

IV. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss eines probiotischen Bakteriums auf die zelluläre Immunität gesunder Ferkel untersucht werden. Dabei war insbesondere von Interesse, welche Auswirkungen eine probiotisch supplementierte Fütterung auf die Zusammensetzung und Entwicklung von Lymphozytenpopulationen zeigt. Als Probiotikum wurde der Sporenbildner *Bacillus cereus* var. *toyoi* eingesetzt, der unter dem Namen „Toyocerin“ kommerziell erhältlich ist. Ein Probiotikum wird nach FULLER (1992) definiert als „ein lebende(r) mikrobielle(r) Futterzusatz, der eine vorteilhafte Wirkung auf das Wirtstier hat, indem er das intestinale Gleichgewicht verbessert“. Zu der Gruppe der Probiotika zählt man verschiedene Mikroorganismen, die direkt auf den Wirtsorganismus einwirken können oder in Wechselwirkung mit der darmeigenen Flora treten. Die zugrunde liegenden Wirkmechanismen sind bisher nicht systematisch untersucht worden. Man nimmt jedoch an, dass es verschiedene Mechanismen gibt, die je nach Menge und Art des eingesetzten Probiotikums differieren können. Auch der Immunstatus des Wirtes und der Zeitpunkt bzw. -rahmen der Applikation spielen eine Rolle. Für einige Probiotika konnte die Modulation der Immunantwort nachgewiesen werden (ISOLAURI et al., 2001; KATO et al., 1984; PERDIGON et al., 1988; PERDIGON et al., 1995; SCHIFFRIN et al., 1994; DE SIMONE et al., 1986). In der Literatur sind jedoch zum Teil widersprüchliche Studienergebnisse dokumentiert, die bislang keine allgemeingültigen Aussagen über die Wirkung von Probiotika auf das Immunsystem zulassen. Es ist hingegen bewiesen, dass Mikroorganismen im Darm die Entwicklung und Reaktivität des lokalen Immunsystems beeinflussen. Neben dieser Einflussnahme spielen weitere Faktoren eine Rolle bei der Ausgestaltung einer Immunantwort.

Um den Einfluss anderer Faktoren (Stallhygiene, klimatische Bedingungen, Keimbelastung) auf die Entwicklung des Immunsystems gering zu halten, beziehungsweise für alle Versuchstiere gleich zu gestalten, wurden für diese Arbeit zwei Tiergruppen verglichen, die zwar räumlich voneinander getrennt gehalten wurden, die aber vor und während des gesamten Beobachtungszeitraumes den gleichen Haltungsbedingungen unterworfen waren. Es wurden Saug- und Absatzferkel bis zum 56. Lebenstag untersucht, da die wirtschaftlichen Verluste in dieser Gruppe am höchsten sind. In der Ferkelaufzucht beträgt die Mortalität in den ersten sechs Lebenswochen bis zu 20%. Etwa die Hälfte der Todesfälle sind dabei auf infektionsbedingte Durchfälle zurückzuführen (HOEFLING, 1989). Ab dem 14. Lebenstag wurde den Versuchsferkeln Beifutter angeboten, das *B. cereus* var. *toyoi* Sporen enthielt. Nach dem Absetzen am 28. Tag erhielt die Versuchsgruppe mit dem Probiotikum supplementiertes Futter. Die Dauer und Art der Probiotikafütterung wurde so gewählt, dass

eine nachweisbare Menge an Keimen den Darm erreichten und das Fütterungsregime auf die Gegebenheiten der Ferkelaufzucht *in praxi* übertragbar sind.

Es wurden sowohl Blutproben als auch Proben aus dem Jejunum untersucht, um Aussagen über Auswirkungen auf die systemische Immunantwort und auf die Immunantwort im Darm treffen zu können und miteinander zu vergleichen. Dabei wurden periphere Blutmononukleäre Zellen (PBMCs) durchflusszytometrisch analysiert, indem Lymphozytenpopulationen mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper voneinander unterschieden wurden. Die Durchflusszytometrie wurde darüber hinaus mit dem Ziel eingesetzt, weitere Aspekte der Immunantwort anhand der produzierten Zytokine genauer zu charakterisieren. Es wurden deswegen IFN- γ produzierende Zellen mit einem Antikörper gegen intrazelluläres IFN- γ detektiert.

Von standardisierten Lokalisationen des proximalen Jejunums wurden Gefrierschnitte hergestellt und die absoluten Zellzahlen mit immunhistologischen Methoden ermittelt. Die so erhobenen Zellzahlen lassen einen Vergleich zwischen unbehandelter Kontrollgruppe und mit *B. cereus* var. *toyo*i behandelter Versuchsgruppe zu, sie dienen nur bedingt dem Vergleich mit absoluten Zellzahlen anderer Autoren.

Zur Untersuchung wurden Antikörper gegen Oberflächenantigene herangezogen, die als Zellmarker verschiedene Lymphozytenpopulationen repräsentieren. Zum Einsatz kamen Antikörper gegen CD45, das von allen Leukozyten exprimiert wird (ZUCKERMANN et al., 2001) sowie gegen CD3 als T-Lymphozytenmarker und CD21, welches auf B-Lymphozyten und follikulär-dendritischen Zellen zu finden ist (PESCOVITZ et al., 1998; DENHAM et al., 1998). Die weitergehende Differenzierung in T-Helferzellen und T-Zytotoxische Zellen erfolgte über die Detektion mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 (PESCOVITZ et al., 1984; JONJIC et al., 1984). $\gamma\delta$ -T- Lymphozyten wurden mit einem Antikörper gegen den $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor erfasst (HAVERSON et al., 2001). Zur Darstellung von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, sowie Natural Killer Zellen wurde ein Anti-CD11R1 Antikörper verwendet (HAVERSON et al., 1994). Mit der Messung CD14⁺ Zellen im Blut wurde auch der monozytäre Anteil an PBMCs miteinbezogen (HAVERSON et al., 1994). Einen Hinweis auf die Menge aktivierter Darmlymphozyten nach Probiotikagabe gibt die Quantifizierung von CD25⁺ Lymphozyten, die deswegen mit dem entsprechenden Antikörper nachgewiesen wurden (BAILEY et al., 1992).

Im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe konnte bei den mit *B. cereus* var. *toyo*i gefütterten Ferkeln Veränderungen der zellulären Bestandteile des Immunsystems beobachtet werden, die im Folgenden diskutiert werden sollen.

Bei den Lymphozyten des Darmes konnte eine stetige Zunahme der Zellzahlen mit dem Alter in beiden Fütterungsgruppen beobachtet werden. Hinsichtlich der Menge und Lokalisation von Lymphozyten im Darm entsprachen die erhobenen Daten den Befunden aus der Literatur (BRANDTZAEG, 1989; LEONHARD, 1990; ROBIJN et al., 1995; VEGA-LOPEZ et al., 2001). Im Epithel dominierten CD8⁺ Lymphozyten neben wenigen $\gamma\delta$ -T Zellen, während die Lymphozyten der *Lamina propria mucosae* sich hauptsächlich aus CD4⁺ Lymphozyten und $\gamma\delta$ -T Zellen und zu einem geringen Anteil aus CD21⁺ und CD11⁺ Zellen zusammensetzten.

Die größten Unterschiede zwischen unbehandelter Kontrollgruppe und mit *B. cereus* var. *toyoi* gefütterten Ferkeln wurden am 35. Lebenstag beobachtet. Da die Versuchstiere am 28. Tag abgesetzt wurden, konnten eventuelle Reaktionen darauf am 35. Tag erfasst werden. Absetzbedingte Veränderungen von Immunzellen im Darm wurden von SOLANO-AGUILAR und Mitarbeitern (2001) beschrieben, demnach kam es zu einer Abnahme von CD4⁺ Zellen in den Peyer'schen Plaques, einer Verringerung der CD8⁺ Zellen im Darmepithel und der CD172a⁺ Zellen (Monozyten und Granulozyten) in den Peyer'schen Plaques sowie der *Lamina propria mucosae* von Ferkeln nach dem Absetzen. Zu anderen Ergebnissen kam MCCRACKEN und Mitarbeiter (1999). Sie beobachteten eine Zunahme der T-Lymphozyten im Dünndarm von Ferkeln und interpretierten dies im Rahmen eines Entzündungsgeschehens.

Solche, ausschließlich auf das Absetzen zurückzuführenden Zellzahlveränderungen im Darm konnten in dieser histologischen Untersuchung nicht bestätigt werden (Veränderungen der Blutlymphozyten siehe unten), da die Zellzahl in allen Lymphozytenpopulationen vom 14. bis zum 56. Lebenstag zunahm, ohne außergewöhnliche Abweichungen von dieser Entwicklung zu zeigen. Es konnte aber belegt werden, dass am 35. Tag signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen bestanden.

Die Anzahl der CD8⁺ intraepithelialen Lymphozyten, $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten und CD25⁺ Zellen waren an diesem Tag in der probiotisch behandelten Tiergruppe deutlich höher als in der Kontrollgruppe (siehe Abbildungen 41, 43 und 44 in Kapitel III.2). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die probiotisch behandelten Tiere in einer anderen Weise auf das Absetzen reagierten oder in anderem Maße geschützt waren. Der mit dem Absetzprozess einhergehende Stress kann sich in vielerlei Arten auf das Immunsystem auswirken. Die Aktivierung von T-Zellen durch das Absetzen könnte in dem starken Anstieg von CD25⁺ Lymphozyten nach dem 28. Tag zum Teil widergespiegelt sein.

CD25⁺ Lymphozyten waren bei den Versuchstieren bis zum 28. Tag nur sehr spärlich nachzuweisen und ihr Anteil an T-Lymphozyten der *Lamina propria mucosae* stieg erst am 35. Tag auf ca. 10% (Relation zu CD3⁺ Lymphozyten) an. Der IL-2 Rezeptor CD25 wurde in der vorliegenden Arbeit als Marker für aktivierte Lymphozyten herangezogen (TANIGUCHI und MINAMI, 1993), es konnte jedoch nicht weitergehend differenziert werden, ob diese aktivierten Lymphozyten ausschließlich CD4⁺ Lymphozyten waren oder ob noch andere Lymphozytenfraktionen (z. B. $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten) in der Zählung erfasst wurden, da keine Doppelfärbungen durchgeführt wurden. Die Anzahl an CD4⁺ Zellen stieg allerdings gleichzeitig mit CD25⁺ Zellen absolut und in der gleichen Lokalisation an (siehe Abbildungen 40 und 44). Daher ist es wahrscheinlich, dass ein großer Teil der CD25⁺ Zellen zu den CD4⁺ Lymphozyten gezählt werden kann.

Die zunehmende Anzahl von CD25⁺ Zellen im Darm spricht auch für eine zunehmende Auseinandersetzung des intestinalen Immunsystems mit Antigenen. Der durch *B. cereus* var. *toyoi* ausgelöste antigene Stimulus könnte daher mitverantwortlich für die höhere Anzahl CD25⁺ Zellen in der probiotisch behandelten Gruppe sein.

In der Gruppe der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten kam es ebenfalls zu einer deutlichen Zunahme der Zellzahl in der probiotisch behandelten Tiergruppe. Am 35. Tag waren signifikant mehr $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten in der *Lamina propria mucosae* und im Darmepithel der Versuchsgruppe zu finden. Dies deutet auf eine Aktivierung der zellulären Immunität, bzw. auf eine lokale Stress-Reaktion hin. Über die Funktion der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten herrscht bisher noch Unklarheit, es wird angenommen, dass diese T-Zellsubpopulation auf mikrobielle Antigene reagieren und auf „Stress-Antigene“, die von infizierten oder transformierten (Epithel-) Zellen exprimiert werden (HAYDAY, 2000). Zu diesen Stressmarkern zählt man bestimmte Homologe der MHC-Moleküle (MICA, MICB), die von Darmepithelzellen und epithelialen Tumorzellen exprimiert werden (GROH et al., 2001). $\gamma\delta$ -T-Zellen besitzen spezielle Rezeptoren für MICA und werden durch die Bindung aktiviert (BAUER et al., 1999; GROH et al., 2001). $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten sind zur Produktion von IFN- γ fähig und besitzen zytolytische Eigenschaften (KAGNOFF, 1993), so dass ihnen darüber hinaus eine Rolle bei der mukosalen zellmedierten Immunität zugeschrieben wird und sie als Bindeglied zwischen unspezifischer und spezifischer Immunantwort angesehen werden können. Auch bei der Entwicklung der oralen Toleranz sind $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten wahrscheinlich beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass die Produktion von sekretorischem IgA und IL-10 bei $\gamma\delta$ knock-out Mäusen, die mit Ovalbumin oral immunisiert wurden, deutlich geringer war, als bei Mäusen, die den $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor exprimierten (FUJIHASHI et al., 1999).

Die erhöhte Anzahl dieser Lymphozytenpopulation in der probiotisch behandelten Gruppe könnte daher zu einem verbesserten Schleimhautschutz und zu einer verbesserten Epithelregeneration beitragen. Andererseits ist nicht ausgeschlossen, dass die erhöhte Anzahl von $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten im Darm eine Reaktion auf die Verabreichung oraler Antigene darstellt (im Sinne der Toleranzentwicklung) oder auf die stärkere Expressierung von „Stress-Antigenen“ im Darm der Versuchstiere hinweist.

Der Anteil von $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten an PBMCs nahm in der probiotisch behandelten Gruppe mit dem Alter zu. Die Zunahme mit dem Alter wurde in der unbehandelten Kontrollgruppe nicht beobachtet (siehe Abbildung 27 in Kapitel III.1). Insgesamt war der Anteil der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten an PBMCs größer als der Anteil $CD4^+$ Lymphozyten an PBMCs. Der Anteil der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten an PBMCs schwankte zwischen 7,3 und 21,4% und war damit größer als die Werte in anderen Spezies. Dieses Bild spiegelt die Ergebnisse anderer Autoren wider (YANG und PARKHOUSE, 1996). Unklar bleibt, ob es sich bei den peripheren $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten um eine andere thymus-generierte funktionell unterschiedliche Subpopulation handelt als bei $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten in der Mukosa (HAAS et al., 1993) oder ob es sich, nach THIELKE und Mitarbeitern (2003), bei peripheren $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten um rasch rezirkulierende intestinale $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten handelt. Gemeinsam ist ihnen die Fähigkeit bakterielle Antigene direkt zu erkennen, ohne die MHC-abhängige Antigenpräsentation zu benötigen (WILLIAMS, 1998). In der probiotisch behandelten Gruppe könnte es daher zu einer stärkeren Ausbildung einer frühen $\gamma\delta$ -T-zellmedierten Abwehr kommen und zu einer stärkeren Aktivierung von $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten durch $\gamma\delta$ -T-Zelllymphokine.

Im Epithel des Jejunums beider Fütterungsgruppen war eine deutliche Zunahme der Lymphozytenzahlen mit dem Alter zu beobachten. Dabei handelte es sich in erster Linie um $CD8^+$ Lymphozyten. Neben diesen wurden in geringerer Zahl auch $CD25^+$ und $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten im Epithel nachgewiesen. $CD8^+$ Lymphozyten im Epithel exprimieren jedoch kein $CD25$ nach Aktivierung (WANG et al., 2002), so dass es sich bei den $CD25^+$ Zellen im Epithel um aktivierte $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten handeln könnte.

Die signifikant erhöhte Anzahl intraepithelialer $CD8^+$ T-Lymphozyten in der probiotisch behandelten Gruppe könnte ein Hinweis auf einen, durch *B. cereus* var. *toyoi* verursachten, höheren Antigenstimulus aus dem Darmlumen sein und könnte durch verstärkte Immigration von Lymphozyten in das Epithel erklärt werden. Die Mehrheit der intraepithelialen Lymphozyten scheint jedoch wenig lymphoproliferatives Potential zu besitzen, bzw. wenig auf mikrobielle antigene Stimulation zu reagieren (GUY-GRAND et al., 1991). Eventuell

könnten deshalb Bakterien notwendig sein, um Epithelzellen zur Produktion von Wachstumsfaktoren anzuregen, die wiederum intraepitheliale Lymphozyten stimulieren. Da Antigene aus dem Darm mit dieser Zellfraktion den ersten Kontakt erfahren, könnte die Vermehrung intraepithelialer CD8⁺ T-Lymphozyten zu einer besseren Reaktion auf eindringende Antigene führen.

In eine andere Richtung weist die suppressive Wirkung von CD8⁺ T-Lymphozyten, die eine Rolle bei der Verhinderung überschießender Immunreaktionen spielt (HIRATA et al., 1986). Durch die erhöhte Anzahl von CD8⁺ Lymphozyten im Epithel könnte diese Wirkung in der probiotisch behandelten Gruppe verstärkt sein.

Die erhöhte Anzahl von CD8⁺ Lymphozyten im Epithel kann aber auch auf einen direkten schädigenden Einfluss von *B. cereus* var. *toyoi* auf die Epithelzellen des Darmes hinweisen. Die Verabreichung des probiotischen Bakteriums könnte sich somit indirekt auf intestinale Immunzellen auswirken.

Der Anteil der CD8⁺ Lymphozyten an der über Ficoll gereinigten Zellfraktion im Blut entsprach weitgehend den Angaben aus der Literatur (YANG und PARKHOUSE, 1996). Obwohl der Anteil CD3⁺CD8⁺ Zellen am 28. und 35. Tag in der probiotisch behandelten Gruppe bedeutend höher als in der unbehandelten Kontrollgruppe war, wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht (siehe Abbildung 20 in Kapitel III.1).

Wahrscheinlich wurde das Signifikanzniveau aufgrund der relativ geringen Stichprobengröße (max. 5 Tiere pro Alters- und Fütterungsgruppe) auch in anderen Analysen nicht erreicht. Deshalb soll hier auch auf Tendenzen eingegangen werden, die sich aus der Analyse der Lymphozytensubpopulationen ableiten lassen können.

Tendenzielle Unterschiede zwischen probiotisch behandelter Gruppe und Kontrollgruppe weisen darauf hin, dass eine andere CD8⁺ Subpopulation, die CD3⁻CD8⁺ Zellen, in der Kontrollgruppe häufiger vertreten war, als in der probiotisch behandelten Gruppe. Ihr Anteil an PBMCs lag in der Kontrollgruppe während des Beobachtungszeitraums über den Werten der altersgleichen Versuchsgruppe und nahm zum 56. Lebenstag hin in beiden Fütterungsgruppen ab.

Nach der Aufreinigung über Ficoll und Inkubation mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 konnte im Blut eine weitere Subpopulation von CD8⁺ T-Lymphozyten analysiert werden. Es handelte sich dabei um CD8⁺CD4⁺ doppelt positive Zellen, die nach SAALMÜLLER und Mitarbeitern (1987) sensibilisierte Memory-T-Helferzellen sein könnten, die das CD8 Protein auch nach Rückbildung zu kleinen T-Lymphozyten weiterhin exprimieren. Sie werden als ein

Resultat extra-thymischer Reifung angesehen (SAALMÜLLER et al., 2002). Ihr Anteil an PBMCs fiel am 35. Tag in beiden Fütterungsgruppen ab, zu allen Zeitpunkten lag ihr Anteil in der Kontrollgruppe über den Werten der altersgleichen Versuchsgruppe (siehe Abbildung 25 in Kapitel III.1). Dieser Unterschied war bis zum 35. Tag sehr gering, zum 56. Tag nahm die Differenz zu. Dies könnte ein Hinweis auf einen Antigenstimulus sein, der in der probiotisch behandelten Gruppe weniger stark ausgeprägt war, zum Beispiel ausgelöst von enteropathogenen Bakterien, die im Darm der probiotisch behandelten Gruppe weniger häufig vorhanden sein könnten, als im Darm der Kontrollgruppe. In einem vorangegangenen Fütterungsversuch konnte gezeigt werden, dass im Darm einer mit dem probiotischen Keim *E. faecium* behandelten Ferkelgruppe weniger enteropathogene *E. coli* nachzuweisen waren, als in der unbehandelten Kontrollgruppe (SCHAREK et al., 2005). Es ist anzunehmen, dass enteropathogene Mikroorganismen einen Antigenstimulus ausüben, der in andere Immunreaktionen mündet, als probiotische apathogene Mikroorganismen. Die Gabe von *B. cereus* var. *toyoi* könnte also über die Modulation der intestinalen Flora indirekt das Immunsystem beeinflussen.

Im Gegensatz zu Memory-T-Helferzellen nahm der Anteil naiver T-Lymphozyten, die CD4 aber kein CD8 exprimieren nach dem Absetzen deutlich zu. In der probiotisch behandelten Gruppe war dieser Anstieg deutlicher als in der Kontrollgruppe, ihr Anteil an PBMCs verdoppelte sich vom 28. zum 35. Tag (siehe Abbildung 22b). Eventuell kommt es durch das Absetzen zu der Produktion von Faktoren, die die Neubildung von T-Helferzellen stimulieren. Dieser Effekt schien in der mit *B. cereus* var. *toyoi* gefütterten Gruppe verstärkt zu sein.

B-Lymphozyten wurden im Darm und im Blut mit Antikörpern gegen CD21 erfasst. Im proximalen Jejunum der beobachteten Fütterungsgruppen waren CD21⁺ B-Zellen bis zur zweiten Lebenswoche nur spärlich vertreten. In der Hauptsache wurden sie im Kryptbereich der *Lamina propria mucosae* nachgewiesen. Ihre Anzahl stieg während des Beobachtungszeitraums bis zum 56. Lebenstag um mehr als das Zehnfache an (Abbildung 45 in Kapitel III.2). Diese Beobachtungen entsprechen den Befunden von ROTHKÖTTER und Mitarbeitern (1991), die konventionell gehaltenen Ferkel mit keimfrei gehaltenen Tieren verglichen und eine Zunahme der B-Zellen mit dem Alter und die bevorzugte Lokalisation von IgA⁺ und IgM⁺ Plasmazellen im Kryptbereich demonstrierten. B-Zellen, die aus den Peyerschen Plaques in die Mukosa einwandern, differenzieren sich dort mit Hilfe von CD4⁺ Lymphozyten und Lymphokinen zu IgA-sezernierenden Plasmazellen aus (BRANDTZAEG et al., 1992; SIDMAN, 1984). Sekretorisches IgA (sIgA) wird aktiv auf die luminale Seite von

Epithelzellen transportiert. Erreger, gegen die der Körper Antikörper besitzt, werden von diesen Immunglobulinen im Darm gebunden (BEFUS und BIENENSTOCK, 1982; ALLEN et al., 1990). Bei neugeborenen Ferkeln kommen Immunglobulin enthaltende Zellen in geringer Zahl vor, ihre Anzahl nimmt mit dem Alter zu (BROWN und BOURNE, 1976). Die geringe Anzahl von B-Zellen im Darm der jungen Versuchstiere ist mit der physiologischen Entwicklung der spezifischen Immunabwehr zu erklären. In den ersten zwei Lebenstagen nimmt das Ferkel maternale Antikörper mit der Sauenmilch auf. Vor der Geburt findet kein Immunglobulinaustausch über die Plazenta statt, da sich beim Schwein eine *Placenta epitheliochorialis* entwickelt, die für Antikörper undurchlässig ist. Maternale Antikörper werden im Darm resorbiert, IgA verbleibt im Darmlumen und trägt hier zur Immunexklusion bei. Schutz durch eigene Antikörper beginnt beim Ferkel in der zweiten Lebenswoche, erst ab der dritten Lebenswoche werden effektive Mengen von IgA in den Darm sezerniert (ALLEN und PORTER, 1979).

Während im Darm der Fütterungsgruppen durch die Probiotikasupplementierung keine Unterschiede in der Häufigkeit CD21⁺ Zellen festzustellen waren, war der Anteil von CD21⁺ Lymphozyten an PBMCs in der Versuchsgruppe höher, als in der altersgleichen Kontrollgruppe (Abbildung 28). Der Unterschied zwischen Kontrollgruppe und probiotisch behandelte Gruppe war (eventuell aufgrund der geringen Stichprobengröße) nicht signifikant. Dieser Unterschied in den Fütterungsgruppen wurde auch von SCHIERACK und Mitarbeitern (persönliche Mitteilung, 2005) beobachtet. Sie fanden ebenfalls einen größeren Anteil CD21⁺ B-Zellen an PBMCs der Ferkel, die mit *B. cereus* var. *toyoi* gefüttert wurden nach Impfung (*M. hyopneumoniae*, Influenzavirus).

Unklar bleibt, warum im proximalen Jejunum der Versuchstiere weniger B-Zellen in der Versuchsgruppe als in der Kontrollgruppe zu finden waren, während ihr Anteil im Blut in der Versuchsgruppe größer war. Eine Erklärung könnte darin liegen, dass B-Zellen, die aus den Peyer'schen Plaques auswandern an dieser Lokalisation der *Lamina propria mucosae* seltener zu finden sind, als in distaler gelegenen Darmabschnitten.

Die Anzahl von Lymphozyten in einem lymphatischen Organ zu einem bestimmten Zeitpunkt ist das Resultat einer Momentbetrachtung gleichzeitig stattfindender Mechanismen. Zum einen findet der Eintritt von Lymphozyten in ein Organ statt, der durch Interaktion mit Adhäsionsmolekülen reguliert wird. Zum anderen kann im Darm neben der Migration die Neubildung von Lymphozyten beobachtet werden, die wiederum von der Wechselwirkung mit anderen Lymphozyten beeinflusst wird (PASTORET und GRIEBEL, 1998). So könnte die Expression von Adhäsionsmolekülen auf zirkulierenden B-Lymphozyten einen Einfluss auf die Anzahl von B-Lymphozyten in der Mukosa haben. Die Untersuchung von CD44 auf

Lymphozyten könnte hier zur Klärung beitragen, da CD44 als Ligand von L-Selektin an der Bindung von Lymphozyten an Endothelzellen beteiligt ist (YANG und BINNS, 1993). Gegen andere Adhäsionsmoleküle des Schweins (z.B. CD18) wurden Antikörper entwickelt, die entsprechenden Liganden für manche Bereiche konnten aber noch nicht eindeutig differenziert werden (HAVERSON et al., 1994; SAALMÜLLER, 1996).

Bei der Zählung von NK-Zellen im Darm (CD11R1) konnten keine Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen belegt werden. Hier nahmen die Zellzahlen mit dem Alter zu (Abbildung 46). Die Zunahme der CD11R1⁺ Lymphozyten im Darm könnte durch die Ausreifung des intestinalen Immunsystems mit zunehmendem Antigenkontakt erklärt werden. Weitere Zellen der monozytären Reihe (Eosinophile und Neutrophile) können im Darm mit dem Anti-CD11R1 Antikörper detektiert werden, während porcine Monozyten im Blut anhand ihres Markers CD14 identifiziert werden (HAVERSON et al., 1994). CD14 wird auf Zellen der monozytären Reihe im Darm nicht exprimiert. Zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe waren keine Unterschiede bezüglich der Häufigkeit von CD14⁺ Zellen im Blut zu erkennen (Abbildung 31). Von allen analysierten Populationen konnte bei der CD14⁺ Zellpopulation allein eine abnehmende Tendenz in beiden Fütterungsgruppen mit dem Alter festgestellt werden. Dies wird nur teilweise durch den physiologischen Übergang von einem ausgesprochen neutrophilen Blutbild in den ersten Lebenstagen zu einem lymphozytären Blutbild beim erwachsenen Tier (KRAFT und DÜRR, 1995; PASTORET und GRIEBEL, 1998) erklärt. Eventuell zeigt dies die alterungsbedingte Dominanz erworbener spezifischer Mechanismen über angeborene unspezifische Abwehrmechanismen an.

Die Befunde aus der vorliegenden Arbeit ließen keine Aussagen über eine Verbindung (zum Beispiel im Sinne einer wechselseitigen Beeinflussung) zwischen systemischer Immunzellantwort und intestinaler Immunzellantwort zu. Die Frage, ob eine Probiotikaaufnahme nur lokale oder darüber hinaus gehende systemische Auswirkungen auf das Immunsystem hat, ließe sich möglicherweise mit Hilfe der Untersuchung des IgA-Zyklus differenzierter beantworten. Aktivierte, zur IgA-Produktion fähige, B-Lymphozyten migrieren von den Peyer'schen Plaques in das Lymphgefäßsystem und erreichen das Blutgefäßsystem. Sie sind in der Lage von dort in die *Lamina propria mucosae* und in andere mukosale Oberflächen zu migrieren, wie zum Beispiel in das respiratorische lymphatische Gewebe oder den Urogenitaltrakt. Dieses Migrationsverhalten ist auch als IgA-Zyklus bekannt (PERDIGON et al., 1999). Würde man eine veränderte IgA-Produktion nach oraler Verabreichung von Probiotika nicht nur im Darm, sondern auch in anderen Kompartimenten

des Mukosa-assoziierten Lymphgewebes nachweisen, könnte man eine systemische Wirkung des Probiotikums postulieren.

T-Lymphozyten kann man nach Art der produzierten Zytokine in T-Helfer1- (TH1) und T-Helfer2 (TH2) -Zellen unterscheiden. Aktivierte Th1-Zellen produzieren vor allem Interferon- γ (IFN- γ) und stimulieren damit die phagozytenabhängige Abwehr. Es gibt bisher keine phänotypischen Marker, die die Unterscheidung der beiden T-Helfergruppen ermöglichen. Deshalb wurden in vielen Studien Zytokine gemessen, um Aussagen über die Aktivität von Immunzellen, insbesondere zur Unterscheidung von TH1- und TH2-Zellen zu treffen (PERDIGON et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde der Anteil IFN- γ produzierender Zellen an PBMCs nach Stimulation mit PMA durchflusszytometrisch analysiert. Aufgrund der geringen Stichprobengröße konnten hierbei keine Unterschiede zwischen unbehandelter Kontrollgruppe und Versuchsgruppe berechnet werden. Es ließ sich jedoch eine tendenziell unterschiedliche Entwicklung mit dem Alter erkennen. In der Kontrollgruppe nahm der Anteil IFN- γ produzierender Zellen an PBMCs bis zum 56. Tag hin ab, während man in der probiotisch behandelten Gruppe eine zunehmende Tendenz feststellen konnte (Abbildung 35). Diese Beobachtung könnte auf eine zunehmende Aktivierung von Immunzellen im Blut der mit *B. cereus* var. *toyoi* gefütterten Tiere hindeuten.

Gegen Ende des Beobachtungszeitraumes konnten im überwiegenden Teil der Analysen keine Unterschiede mehr zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe aufgezeigt werden. Dies legt den Schluss nahe, dass sich die Probiotika-Supplementierung vor allem in den ersten 6 Lebenswochen auswirkt, in der Zeit, in der sich die lokale Immunität noch entwickelt. Nach BAILEY und Mitarbeitern (2001) entspricht die Architektur des GALT erst nach der 6. Lebenswoche im Wesentlichen der eines erwachsenen Tieres.

Die Beobachtungen aus der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass die an porzinen PBMCs erhobenen Befunde auf die funktionell differenten Darmlymphozyten nicht ohne weiteres übertragbar sind und dass die Wirkungsmechanismen von Probiotika wahrscheinlich lokal auf den Darm begrenzt sind. Dabei ist in der Interpretation der intestinalen zellulären Immunität zu berücksichtigen, dass die Reaktion von Immunzellen immunoregulatorischen Mechanismen unterliegt, um Epithelschäden im Darm zu vermeiden (PERDIGON et al., 1995). Man wird deshalb zu einem Beobachtungszeitpunkt gleichzeitig Reaktion und Regulation des immunologischen Geschehens sehen können.

Es ist nicht auszuschließen, dass die Wirkung von Probiotika einzelne Aspekte der Immunität zu modulieren vermag, während andere nahe liegende Mechanismen nicht beeinflusst werden. Beispiele aus der Literatur sind häufig, so berichten exemplarisch GILL et al. (2000) von vermehrter mitogeninduzierter Proliferation von T- und B-Zellen in der Milz von Mäusen, die mit Laktobazillen und Bifidobakterien gefüttert wurden, während T- und B-Zellen des Blutes keine mitogeninduzierte Proliferation, aber eine höhere Serumantikörperproduktion zeigten (siehe I.2.1.4).

Die Gründe für die zum Teil inkonsistenten Befunde aus der Probiotikaforschung sind vielfältig und liegen nicht zuletzt in der Komplexität des Immunsystems begründet. Weitergehende Untersuchungen werden nötig sein, um die Potentiale und Grenzen der Probiotikaapplikation zu definieren. Dabei wird vor allen Dingen die fokussierte Analyse funktioneller Tests (z. B. Phagozytosekapazität, Zytokinsekretion, Proliferation) unter standardisierter Bedingungen (z.B. im Rahmen eines Challengeversuchs mit darmpathogenen Erregern) von Nutzen sein.