufwiesen. Daher kann die Stichprobengröße der einzelnen Messungen variieren.

Abbildung A in Kapitel III. 2. 9 (Vergleichende Immunfluoreszenzfärbungen) zeigt die Vorgehensweise am Beispiel der Quantifizierung von CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten mittels Verwendung PE-konjugierter Sekundärantikörper. In Abbildung B ist dasselbe Verfahren zur Erfassung von CD11R1<sup>+</sup> Zellen mittels Verwendung FITC-konjugierter Sekundärantikörper dargestellt.

Eine vergleichende Darstellung der Fluoreszenzfärbungen ist für jeden Antikörper und für jede Tiergruppe am Ende des Kapitels zusammengestellt (siehe III.2.9).

### III. 2. 1 Detektion der CD45<sup>+</sup> Lymphozyten

Die Detektion von CD45<sup>+</sup> Lymphozyten wurde über FITC-konjugierte Sekundärantikörper durchgeführt. Die so erfassten Lymphozyten waren in großer Zahl im proximalen Jejunum vertreten. Gehäuft waren sie subepithelial und in der *Lamina propria mucosae* des Zottenbereichs zu finden. Auch intraepithelial waren sie zu verzeichnen. Nur in der Submukosa waren wenige Zellen zu zählen. Ihre Anzahl schwankte insgesamt zwischen minimal 133,62 Zellen/10<sup>5</sup>µm<sup>2</sup> Schleimhaut am 14. Lebenstag und maximal 1123,37 Zellen/10<sup>5</sup>µm<sup>2</sup> Schleimhautfläche am 56. Tag. Die Zahl der CD45<sup>+</sup> Lymphozyten nahm bis zum 56. Lebenstag kontinuierlich zu. Das Verteilungsmuster der CD45<sup>+</sup> Lymphozyten war bei den Kontrolltieren und den Versuchstieren gleich gestaltet. Bei den Tieren, die mit *B. cereus* var. *toyoi* behandelt wurden, waren in den Altersgruppen ab dem 28. Tag mehr Zellen zu zählen, als bei den Kontrolltieren. Dieser Unterschied war am 56. Lebenstag am größten, jedoch nicht signifikant. Zum 56. Lebenstag hin vergrößerte sich die Zellzahldifferenz zunehmend.

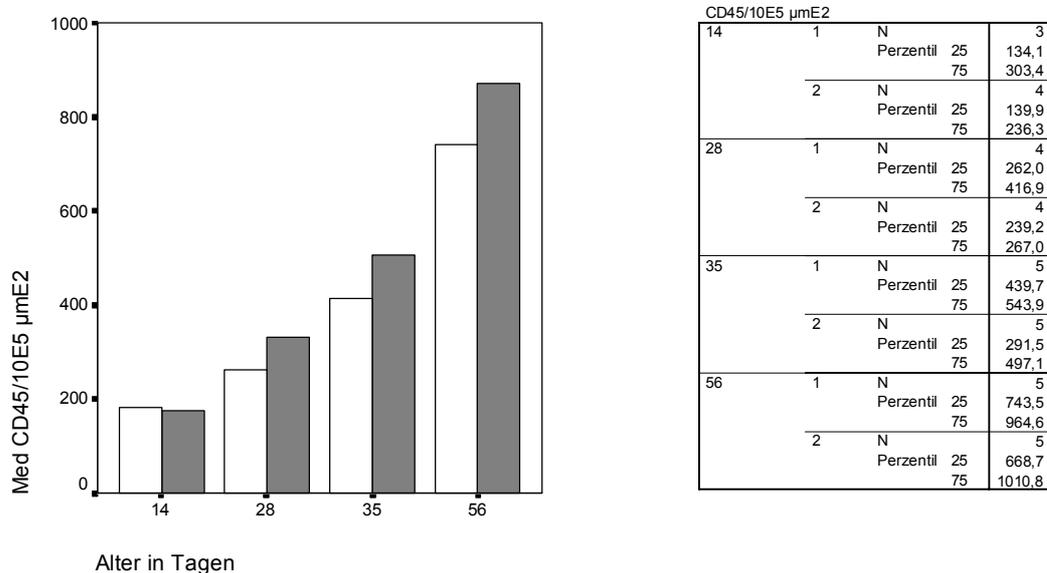


Abbildung 38: Anzahl der CD45<sup>+</sup> Lymphozyten pro 10<sup>5</sup>µm<sup>2</sup> Schleimhautfläche von Ferkeln der Probiotikagruppe (Gruppe 1, rechte Balken) und der Kontrollgruppe (Gruppe 2, linke Balken) zu unterschiedlichen Alterszeitpunkten mit Angabe der Streuungsmaße und Stichprobengrößen

### III. 2. 2 Detektion der CD3<sup>+</sup> Lymphozyten

CD3<sup>+</sup> Lymphozyten waren im Epithel und in der *Lamina propria mucosae* des Krypt- und Zottenbereichs zu finden. Dabei waren tendenziell mehr Zellen im Zottenbereich, als im Kryptbereich nachzuweisen. Die Anzahl der CD3<sup>+</sup> Lymphozyten reichte von 47,29 Zellen/10<sup>5</sup>µm<sup>2</sup> Schleimhaut und maximal 656,47 Zellen/10<sup>5</sup>µm<sup>2</sup> Schleimhautfläche und nahm mit dem Alter eindeutig sehr stark zu. In allen Altersstufen wiesen die Tiere der Probiotikagruppe mehr CD3<sup>+</sup> Lymphozyten auf, als die Tiere in der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied war am 35. Tag am größten, jedoch zu keinen Zeitpunkten signifikant. CD3<sup>+</sup> Lymphozyten wurden mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 weitergehend charakterisiert.

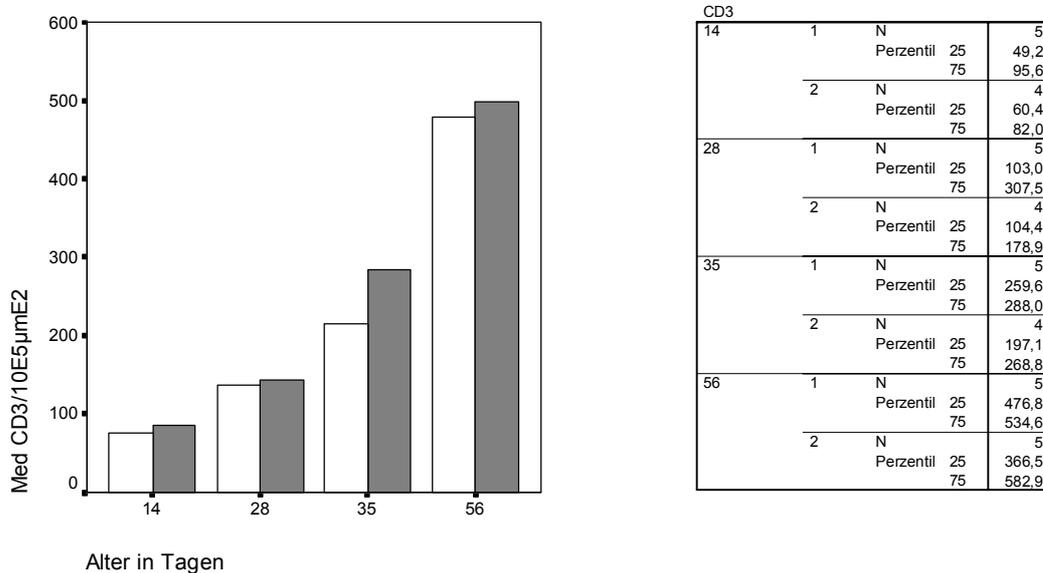


Abbildung 39: Anzahl der CD3<sup>+</sup> Lymphozyten pro 10<sup>5</sup>µm<sup>2</sup> Schleimhautfläche von Ferkeln der Probiotikagruppe (Gruppe 1, rechte Balken) und der Kontrollgruppe (Gruppe 2, linke Balken) zu unterschiedlichen Alterszeitpunkten mit Angabe der Streuungsmaße und Stichprobengrößen

### III. 2. 3 Detektion der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten

CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten waren hauptsächlich im Zottenbereich lokalisiert. Intraepithelial konnten keine Zellen nachgewiesen werden, die meisten Zellen waren direkt subepithelial zu finden. Ihre Anzahl verzehnfachte sich nahezu von minimal 16,3 Zellen/10<sup>5</sup>µm<sup>2</sup> Schleimhaut und maximal 227,35 Zellen/10<sup>5</sup>µm<sup>2</sup>. Ähnlich der Detektion von CD45<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> Lymphozyten waren auch hier in der Gruppe der probiotisch gefütterten Ferkel am 35. Lebenstag mehr CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten zu zählen, als in der Kontrollgruppe. Dieser

Unterschied war jedoch nicht signifikant und an den anderen Beobachtungszeitpunkten waren keine Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und Versuchsgruppe zu sehen. In beiden Gruppen nahm die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten mit dem Alter kontinuierlich zu.

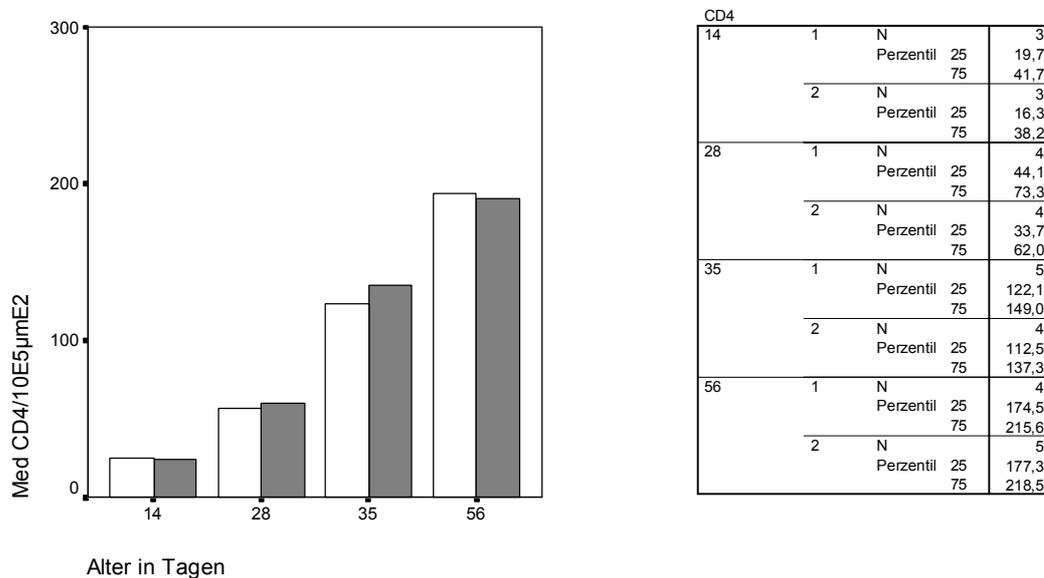


Abbildung 40: Anzahl der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten pro 10<sup>5</sup>μm<sup>2</sup> Schleimhautfläche von Ferkeln der Probiotikagruppe (Gruppe 1, rechte Balken) und der Kontrollgruppe (Gruppe 2, linke Balken) zu unterschiedlichen Alterszeitpunkten mit Angabe der Streuungsmaße und Stichprobengrößen

### III. 2. 4 Detektion der CD8<sup>+</sup> Lymphozyten

Da CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten überwiegend intraepithelial lokalisiert waren, wurde ihre Anzahl auf die Länge des Epithels bezogen. Vereinzelt konnten Zellen in der *Lamina propria mucosae* nachgewiesen werden, in der Submukosa waren keine CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten zu finden. Ihre Anzahl nahm mit dem Alter in beiden Gruppen zu, wobei vor allem am 35. Lebenstag mit 17,16 Zellen/10<sup>2</sup>μm Epithellänge deutlich mehr Zellen in der Versuchsgruppe zu finden waren als in der Kontrollgruppe mit 11,12 Zellen/10<sup>2</sup>μm Epithellänge. Im Gruppenvergleich wurde mit dem Signifikanztest nach Mann-Whitney am 35. Tag eine asymptotische Signifikanz von 0,05 ermittelt. Da ein Gruppenunterschied bei einem Wert ≤ 0,05 als signifikant definiert wurde (siehe II.2.7), wurde der Unterschied zwischen Versuchsgruppe und Kontrollgruppe als signifikant bewertet. Die Betrachtung der Messwertverteilung im Boxplot belegt den Unterschied zwischen Versuchsgruppe und Kontrollgruppe besonders anschaulich.

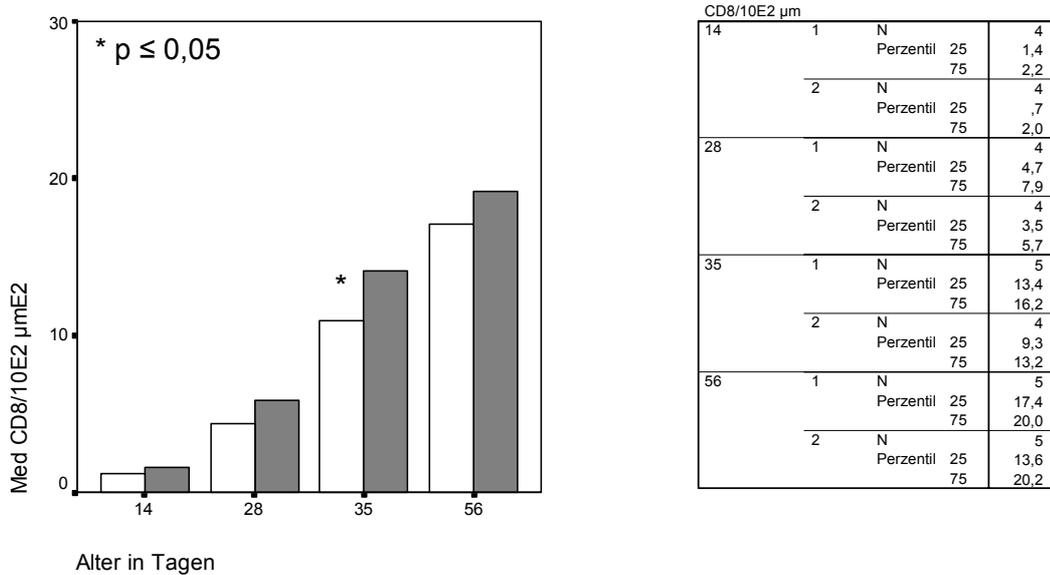


Abbildung 41: Anzahl der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten pro 10<sup>2</sup> $\mu\text{m}$  Epithellänge von Ferkeln der Probiotikagruppe (Gruppe 1, rechte Balken) und der Kontrollgruppe (Gruppe 2, linke Balken) zu unterschiedlichen Alterszeitpunkten mit Angabe der Streuungsmaße und Stichprobengrößen

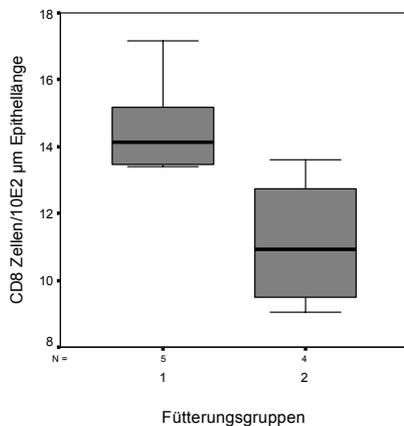


Abbildung 42: Verteilung der Messwerte aus der CD8 Detektion im proximalen Jejunum von Probiotiktieren (Gruppe 1) und Kontrolltieren (Gruppe 2) am 35. Lebenstag

### III. 2.5 Detektion der $\gamma\delta$ - T-Lymphozyten

$\gamma\delta$ -T-Lymphozyten waren häufig in der *Lamina propria mucosae*, weniger häufig im Epithel und selten in der Submukosa anzutreffen. Diese Zellen kamen tendenziell häufiger im Zottenbereich, als im Kryptbereich vor. In beiden Gruppen waren am 14. Lebenstag nur sehr wenig  $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten nachzuweisen. Ihre Anzahl stieg von minimal 1,46 Zellen/10<sup>5</sup> $\mu\text{m}^2$

Schleimhaut auf maximal 98,7 Zellen/ $10^5\mu\text{m}^2$  mit dem Alter an. Ein deutlicher Anstieg war am 28. Tag und 35. Tag in der Versuchsgruppe zu verzeichnen. Die Tiere der Versuchsgruppe wiesen ab dem 28. Lebenstag mehr  $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten auf als die Tiere der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied war am 35. Tag am größten und zu diesem Zeitpunkt signifikant ( $p \leq 0,05$ ). Am Ende des Beobachtungszeitraumes waren in den Fütterungsgruppen nahezu gleiche Zellzahlen nachzuweisen.

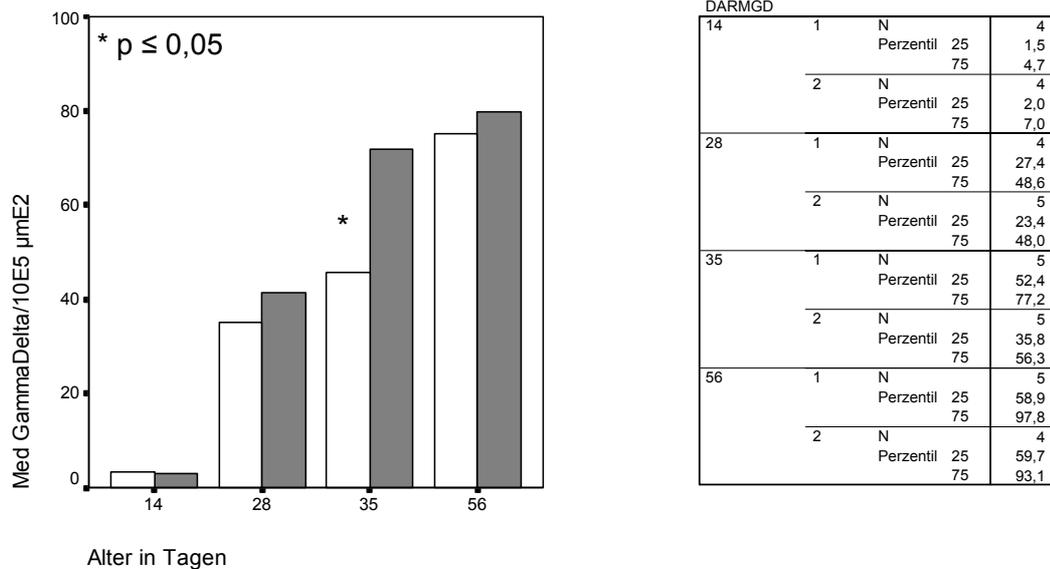


Abbildung 43: Anzahl der  $\gamma\delta$  - T-Lymphozyten pro  $10^5\mu\text{m}^2$  Schleimhautfläche von Ferkeln der Probiotikagruppe (Gruppe 1, rechte Balken) und der Kontrollgruppe (Gruppe 2, linke Balken) zu unterschiedlichen Alterszeitpunkten mit Angabe der Streuungsmaße und Stichprobengrößen

### III. 2. 6 Detektion der CD25<sup>+</sup> Lymphozyten

CD25<sup>+</sup> Zellen waren zum 14. Lebenstag nur sehr spärlich im Darm aller Versuchstiere anzutreffen. Sie waren in der Hauptsache in der *Lamina propria mucosae* lokalisiert. Ihre Zahl stieg mit dem Alter an. Die wenigsten Zellen wurden am 14. Tag gezählt (0,56 Zellen/ $10^5\mu\text{m}^2$ ), die meisten Zellen (74,55 Zellen/ $10^5\mu\text{m}^2$ ) wurden am 56. Tag jeweils in der Kontrollgruppe gezählt. Wie bei der Erfassung der  $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten und der CD8<sup>+</sup> Lymphozyten zeigten sich auch hier signifikante Unterschiede am 35. Lebenstag der Ferkel. Im Mann-Whitney Test wurde für den Gruppenunterschied eine asymptotische Signifikanz von 0,05 ermittelt. Obwohl am 56. Tag die Zellzahl in der Versuchsgruppe mit dem Median von 27,29 Zellen/ $10^5\mu\text{m}^2$  deutlich höher lag als in der Kontrollgruppe mit 20,53 Zellen/ $10^5\mu\text{m}^2$ . Es ist dabei zu beachten, dass sich die Zahl von CD25<sup>+</sup> Zellen in der mit *B.*

*cereus* var. *toyoi* behandelten Ferkelgruppe vom 28. zum 35. Tag hin mehr als verdoppelte, während die Zunahme in der Kontrollgruppe vom 35. Tag zum 56. Tag hin besonders stark ausgeprägt war.

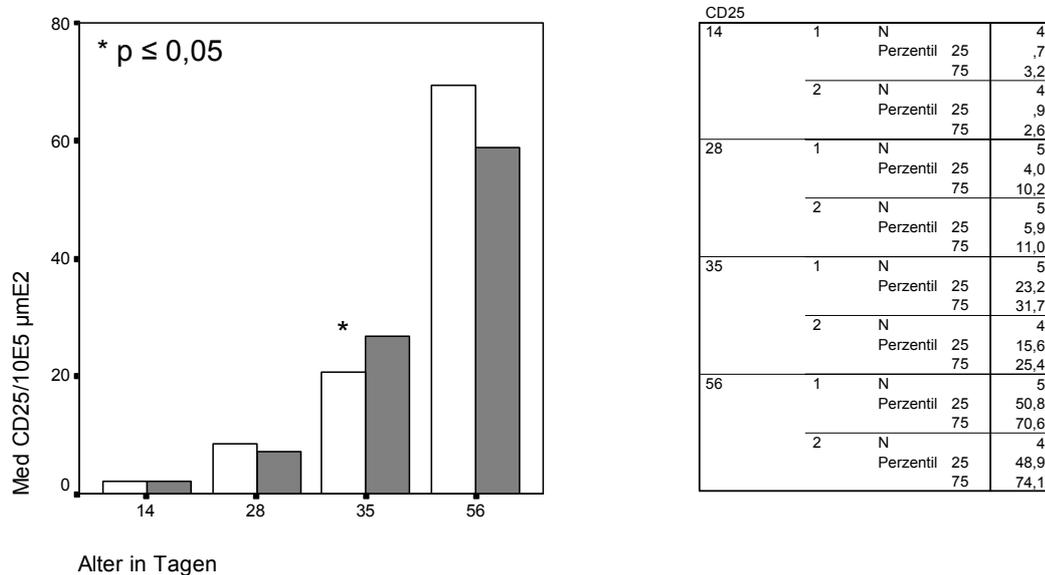


Abbildung 44: Anzahl der CD25<sup>+</sup> Lymphozyten pro 10<sup>5</sup>μm<sup>2</sup> Schleimhautfläche von Ferkeln der Probiotikagruppe (Gruppe 1, rechte Balken) und der Kontrollgruppe (Gruppe 2, linke Balken) zu unterschiedlichen Alterszeitpunkten mit Angabe der Streuungsmaße und Stichprobengrößen

### III. 2. 7 Detektion der CD21<sup>+</sup> Lymphozyten

B-Lymphozyten im Darm wurden mit einem Antikörper gegen CD21 erfasst. CD21<sup>+</sup> Zellen waren im proximalen Jejunum wenig vertreten. Ihre Anzahl reichte von 1,56 Zellen/10<sup>5</sup>μm<sup>2</sup> Schleimhautfläche am 14. Tag bis zu maximal 40,27 Zellen/10<sup>5</sup>μm<sup>2</sup> am 56. Tag in der probiotisch gefütterten Tiergruppe. Verglichen mit der Gesamtzahl von CD45<sup>+</sup> Zellen im proximalen Jejunum stellen CD21<sup>+</sup> B-Zellen einen sehr kleinen Anteil dar (< 6%). In der Hauptsache waren sie in der *Lamina propria mucosae* im Kryptbereich anzutreffen, während sie im Zottenbereich nahezu fehlten. Intraepithelial waren keine B-Lymphozyten zu finden. Die Zahl CD21<sup>+</sup> Lymphozyten nahm mit dem Alter zu. Zwischen den mit *B. cereus* var. *toyoi* behandelten Tieren und den Kontrolltieren waren weder in der Anzahl, noch in der Gewebelokalisation nennenswerte Unterschiede festzustellen.

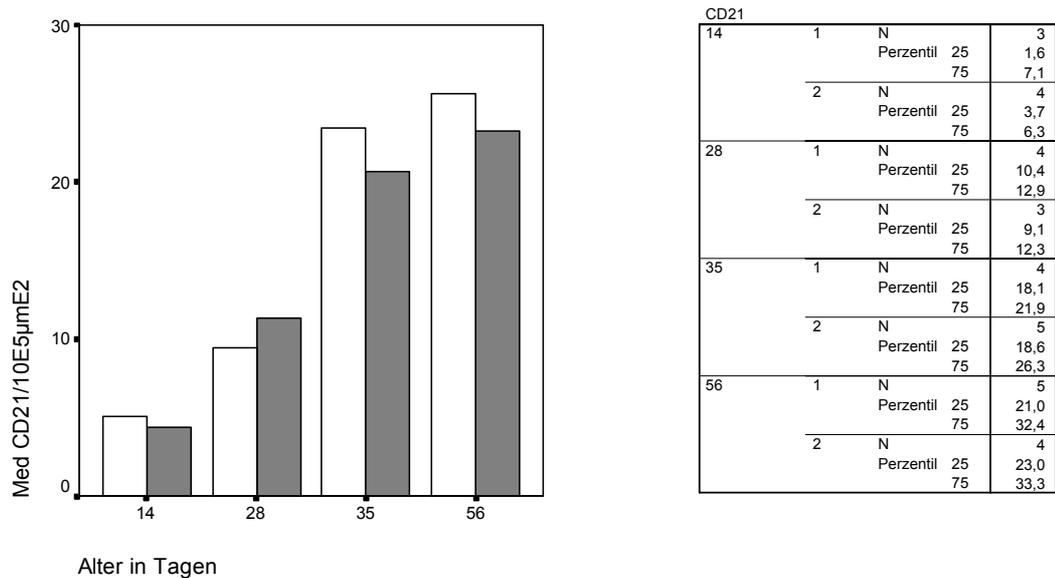


Abbildung 45: Anzahl der CD21<sup>+</sup> Lymphozyten pro 10<sup>5</sup>μm<sup>2</sup> Schleimhautfläche von Ferkeln der Probiotikagruppe (Gruppe 1, rechte Balken) und der Kontrollgruppe (Gruppe 2, linke Balken) zu unterschiedlichen Alterszeitpunkten mit Angabe der Streuungsmaße und Stichprobengrößen

### III. 2. 8 Detektion der CD11R1<sup>+</sup> Zellen

Der Antikörper gegen CD11R1 wurde eingesetzt, um porcine Eosinophile, Neutrophile und NK-Zellen zu erfassen. Nach Inkubation mit einem FITC-konjugierten Zweitantikörper konnten diese Zellen hauptsächlich in der *Lamina propria mucosae* des Kryptbereichs und in der Submukosa sichtbar gemacht werden. Ihre Gesamtzahl stieg mit dem Alter an, dabei war die Zunahme der Zellzahl besonders zwischen dem 14. und dem 28. Tag ausgeprägt. Die wenigsten Zellen mit 3,6/10<sup>5</sup>μm<sup>2</sup> wurden am 14. Tag in der Kontrollgruppe gezählt, die meisten Zellen waren in der Versuchsgruppe zu finden (42,82 Zellen/10<sup>5</sup>μm<sup>2</sup> am 56. Tag). In Verteilung und Lokalisation dieser Zellen unterschied sich die Kontrollgruppe nicht von der mit *B. cereus* var. *toyoi* behandelten Gruppe. In der Versuchsgruppe waren bis zum 35. Tag mehr Zellen zu zählen. Zum Ende des Beobachtungszeitraums am 56. Tag waren in der Kontrollgruppe geringgradig mehr Zellen zu zählen.

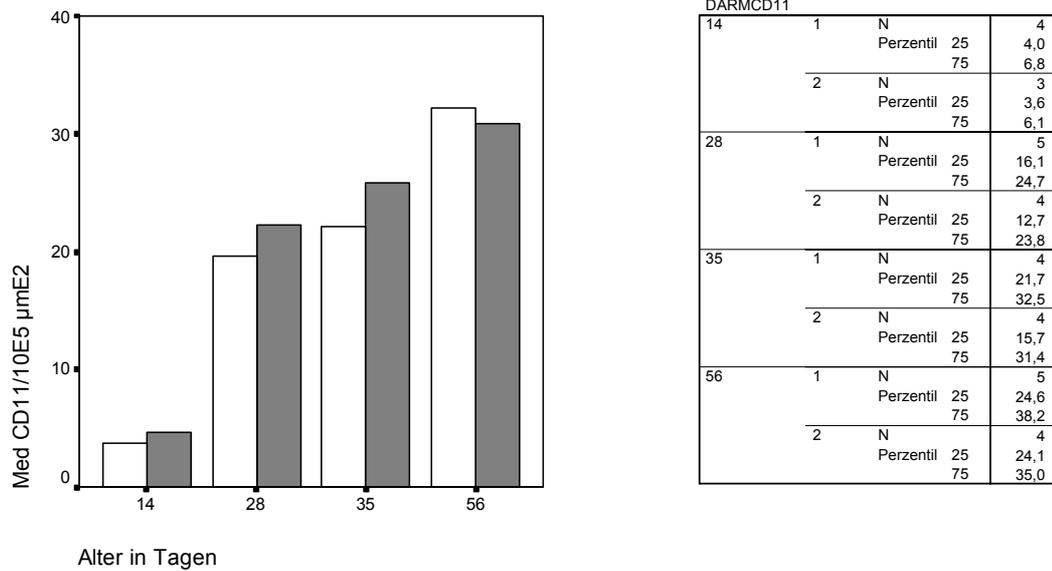


Abbildung 46: Anzahl der CD11R1<sup>+</sup> Lymphozyten pro 10<sup>5</sup>μm<sup>2</sup> Schleimhautfläche von Ferkeln der Probiotikagruppe (Gruppe 1, rechte Balken) und der Kontrollgruppe (Gruppe 2, linke Balken) zu unterschiedlichen Alterszeitpunkten mit Angabe der Streuungsmaße und Stichprobengrößen

### III. 2.9 Vergleichende Immunfluoreszenzfärbungen

Im Folgenden werden die durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen exemplarisch für jede Zellpopulation abgebildet. Alle Gewebeschnitte wurden mit dem fluorochrom-konjugierten (FITC, PE) Antikörper gegen ein Lymphozytenantigen und mit einem fluoreszierenden Kernfarbstoff (DAPI) behandelt, um gefärbte Zellen im Gewebeverband ortsrichtig zu lokalisieren. Beide Ansichten sind deswegen gegenübergestellt. Die zugrundeliegenden morphometrischen Kriterien sind in Kapitel II.2.6.3 erläutert. Abbildung A zeigt zunächst die Vorgehensweise am Beispiel der Quantifizierung von CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten mittels Verwendung PE-konjugierter Sekundärantikörper. In Abbildung B ist dasselbe Verfahren zur Erfassung von CD11R1<sup>+</sup> Zellen mittels Verwendung FITC-konjugierter Sekundärantikörper dargestellt.

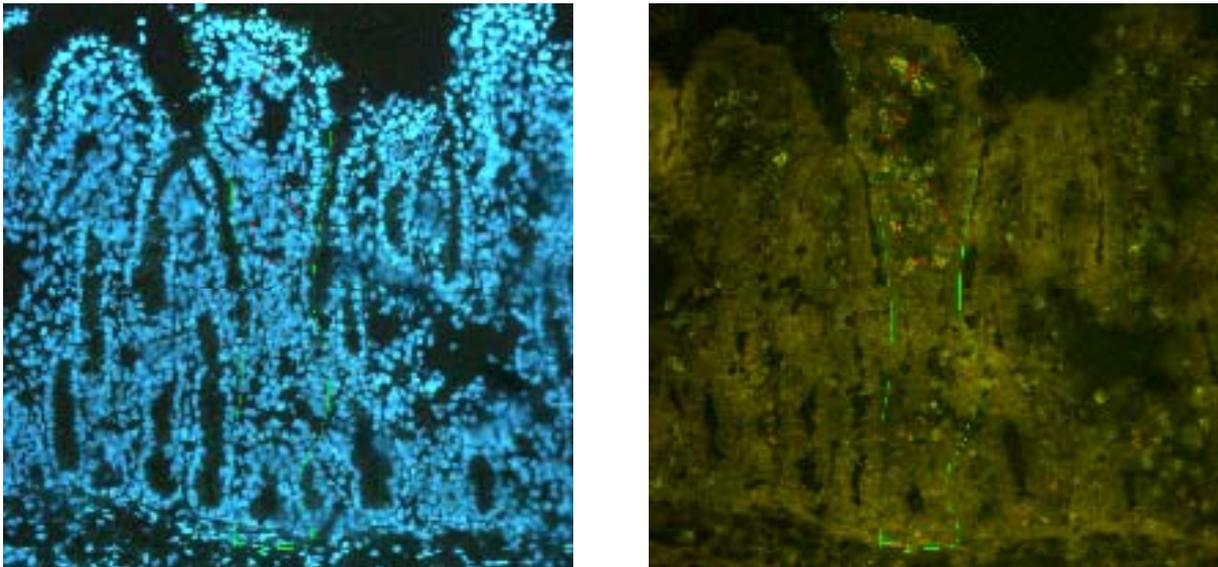


Abbildung A: Detektion von  $CD3^+$  Lymphozyten mittels Verwendung PE-konjugierter Antikörper

Links: DAPI-Ansicht mit Darstellung des Messrahmens; Rechts: PE-Ansicht derselben Lokalisation mit Darstellung des Messrahmens und Markierung positiver Zellen

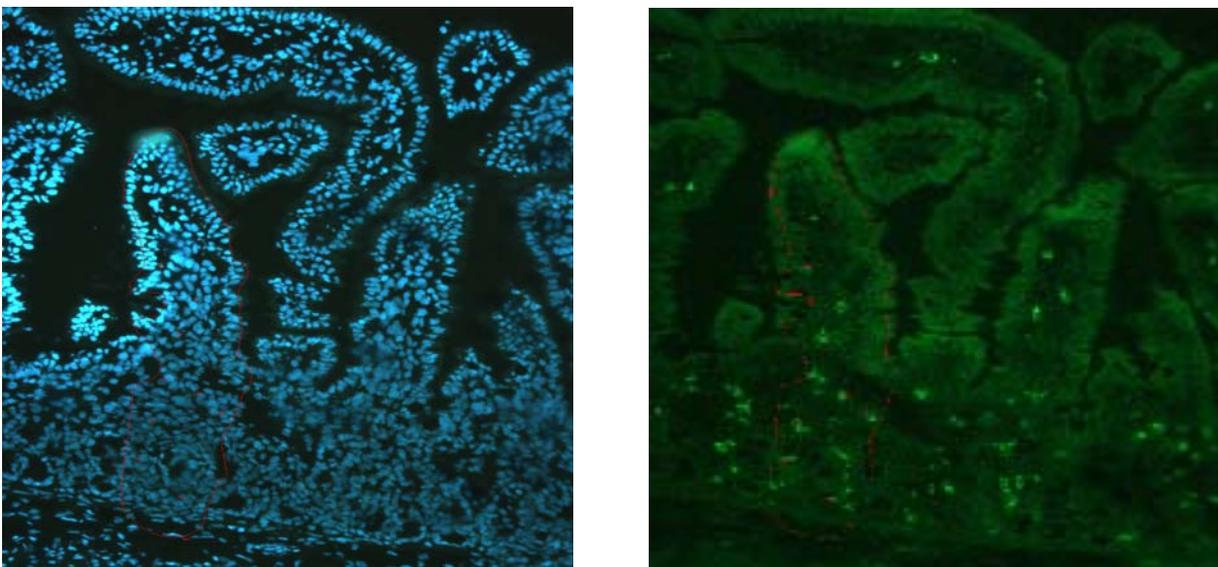


Abbildung B: Detektion von  $CD11R1^+$  Zellen mittels Verwendung FITC-konjugierter Sekundärantikörper

Links: DAPI-Ansicht mit Darstellung des Messrahmens; Rechts: FITC-Ansicht derselben Lokalisation mit Darstellung des Messrahmens und Markierung positiver Zellen

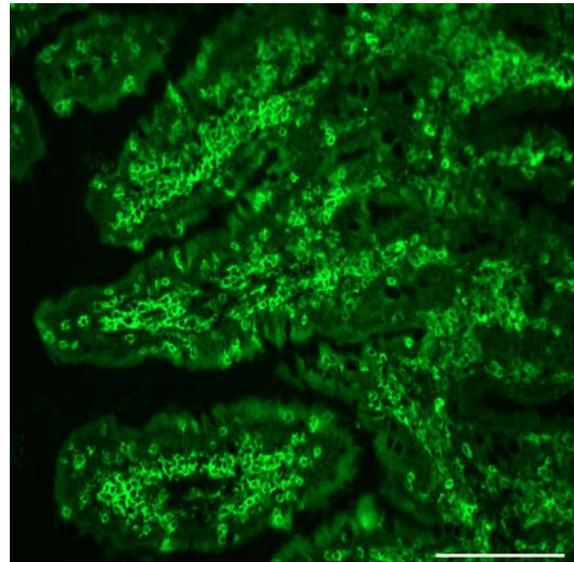
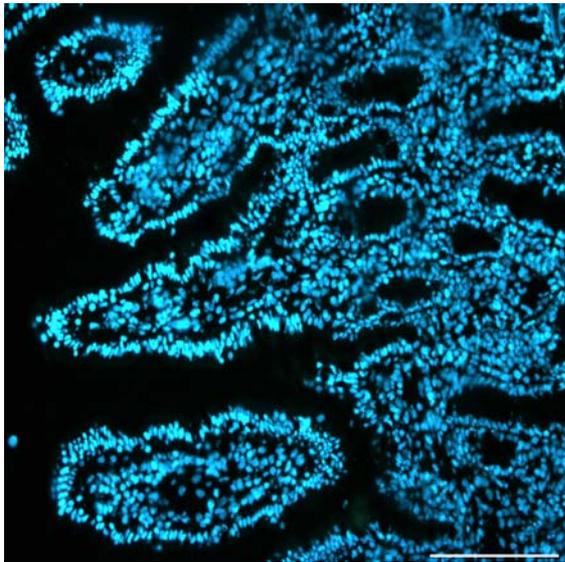
**Abbildung 47:** Vergleichende Darstellung der **CD45<sup>+</sup> Lymphozyten** im proximalen Jejunum (Eichstrich = 100µm), 35. Lebenstag

Links: Anfärbung der Zellkerne mit DAPI

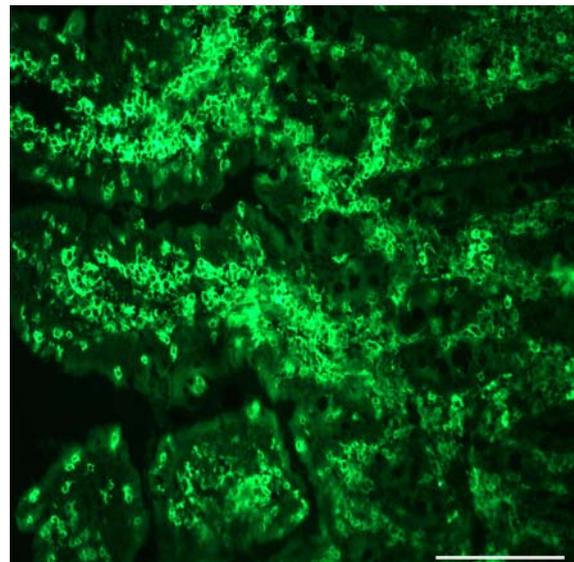
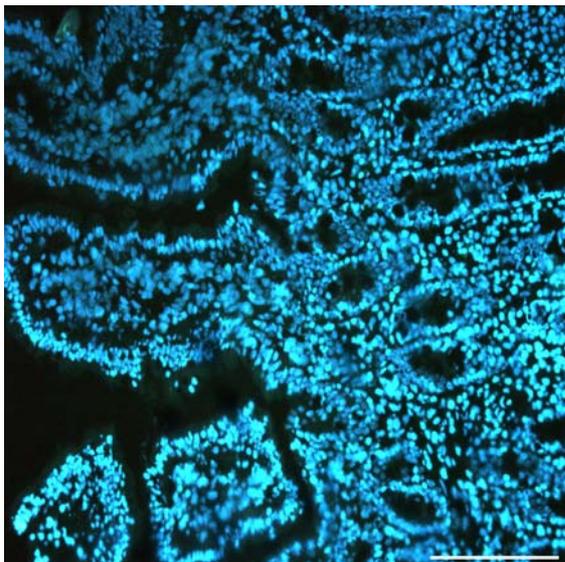
Rechts: Anfärbung der CD45<sup>+</sup> Zellen mit FITC-konjugierten Antikörpern

CD45<sup>+</sup> Lymphozyten waren gehäuft subepithelial und in der *Lamina propria mucosae* zu finden. Zwischen den Fütterungsgruppen waren wenige Unterschiede zu erkennen (siehe hierzu Kapitel III. 2, Abbildung 38).

**A. Mit *B. cereus* var. *toyoi* behandeltes Tier**



**B. Unbehandeltes Kontrolltier**



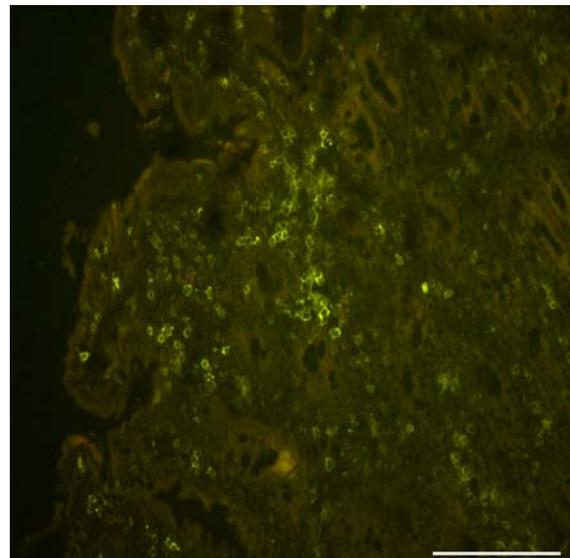
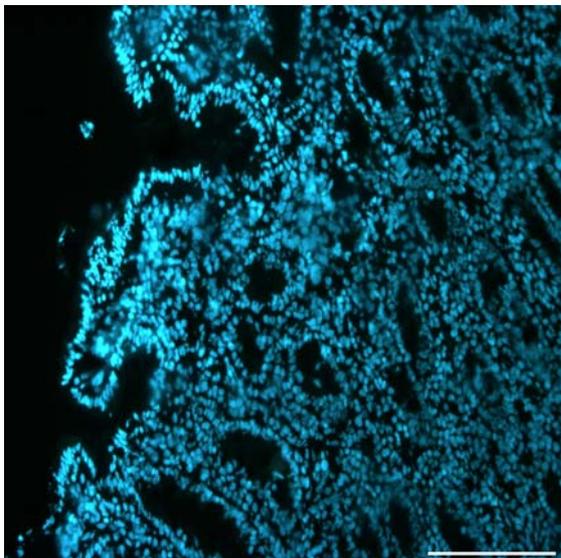
**Abbildung 48:** Vergleichende Darstellung der **CD3<sup>+</sup> Lymphozyten** im proximalen Jejunum (Eichstrich = 100µm), 35. Lebenstag

Links: Anfärbung der Zellkerne mit DAPI

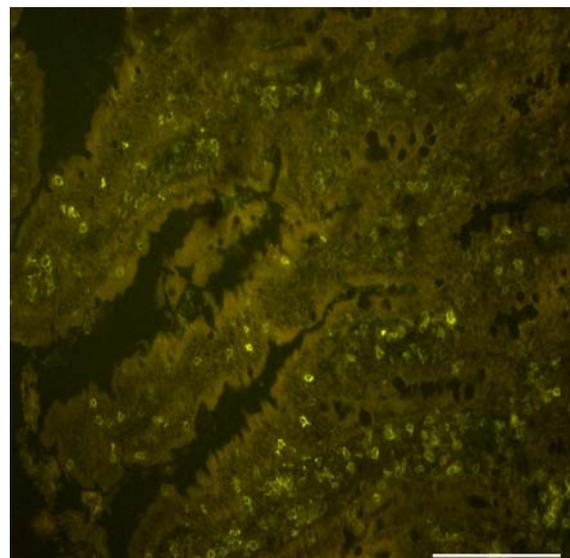
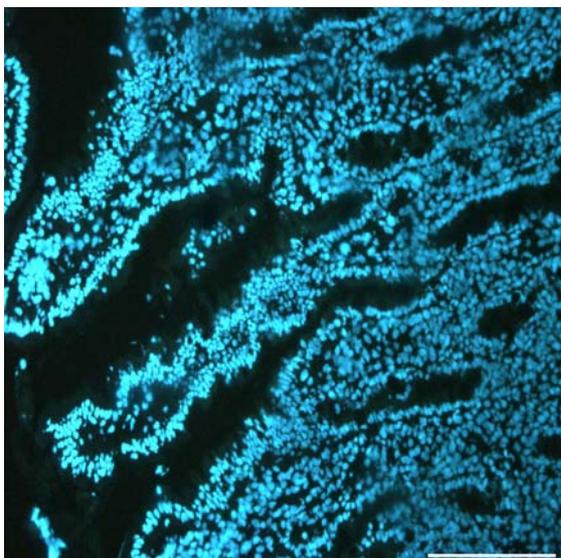
Rechts: Anfärbung der CD3<sup>+</sup> Zellen mit PE-konjugierten Antikörpern

CD3<sup>+</sup> Lymphozyten waren im Epithel und in der *Lamina propria mucosae* zu finden. In der probiotisch behandelten Gruppe waren geringgradig mehr Zellen zu zählen als in der Kontrollgruppe (siehe hierzu Kapitel III. 2, Abbildung 39).

**A. Mit *B. cereus* var. *toyoi* behandeltes Tier**



**B. Unbehandeltes Kontrolltier**



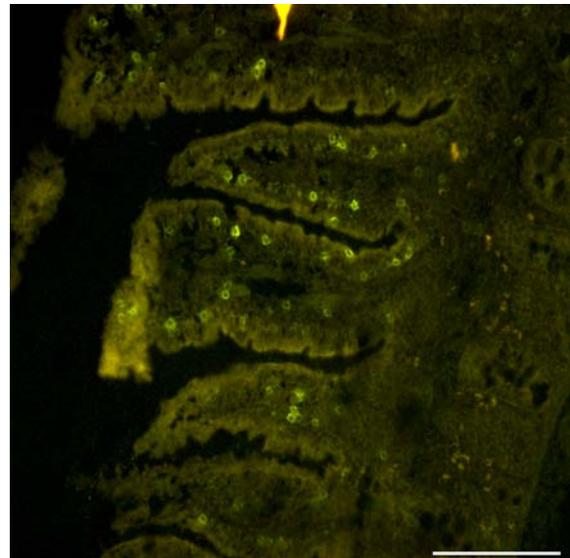
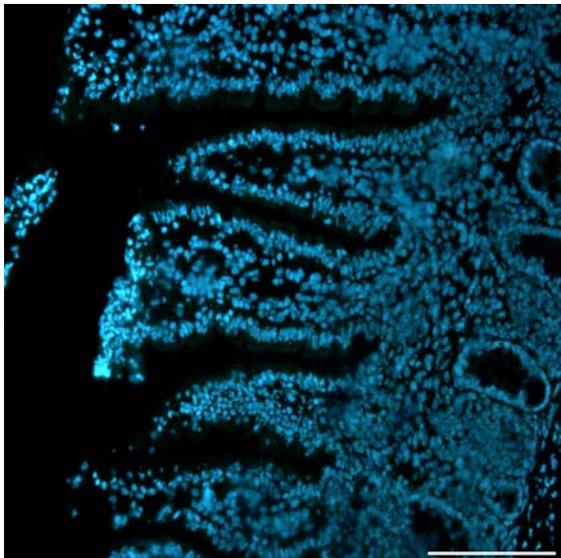
**Abbildung 49:** Vergleichende Darstellung der **CD4<sup>+</sup> Lymphozyten** im proximalen Jejunum (Eichstrich = 100µm), 14. Lebenstag

Links: Anfärbung der Zellkerne mit DAPI

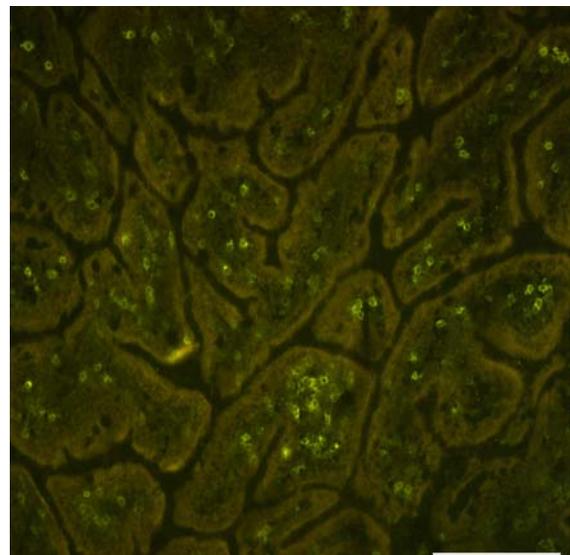
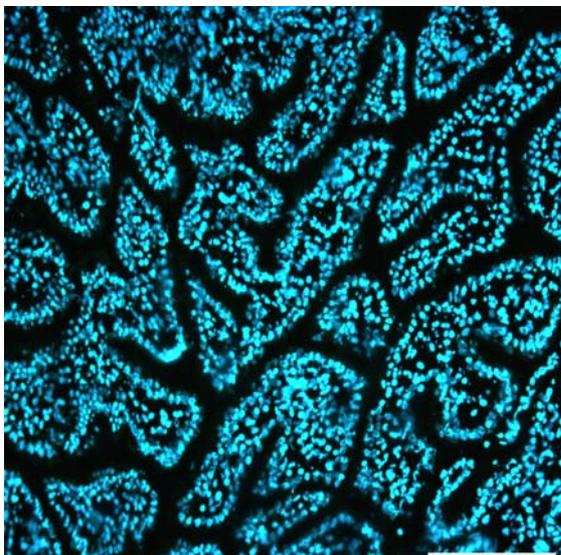
Rechts: Anfärbung der CD4<sup>+</sup> Zellen mit PE-konjugierten Antikörpern

CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten waren hauptsächlich im Zottenbereich lokalisiert. Intraepithelial konnten keine Zellen nachgewiesen werden, die meisten Zellen waren direkt subepithelial zu finden. Es waren nur geringe Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen zu beobachten (siehe hierzu Kapitel III. 2, Abbildung 40).

**A. Mit *B. cereus* var. *toyoi* behandeltes Tier**



**B. Unbehandeltes Kontrolltier**



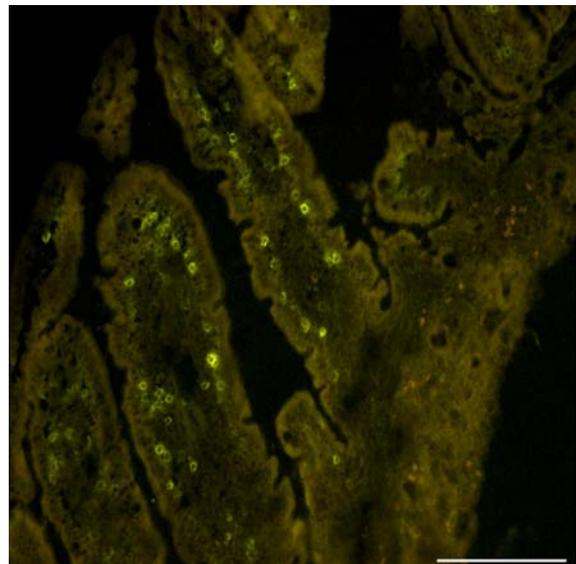
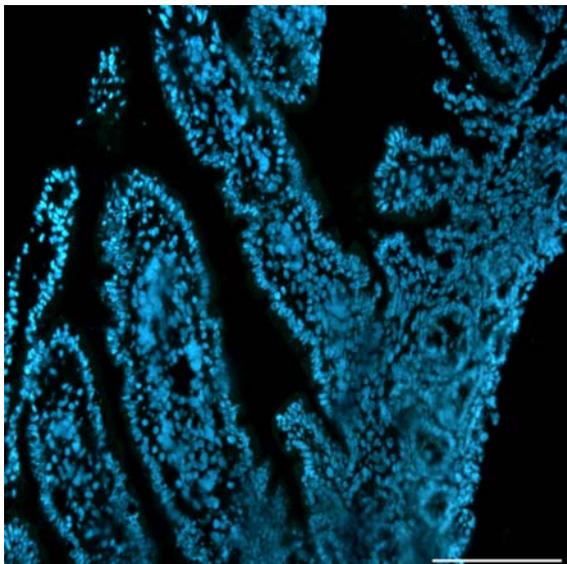
**Abbildung 50:** Vergleichende Darstellung der **CD8<sup>+</sup> Lymphozyten** im proximalen Jejunum (Eichstrich = 100µm), 14. Lebenstag

Links: Anfärbung der Zellkerne mit DAPI

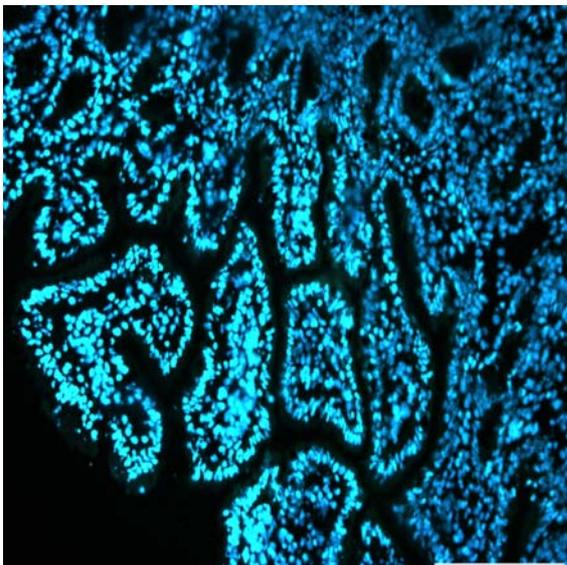
Rechts: Anfärbung der CD8<sup>+</sup> Zellen mit PE-konjugierten Antikörpern

CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten waren überwiegend intraepithelial lokalisiert. Es waren mehr CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten in der Versuchsgruppe zu finden als in der Kontrollgruppe (siehe hierzu Kapitel III. 2, Abbildung 41).

**A. Mit *B. cereus* var. *toyoi* behandeltes Tier**



**B. Unbehandeltes Kontrolltier**



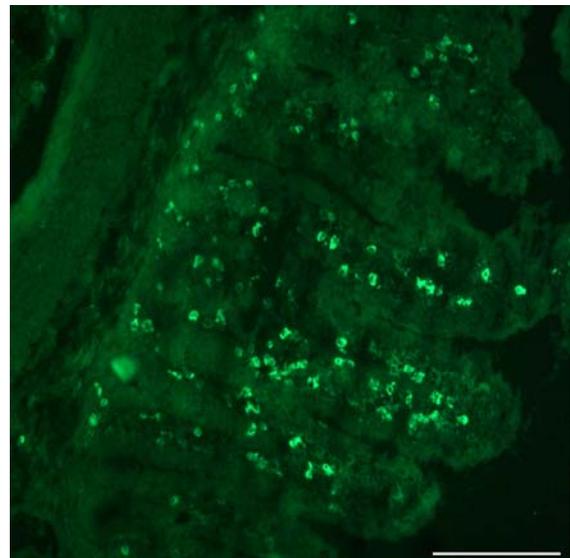
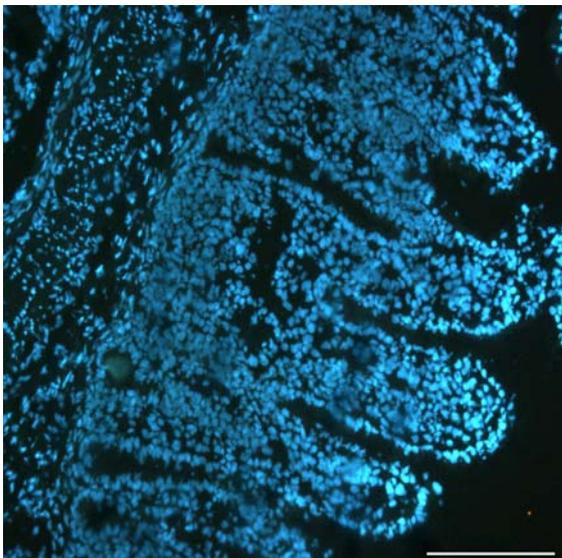
**Abbildung 51:** Vergleichende Darstellung der  $\gamma\delta$  -T-Lymphozyten im proximalen Jejunum (Eichstrich = 100 $\mu$ m), 35. Lebenstag

Links: Anfärbung der Zellkerne mit DAPI

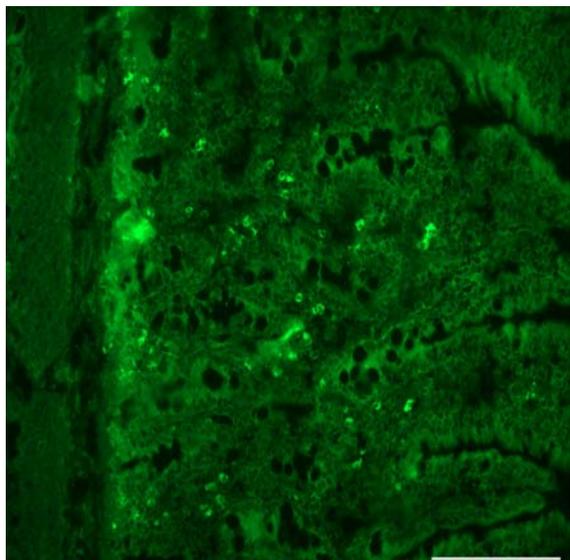
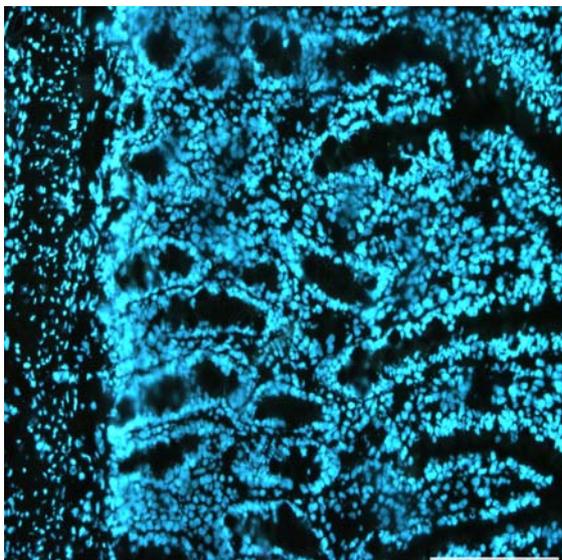
Rechts: Anfärbung der  $\gamma\delta^+$  Zellen mit FITC-konjugierten Antikörpern

$\gamma\delta$ -T-Lymphozyten waren in der *Lamina propria mucosae* zu finden. Die Versuchstiere wiesen mehr  $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten auf als die Tiere der Kontrollgruppe (siehe hierzu Kapitel III. 2, Abbildung 43).

**A. Mit *B. cereus* var. *toyoi* behandeltes Tier**



**B. Unbehandeltes Kontrolltier**



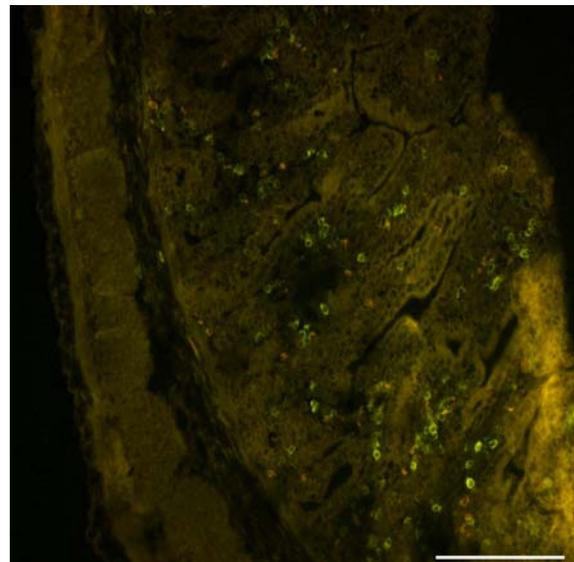
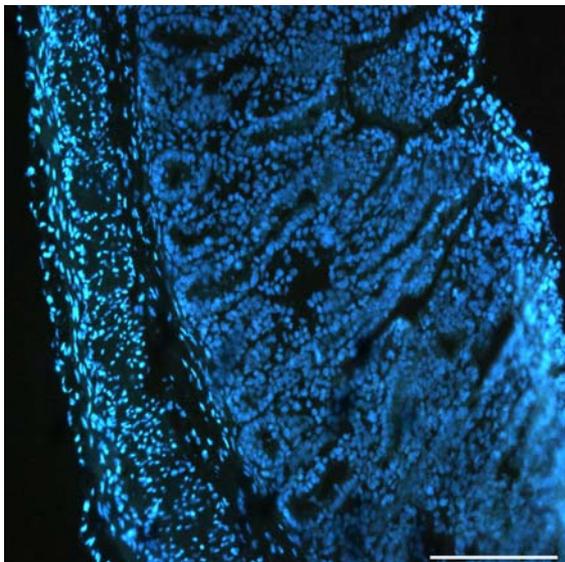
**Abbildung 52:** Vergleichende Darstellung der **CD25<sup>+</sup> Lymphozyten** im proximalen Jejunum (Eichstrich = 100µm), 35. Lebenstag

Links: Anfärbung der Zellkerne mit DAPI

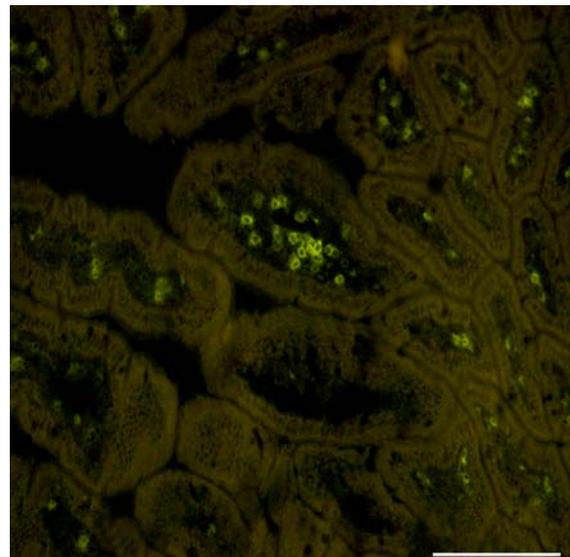
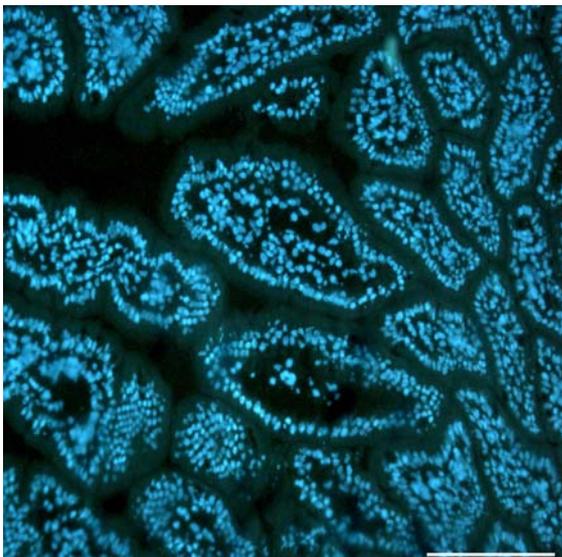
Rechts: Anfärbung der CD25<sup>+</sup> Zellen mit PE-konjugierten Antikörpern

CD25<sup>+</sup> Lymphozyten waren in der Hauptsache in der *Lamina propria mucosae* lokalisiert. Die Versuchstiere wiesen mehr CD25<sup>+</sup> Lymphozyten auf als die Tiere der Kontrollgruppe (siehe hierzu Kapitel III. 2, Abbildung 44).

**A. Mit *B. cereus* var. *toyoi* behandeltes Tier**



**B. Unbehandeltes Kontrolltier**



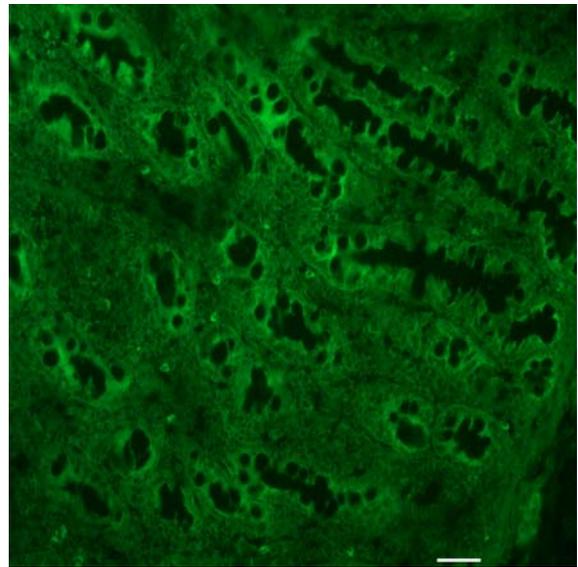
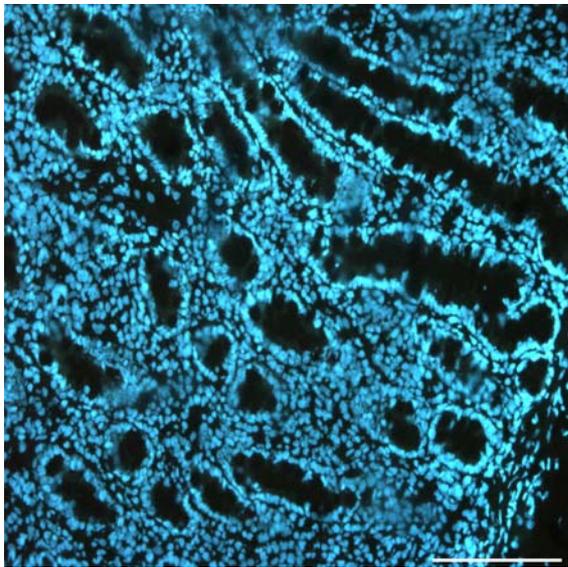
**Abbildung 53:** Vergleichende Darstellung der **CD21<sup>+</sup> Lymphozyten** im proximalen Jejunum (Eichstrich = 100µm), 28. Lebenstag

Links: Anfärbung der Zellkerne mit DAPI

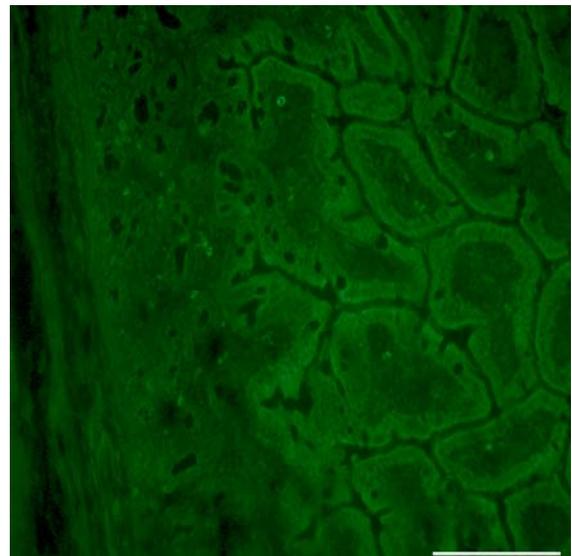
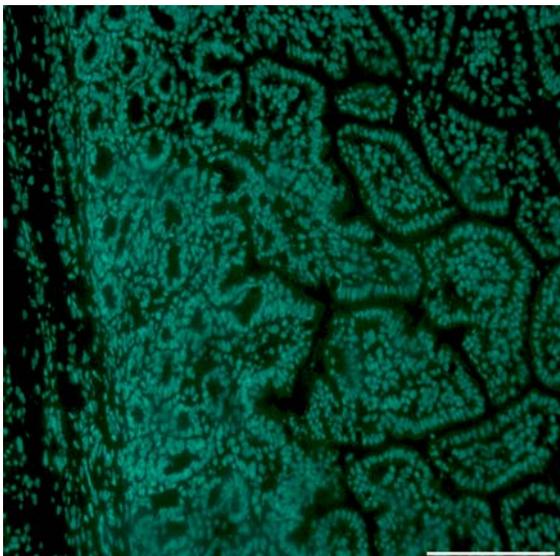
Rechts: Anfärbung der CD21<sup>+</sup> Zellen mit FITC-konjugierten Antikörpern

CD21<sup>+</sup> Zellen waren im proximalen Jejunum wenig vertreten. Vereinzelt waren sie in der *Lamina propria mucosae* im Kryptbereich anzutreffen. Zwischen den mit *B. cereus var. Toyoi* behandelten Tieren und den Kontrolltieren waren keine Unterschiede festzustellen (siehe hierzu Kapitel III. 2, Abbildung 45).

**A. Mit *B. cereus var. toyoi* behandeltes Tier**



**B. Unbehandeltes Kontrolltier**



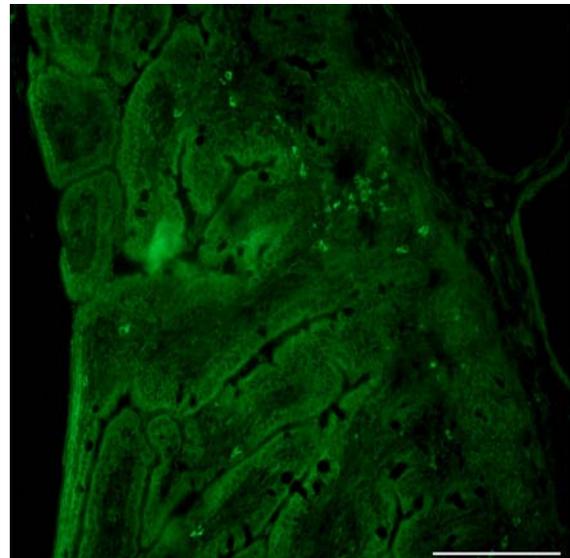
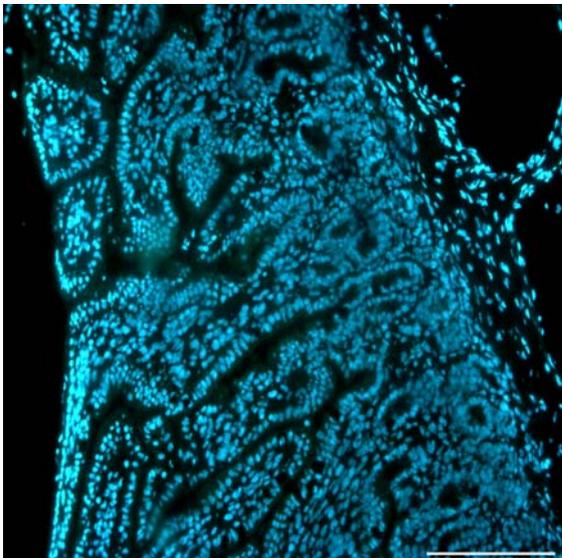
**Abbildung 54:** Vergleichende Darstellung der **CD11R1<sup>+</sup> Zellen** im proximalen Jejunum (Eichstrich = 100µm), 14. Lebenstag

Links: Anfärbung der Zellkerne mit DAPI

Rechts: Anfärbung der CD11<sup>+</sup> Zellen mit FITC-konjugierten Antikörpern

Diese Zellen konnten hauptsächlich in der *Lamina propria mucosae* des Kryptbereichs und in der Submukosa sichtbar gemacht werden. In Verteilung und Lokalisation unterschied sich die Kontrollgruppe nicht von der mit *B. cereus var. Toyoi* behandelten Gruppe (siehe hierzu Kapitel III. 2, Abbildung 46).

**A. Mit *B. cereus var. toyoi* behandeltes Tier**



**B. Unbehandeltes Kontrolltier**

