

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

**Der Effekt einer unterschiedlichen Proteinversorgung auf immunologische und
verdauungsphysiologische Parameter während der postnatalen Entwicklung von
Beaglewelpen**

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

vorgelegt von
Patricia Ingeborg Philipp
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2013

Journal-Nr.: 3629

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Susanne Hartmann
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Corinna Eule

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Beagle, puppies, protein, feeds, digestibility, immunology, lymphocytes,
development, food allergies, tolerance, hypersensitivity

Tag der Promotion: 08.08.2013

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: 978-3-86387-360-8

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013

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 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

den Beagles

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	X
Abbildungsverzeichnis	XIV
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	2
2.1. Aufbau des Immunsystems.....	2
2.1.1. Unspezifisches Immunsystem.....	2
2.1.2. Spezifisches Immunsystem.....	2
2.1.3. Zellen des Immunsystems	3
2.1.3.1. T-Lymphozyten	4
2.1.3.1.1. MHCII-Moleküle und T-Helfer-Zellen	4
2.1.3.1.2. MHCI-Moleküle und zytotoxische T-Zellen.....	6
2.1.3.2. B-Lymphozyten.....	6
2.2. Immunologische Differenzierung von Leukozyten im peripheren Blut von Hunden	7
2.2.1. Canines CD3-Oberflächenantigen	7
2.2.2. Canines CD4-Oberflächenantigen	7
2.2.3. Canines CD5-Oberflächenantigen	8
2.2.4. Canines CD8-Oberflächenantigen	8
2.2.5. Canines CD21-Oberflächenantigen	8
2.3. Entwicklung der Lymphozytenpopulationen beim Neonaten	9
2.4. Lymphozytensubpopulationen beim adulten Hund	12
2.5. Aktivierung von Lymphozyten	15
2.5.1. Lymphoproliferative Aktivität bei Hunden unterschiedlichen Alters.....	16
2.6. Toleranzentwicklung der B- und T-Zellen gegenüber Autoantigenen	20
2.6.1. Reifung der B-Zellen im Knochenmark.....	20

2.6.2.	Zentraler Toleranzmechanismus der B-Zellen.....	20
2.6.3.	Reifung und zentraler Toleranzmechanismus der T-Zellen	21
2.7.	Toleranzentwicklung gegenüber Nahrungsproteinen	22
2.7.1.	Das darmassoziierte lymphatische Gewebe.....	22
2.7.2.	Lymphknötchen	22
2.7.3.	Peyersche Platten.....	22
2.7.4.	Aufgaben und Funktionen des darmassoziierten lymphatischen Gewebes	23
2.7.5.	Futtermittelnunverträglichkeiten	31
2.8.	Futtermittelantigen-induzierte Lymphozytenstimulationstests.....	34
2.9.	Veränderungen der hämatologischen Parameter und des Differentialblutbildes in den ersten Lebenswochen eines Hundewelpen	36
2.9.1.	Hämatologische Parameter.....	36
2.9.2.	Differentialblutbild	37
3.	MATERIAL UND METHODEN.....	42
3.1.	Versuchsziel	42
3.2.	Versuchstiere.....	42
3.3.	Versuchsplan	42
3.4.	Versuchsfutter.....	44
3.5.	Klinische Allgemeinuntersuchung	48
3.6.	Körpermasse	48
3.7.	Ermittlung der Fäzeskonsistenz	48
3.8.	Methoden.....	49
3.8.1.	Blutentnahme.....	49
3.8.2.	Durchflusszytometrie	50
3.8.2.1.	Isolierung der Leukozyten mittels Gradientenzentrifugation	50
3.8.2.2.	Intrazelluläre CD4 ⁺ /Foxp3 ⁺ -Doppelfärbung	53
3.8.2.5.	Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Durchflusszytometrie	55
3.8.3.	Lymphozytenproliferationstest	57
3.8.3.1.	Prinzip.....	57

3.8.3.2.	Durchführung des Stimulationstests.....	57
3.8.3.3.	Messung und Auswertung der Daten	58
3.8.3.4.	Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für den Lymphozytenproliferationstest	59
3.8.4.	Proteinextraktion und Proteinbestimmung nach Bradford.....	60
3.8.4.1.	Durchführung der Proteinextraktion	60
3.8.4.2.	Proteinbestimmung nach Bradford.....	61
3.8.4.5.	Durchführung eines futtermittelantigeninduzierten Lymphozytenproliferationstests.....	65
3.8.5.	Verdaulichkeitsversuch	67
3.8.5.1.	Durchführung	67
3.8.5.2.	Auswertung.....	67
3.8.6.	Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	69
3.8.6.1.	Statistische Auswertung der Ergebnisse des hämatologischen Blutbildes, des Differentialblutbildes, der Verteilung der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut und des mitogeninduzierten Lymphozytenproliferationstests.....	69
3.8.6.2.	Statistische Auswertung der Ergebnisse des hämatologischen Blutbildes, des Differentialblutbildes, der Verteilung der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut und des mitogeninduzierten Lymphozytenproliferationstests in Abhängigkeit des Alters der Welpen	69
3.8.6.3.	Statistische Auswertung des futtermittelantigeninduzierten Lymphozytenproliferationstests.....	70
3.8.6.4.	Statistische Auswertung der Kotkonsistenzen und des Verdaulichkeitsversuchs ..	70
4.	ERGEBNISSE	71
4.1.	Blutuntersuchung.....	71
4.1.1.	Blutbild in Abhängigkeit der Fütterung.....	71
4.1.2.	Blutbild in Abhängigkeit der Wurfzugehörigkeit.....	71
4.1.3.	Differentialblutbild in Abhängigkeit der Fütterung	71
4.1.4.	Differentialblutbild in Abhängigkeit der Wurfzugehörigkeit.....	72
4.1.5.	Auswertung unter Berücksichtigung des Alters der Welpen	79

4.1.5.1.	Ergebnisse des hämatologischen Blutbildes unter Berücksichtigung des Alters der Welpen	79
4.1.5.2.	Ergebnisse des Differentialblutbildes unter Berücksichtigung des Alters der Welpen	79
4.2.	Durchflusszytometrische Untersuchungen	81
4.2.1.	Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung in Abhängigkeit der Fütterung	81
4.2.2.	Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung in Abhängigkeit der Wurfzugehörigkeit.....	81
4.2.3.	Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung unter Berücksichtigung des Alters der Welpen.....	82
4.3.	Ergebnisse des mitogeninduzierten Lymphozytenproliferationstests.....	86
4.3.1.	Ergebnisse des Lymphozytenproliferationstests in Abhängigkeit der Fütterung	86
4.3.2.	Ergebnisse des Lymphozytenproliferationstests in Abhängigkeit der Wurfzugehörigkeit.....	86
4.3.3.	Ergebnisse des Lymphozytenproliferationstest unter Berücksichtigung des Alters der Welpen	86
4.4.	Ergebnisse des futtermittelantigeninduzierten Lymphozytenproliferationstests	90
4.5.	Ergebnisse der Kotbeurteilung	93
4.7.	Verdaulichkeitsversuch	96
4.7.1.	Ergebnisse des Verdaulichkeitsversuchs in Abhängigkeit der Fütterung.....	96
4.7.2.	Ergebnisse des Verdaulichkeitsversuchs in Abhängigkeit der Wurfzugehörigkeit .	96
5.	DISKUSSION.....	99
5.1.	Versuchstiere.....	99
5.2.	Futter	99
5.3.	Versuchsdesign	100
5.4.	Kritik der verwendeten Methoden.....	101
5.4.1.	Immunologische Methoden	101
5.4.1.1.	Durchflusszytometrische Untersuchung	101
5.4.1.2.	Mitogeninduzierter Lymphozytenproliferationstest	101

5.4.1.3.	Futtermittelantigeninduzierter Lymphozytenproliferationstest.....	102
5.4.1.3.1.	Gewinnung des Proteinextraktes	102
5.4.1.3.2.	Futtermittelantigeninduzierter Lymphozytenproliferationstest.....	102
5.4.2.	Verdauungsphysiologische Methoden.....	104
5.4.2.1.	Kotkonsistenz	104
5.4.2.2.	Verdaulichkeitsversuch	104
5.5.	Diskussion der Ergebnisse.....	105
5.5.1.	Hämatologie.....	105
5.5.2.	Differentialblutbild	107
5.5.3.	Durchflusszytometrische Untersuchungen	109
5.5.3.1.	Regulatorische T-Zellen	112
5.5.4.	Lymphozytenproliferationstest	113
5.5.5.	Futtermittelantigeninduzierter Lymphozytenproliferationstest.....	115
5.5.6.	Kotkonsistenz	117
5.5.7.	Verdaulichkeitsversuch	118
5.6.	Schlussfolgerung und Ausblick	121
6.	ZUSAMMENFASSUNG	122
7.	SUMMARY	124
8.	LITERATURVERZEICHNIS	124
9.	ANHANG	145
9.1.	Publikationsverzeichnis.....	146
9.2.	Danksagung.....	147
9.3.	Selbständigkeitserklärung	147

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Antigen presenting cells
BCR	B cell receptor
BrdU	5-Bromo-2`-deoxyuridine
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
CO	Cross-over
Con A	Concanavalin A
CPM	Counts per minute
d	Tage
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EP	Einzelproteinquelle
et al.	et alii
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fc	Fragment crystallizable (kristallisierbares Fragment von Ig)
x g	Erdbeschleunigung
G ₁ -Phase	Wachstumsphase 1
g	Gramm
GALT	Gut Associated Lymphatic Tissue
GIT	Gastrointestinaltrakt
h	Stunden

HGB	Hämoglobin
HKT	Hämatokrit
IFN	Interferon
IL	Interleukin
J	Jahre
K	Kalium
kD	Kilodalton
KM	Körpermasse
l	Liter
log	Dekadischer Logarithmus
LT	Lebenstag
LW	Lebenswoche
MCH	Mittlere Hämoglobinkonzentration pro Erythrozyt
MCHC	Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	Mittleres Erythrozyteneinzelvolumen
MHC	Major histocompatibility complex
Mo	Monate
MP	Mischproteinquelle
M-Phase	Teilungsphase
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
mmol/l	Millimol pro Liter
MW	Mittelwert
Na	Natrium

VIII

n.d.	Nicht determiniert
OVA	Ovalbumin (Hühner-Albumin)
P	Phosphor
PHA-M	Phytohämagglutinin
%	Prozent
PBS	Phosphate buffered saline
PLT	Thrombozyten
PP	Peyersche Platten
p.p.	Post partum
PWD	Post-Weaning Diarrhoea Syndrome
PWM	Pokeweed Mitogen
RBC	Red blood cells (Erythrozyten)
RNA	Ribonukleinsäure
Rp. i. TS	Rohprotein in Trockensubstanz
rpm	Rotations per minute
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SEB	<i>Staphylococcus</i> Enterotoxin B
SEM	Standard error of the mean
SI	Stimulationsindex
S-Phase	Synthesephase
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming growth factor (transformierender Wachstumsfaktor)
Th1-Zellen	T-Helfer-1-Zellen
Th2-Zellen	T-Helfer-2-Zellen

TNF	Tumornekrosefaktor
TCR	T cell receptor
vs.	Versus
WBC	White blood cells (Leukozyten)
XSCID	X-linked Severe Combined Immunodeficiency

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 :	Ausgewählte Oberflächenantigene und ihre Funktion beim Hund	7
Tab. 2:	Gesamtlymphozyten und Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut von Hunden unterschiedlichen Alters (MW \pm SD)	13
Tab. 3:	Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut von adulten Hunden (in %; MW \pm SD)	14
Tab. 4 :	Der Einfluss des Alters auf die proliferative Aktivität von Lymphozyten im peripheren Blut von Hunden (Greeley et al., 1996)	17
Tab. 5:	Der Einfluss des Alters auf die proliferative Aktivität von Lymphozyten im peripheren Blut von Hunden (Greeley et al., 2001)	18
Tab. 6:	Die proliferative Aktivität von Lymphozyten im peripheren Blut bei Hundewelpen am ersten Lebenstag (Faldyna et al., 2005)	18
Tab. 7:	Die proliferative Aktivität von Lymphozyten im peripheren Blut bei Hundewelpen im Verlauf der ersten zwölf Lebenswochen (Toman et al., 2000)	19
Tab. 8:	Anzahl der am häufigsten diagnostizierten Futtermittelallergene beim Hund (modifiziert nach Verlinden et al. (2006)).....	30
Tab. 9:	Hämatologische Parameter bei Beaglewelpen in den ersten Lebenswochen (Harper et al., 2003).....	36
Tab. 10:	Die Dynamik der hämatologischen Parameter bei Beagle- und Mischlingswelpen in den ersten sechs Lebensmonaten (MW \pm SD)	38
Tab. 10:	Die Dynamik der hämatologischen Parameter bei Beagle- und Mischlingswelpen in den ersten sechs Lebensmonaten (MW \pm SD)	39
Tab. 11:	Die Dynamik des Differentialblutbildes bei Beagle- und Mischlingswelpen in den ersten sechs Lebensmonaten (MW \pm SD).....	40
Tab. 11:	Die Dynamik des Differentialblutbildes bei Beagle- und Mischlingswelpen in den ersten sechs Lebensmonaten (MW \pm SD).....	41
Tab. 12:	Verteilung der Welpen auf die beiden Versuchsgruppen.....	43
Tab. 13:	Zusammensetzung der beiden Versuchsdiäten	44
Tab. 14:	Errechnete Nährstoffgehalte der beiden Rationen bezogen auf 100 g TS.....	45
Tab. 15a:	Analysierte Nährstoffgehalte der beiden verzehrfertigen Rationen bezogen auf 100 g TS	46

Tab. 15b: Nährstoffgehalte der beiden verzehrfertigen Rationen bezogen auf 100 g TS.....	47
Tab. 16: Das eingesetzte Scoring System zur Beurteilung der Kotproben	48
Tab. 17: Markierungsprotokoll für den ersten Inkubationsschritt bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der mononukleären Zellen des Blutes ...	52
Tab. 18: Markierungsprotokoll für den zweiten Inkubationsschritt bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der mononukleären Zellen des Blutes ...	52
Tab. 19: Rezept der Fixierungs-/Permeabilisierungslösung für die intrazelluläre Färbung ..	53
Tab. 20: Antikörper für die intrazelluläre Proteinmarkierung (FoxP3)	53
Tab. 21: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Durchflusszytometrie	55
Tab. 22: Zusammensetzung des Erythrozyten-Lyse-Puffer.....	55
Tab. 23: Zusammensetzung des FACS-Puffer.....	55
Tab. 24: Verwendete Geräte für die Durchflusszytometrie	56
Tab. 25: Verwendete Mitogene für den Lymphozytenproliferationstest	58
Tab. 26: Verwendeter anti-BrdU-Antikörper	58
Tab. 27: Rezept Zellkulturmedium	58
Tab. 28: Rezept DNase I Puffer.....	58
Tab. 29: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für den Lymphozytenproliferationstest	59
Tab. 30: Verwendete Geräte für den Lymphozytenproliferationstest.....	59
Tab. 31: Mischtablette zur Erstellung der BSA-Kalibrierreihe	61
Tab. 32: Verdünnungsprotokoll der Proteinextrakte mittels Sörensen-Phosphatpuffer für die Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford.....	63
Tab. 33: Gemessene mittlere Proteingehalte im hergestellten Proteinextrakt	63
Tab. 34: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Proteinextraktion und Proteinbestimmung nach Bradford	64
Tab. 35a: Zusammensetzung des 20 mM Sörensen-Natriumphosphatpuffers (pH 7,4); Schritt 1	64
Tab. 35b: Zusammensetzung des 20 mM Sörensen-Natriumphosphatpuffers (pH 7,4); Schritt 2	64
Tab. 36: Zusammensetzung des Bradford Reagenz	65

Tab. 37: Verwendete Geräte für die Proteinextraktion und Proteinbestimmung nach Bradford.....	65
Tab. 38: Mischtablette von Proteinextrakt und Zellkulturmedium für jeweils 2600 µl	66
Tab. 39: Analytierte Rohnähr- und Mineralstoffe im Futter und den Fäzes sowie die hierfür angewandte Methodik nach VDLUFA (Methodenbuch III, 1997).....	68
Tab. 40: Ergebnisse der hämatologischen Untersuchung der Welpen der Gruppen 1 und 2 zum Zeitpunkt 1	73
Tab. 41: Ergebnisse der hämatologischen Untersuchung der Welpen der Gruppen 1 und 2 und Würfe 1 und 2 zum Zeitpunkt 2 (n = 8).....	73
Tab. 42: Ergebnisse der hämatologischen Untersuchung der Welpen der Gruppen 1 und 2 und Würfe 1 und 2 zum Zeitpunkt 3 (n = 8).....	74
Tab. 43: Ergebnisse der hämatologischen Untersuchung der Welpen der Gruppen 1 und 2 zum Zeitpunkt 4 (n = 8).....	74
Tab. 44: Ergebnisse des Differentialblutbildes der Welpen der Gruppen 1 und 2 zum Zeitpunkt 1	75
Tab. 45: Ergebnisse des Differentialblutbildes der Welpen der Gruppen 1 und 2 und Würfe 1 und 2 zum Zeitpunkt 2 (n = 8)	76
Tab. 46: Ergebnisse des Differentialblutbildes der Welpen der Gruppen 1 und 2 und Würfe 1 und 2 zum Zeitpunkt 3 (n = 8)	77
Tab. 47: Ergebnisse des Differentialblutbildes der Welpen der Gruppen 1 und 2 und Würfe 1 und 2 zum Zeitpunkt 4 (n = 8)	78
Tab. 48: Die Veränderung der hämatologischen Parameter in Abhängigkeit des Alters der Welpen (n = 16)	80
Tab. 49: Die Veränderung des Differentialblutbildes in Abhängigkeit des Alters der Welpen (n = 16)	80
Tab. 50: Prozentuale Anteile an CD3 ⁺ -, CD4 ⁺ -, CD8 ⁺ -, CD21 ⁺ -, CD5 ⁺ /MHCII ⁺ , CD4 ⁺ /Foxp3 ⁺ -Lymphozyten und die CD4 ⁺ /CD8 ⁺ -Ratio im peripheren Blut der Welpen der Gruppen 1 und 2 zum Zeitpunkt 1.....	83
Tab. 51: Prozentuale Anteile an CD3 ⁺ -, CD4 ⁺ -, CD8 ⁺ -, CD21 ⁺ -, CD5 ⁺ /MHCII ⁺ , CD4 ⁺ /Foxp3 ⁺ -Lymphozyten und die CD4 ⁺ /CD8 ⁺ -Ratio im peripheren Blut der Welpen der Gruppen 1 und 2 und Würfe 1 und 2 zum Zeitpunkt 2 (n = 8).....	83

Tab. 52: Prozentuale Anteile an CD3 ⁺ -, CD4 ⁺ -, CD8 ⁺ -, CD21 ⁺ -, CD5 ⁺ /MHCII ⁺ , CD4 ⁺ /Foxp3 ⁺ - Lymphozyten und die CD4 ⁺ /CD8 ⁺ -Ratio im peripheren Blut der Welpen aus den Würfen 1 und 2 zum Zeitpunkt 3 (n = 8).....	84
Tab. 53: Prozentuale Anteile an CD3 ⁺ -, CD4 ⁺ -, CD8 ⁺ -, CD21 ⁺ -, CD5 ⁺ /MHCII ⁺ , CD4 ⁺ /Foxp3 ⁺ - Lymphozyten und die CD4 ⁺ /CD8 ⁺ -Ratio im peripheren Blut der Welpen aus den Würfen 1 und 2 zum Zeitpunkt 4 (n = 8).....	84
Tab. 54: Die Veränderung der Lymphozytensubpopulationen (CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD21 ⁺ , CD5 ⁺ /MHCII ⁺ , CD4 ⁺ /Foxp3 ⁺) und der CD4 ⁺ /CD8 ⁺ -Ratio im peripheren Blut unter Berücksichtigung des Alters der Welpen von der 3. bis zur 21. Lebenswoche (n = 16)	85
Tab. 55: Ergebnisse nach Stimulation der Lymphozyten mit den Mitogenen Pokeweed Mitogen (PWM), Concanavalin A (Con A) und Phythämagglutinin (PHA) (Stimulationsindex), Zeitpunkt 1	87
Tab. 56: Ergebnisse nach Stimulation der Lymphozyten mit den Mitogenen Pokeweed Mitogen (PWM), Concanavalin A (Con A) und Phythämagglutinin (PHA) (Stimulationsindex), Zeitpunkt 2 (n = 8).....	87
Tab. 57: Ergebnisse nach Stimulation der Lymphozyten mit den Mitogenen Pokeweed Mitogen (PWM), Concanavalin A (Con A) und Phytohämagglutinin (PHA) (Stimulationsindex), Zeitpunkt 3 (n = 8).....	88
Tab. 58: Ergebnisse nach Stimulation der Blutlymphozyten der Welpen der beiden Gruppen und Würfe mit den Mitogenen Pokeweed Mitogen (PWM), Concanavalin A (Con A) und Phytohämagglutinin (PHA) (Stimulationsindex) zum Zeitpunkt 4 (n = 8).....	88
Tab. 59: Die Veränderung der Lymphozytenproliferationsfähigkeit (Stimulationsindex) gegenüber den Mitogenen Pokeweed Mitogen (PWM), Concanavalin A (Con A) und Phytohämagglutinin (PHA) im peripheren Blut unter Berücksichtigung des Alters der Welpen von der 3. bis zur 21. Lebenswoche (n = 16)	89
Tab. 60a: Vergleich der Stimulierbarkeit der Blutlymphozyten (Stimulationsindex) der Welpen der Gruppen 1 und 2 mit Proteinextrakten (Hüttenkäse, Fisch-, Hühner-, Schweine- und Sojaprotein) der Futtermittel in verschiedenen Konzentrationen (30, 75, 125, 250 und 500 µg/ml) vor und nach dem Cross-over (CO).....	91
Tab. 60b: Vergleich der Stimulierbarkeit der Blutlymphozyten (Stimulationsindex) der Welpen der Gruppen 1 und 2 mit Proteinextrakten (Hüttenkäse, Fisch-, Hühner-, Schweine- und Sojaprotein) der Futtermittel in verschiedenen Konzentrationen (30, 75, 125, 250 und 500 µg/ml) vor und nach dem Cross-over (CO).....	92

Tab. 61: Übersicht über die mittlere Kotkonsistenz der beiden Fütterungsgruppen bzw. der beiden Würfe jeweils vor und nach dem Cross-over (CO) (n = 8)	94
Tab. 62: Übersicht über die prozentuale Verteilung der Fäzeskonsistenz (Grad 1 - 5) ¹ der Welpen der Gruppen 1 und 2 vor und nach dem Cross-over	95
Tab. 63: Übersicht über die prozentuale Verteilung der Fäzeskonsistenz (Grad 1 - 5) ¹ der Welpen der Würfe 1 und 2 vor und nach dem Cross-over.....	95
Tab. 64a: Scheinbare Verdaulichkeit (%) von Rohprotein, Rohfett, Rohfaser und Rohasche in den beiden Fütterungsgruppen bzw. der beiden Würfe jeweils vor und nach dem Cross-over (CO) (n = 8)	97
Tab. 64b: Scheinbare Verdaulichkeit (%) der Mineralstoffe Phosphor, Kalzium, Natrium und Kalium in den beiden Fütterungsgruppen bzw. der beiden Würfe jeweils vor und nach dem Cross-over (CO) (n = 8).....	98

Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Übersicht des Versuchsdesigns.....	43
---	----

1. EINLEITUNG

Das Immunsystem ist sehr komplex und besonders die immunologische Reaktion auf Futtermittelproteine ist schwerer zu diagnostizieren. Langwierige Eliminationsdiäten sind bis heute der Goldstandard bei der Identifizierung der allergieauslösenden Antigene. Allergiemarker (CD4⁺/Foxp3⁺-T-Lymphozyten) und spezifische IgE-ELISA-Tests sind zwar kommerziell erhältlich aber in der Spezifität und Sensitivität für eine verlässliche Diagnose noch zu unsicher. Andere diagnostische Methoden wie der antigeninduzierte Lymphozytenstimulationstest werden bereits in der Forschung der Humanallergologie erprobt und aufgrund der höheren Spezifität zum einen schon als mögliche Alternative für den IgE-ELISA und zum anderen sogar zur Vorhersage von Allergien bei Säuglingen diskutiert. Weiters ist unklar in welchem Alter Säuglinge und auch Hunde mit fester Nahrung konfrontiert werden sollten um das Risiko einer Allergieentwicklung zu minimieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden mögliche Effekte auf das Immunsystem, insbesondere mit Fokus auf die Sensibilisierung gegenüber den eingesetzten Futterproteinen, durch die Fütterung unterschiedlicher Proteinquellen (Hühnerprotein vs. Hühner-, Fisch- und Sojaprotein und Hüttenkäse) bei Beaglewelpen ab der dritten Lebenswoche untersucht. Eine vergleichbare Studie ist bislang nicht bei Hunden durchgeführt worden. Um mögliche Reaktionen des Immunsystems auf die Futterproteine nachweisen zu können, wurden Methoden ausgewählt, die beim Hund Aufschluss über die Immunantwort geben könnten. Hierzu erfolgte die Untersuchung eines möglichen Einflusses auf die Zusammensetzung des Blutes und auf die Verteilung der Lymphozytensubpopulationen (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺, CD5⁺/MHCII⁺, CD4⁺/Foxp3⁺). Weiterhin wurde die Stimulierbarkeit der Lymphozyten gegenüber Mitogenen (Con A, PHA, PWM) und Antigenen, bestehend aus Proteinextrakten der verwendeten Futtermittel (Hühner-, Fisch-, Sojaprotein und Hüttenkäse, Schweineprotein als Negativkontrolle) getestet. Weiterhin erfolgte die Dokumentation der scheinbaren Nährstoffverdaulichkeit zum Ende der jeweiligen Fütterungsperiode sowie die Aufzeichnung der altersabhängigen Veränderungen der immunologischen Parameter im Verlaufe des Versuches.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Aufbau des Immunsystems

Zum Immunsystem gehören mechanische und physiologische Barrieren wie Haut und Schleimhaut, sowie zelluläre und humorale Bestandteile, deren komplexes Zusammenspiel für die Abwehr von Infektionen von entscheidender Bedeutung ist. Hierbei wird zwischen der spezifischen (adaptiven) und unspezifischen (angeborenen) Immunantwort unterschieden (Walport et al., 2009).

2.1.1. Unspezifisches Immunsystem

Das angeborene Immunsystem besteht sowohl aus physiologischen Barrieren, wie den Epithelien, als auch aus phagozytierenden Zellen. Zu den zellulären Bestandteilen gehören Makrophagen, natürliche Killerzellen, Granulozyten (neutrophil, eosinophil, basophil) und dendritische Zellen. Komplettiert wird das angeborene Immunsystem durch eine Vielzahl von Effektormechanismen. Hierbei handelt es sich um die humoralen Komponenten des unspezifischen Immunsystems, bestehend aus dem Komplementsystem, den Akute-Phase-Proteinen und den löslichen Mediatoren (Zytokine) (Rink et al., 2011). Vom angeborenen Immunsystem gehen Signale aus, die über costimulatorische Moleküle zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems führen. Da das angeborene Immunsystem bereits wenige Stunden nach einer Infektion aktiviert wird, hat es die wichtige Aufgabe, während der ersten sieben Tage die bis zum Einsetzen der adaptiven Immunantwort vergehen können, die Infektion einzudämmen. Es kann jedoch im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem die Pathogene nicht spezifisch erkennen und somit keinen gezielten Schutz gegen eine erneute Infektion bieten (Walport et al., 2009).

2.1.2. Spezifisches Immunsystem

Die wesentlichen Bestandteile des adaptiven Immunsystems sind die antigenspezifischen Lymphozyten, die sich in die beiden Gruppen der T- und B-Lymphozyten aufteilen lassen und an der Zelloberfläche hochvariable Rezeptormoleküle exprimieren. Dabei unterscheidet man zwischen den Immunglobulinen (Antikörpern) auf der Oberfläche der B-Zellen und den antigenspezifischen Rezeptoren der T-Zellen (Walport et al., 2009). Im Rahmen der adaptiven Immunantwort wird eine Anpassung sowohl an Krankheitserreger als auch an Nahrungsproteine entwickelt. Die adaptive Immunantwort besitzt die Fähigkeit körperfremde von körpereigenen Strukturen zu unterscheiden und kann nicht nur Krankheitserreger eliminieren, sondern durch die Erzeugung von ausdifferenzierten Gedächtniszellen eine schnellere und wirksamere Reaktion bei einer erneuten Infektion ermöglichen (Rink et al.,

2011). Bis zum Einsetzen der spezifischen Immunantwort können einige Tage vergehen, da sich die wenigen T- und B-Zellen erst durch klonale Expansion vermehren müssen, bevor sie zu Effektorzellen differenzieren und die Erreger beseitigen. In vielen Fällen verleiht die Anpassung sogar eine lebenslange Immunität gegen eine erneute Infektion mit demselben Pathogen (Walport et al., 2009).

2.1.3. Zellen des Immunsystems

Alle Zellen des Immunsystems haben ihren Ursprung im Knochenmark und stammen dort alle aus einer gemeinsamen multipotenten hämatopoetischen Stammzelle ab. Diese kann sich entweder zu gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzellen oder zu myeloiden Vorläuferzellen differenzieren. Aus letztgenannten entstehen sowohl die verschiedenen Typen der Leukozyten, wie Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Mastzellen als auch die Erythrozyten und Thrombozyten. Aus den lymphatischen Vorläuferzellen entwickeln sich T- und B-Lymphozyten sowie natürliche Killerzellen (Rink et al., 2011). Lymphozyten besitzen die Fähigkeit, gegen Antigene eine spezifische Immunantwort auszulösen. Sie tragen an ihrer Oberfläche verschiedene Moleküle, die als CD (cluster of differentiation), bzw. Rezeptoren, die als TCR (t-cell antigen receptor) bzw. BCR (b-cell antigen receptor) bezeichnet werden (Tizard 2008). Der Unterschied zwischen den beiden Antigenrezeptoren besteht in der Zahl der Antigenbindungsstellen. Während der TCR nur eine Bindungsstelle besitzt, ist der BCR mit zweien ausgestattet (Tizard 2008). Der TCR erkennt im Gegensatz zum BCR Antigene von fremden Proteinen oder Pathogene. Natürliche Killerzellen tragen auf ihrer Oberfläche zwar aktivierende und hemmende Rezeptoren, aber keine antigenspezifischen Rezeptoren wie die Lymphozyten und gehören somit zum angeborenen Immunsystem. Diese Zellpopulation besitzt dennoch die Fähigkeit durch die Bindung bestimmter Kohlenhydratstrukturen auf der Oberfläche von Zellen, diese als virusinfiziert oder als Tumorzelle zu erkennen und durch zytotoxische Mechanismen zu eliminieren (Walport et al., 2009; Rink et al., 2011).

2.1.3.1. T-Lymphozyten

T-Lymphozyten entstehen im Knochenmark aus multipotenten Stammzellen. Diese entwickeln sich weiter zu lymphoiden Vorläuferzellen und reifen im Thymus zu den unterschiedlichen T-Zellpopulationen heran. Nach Abschluss des Reifungsprozesses gelangen sie ins Blutsystem und von dort aus in die peripheren lymphatischen Organe (Walport et al., 2009).

T-Zellen werden auf Grund der Struktur ihrer Oberflächenrezeptoren in zwei Subpopulationen unterteilt: $TCR\alpha/\beta$ und $TCR\gamma/\delta$. Ungefähr 90 bis 99 % aller im Blut zirkulierenden T-Zellen bei Menschen, Mäusen und anderen Säugetieren (außer Wiederkäuer) tragen den $TCR\alpha/\beta$ und nur ein Bruchteil der T-Zellen den $TCR\gamma/\delta$, die vorwiegend im darmassoziierten Lymphgewebe angetroffen werden (Walport et al., 2009). Versuche an Mäusen, bei denen die $\gamma\delta$ -T-Zellen v.a. in der Haut und im intraepithelialen Gewebe des Dünndarms registriert wurden und in Milz und Lymphknoten dagegen kaum anzutreffen waren, ließen die Vermutung zu, dass diese Zellen der ersten Abwehr dienen (Chien und Königshofer 2007).

T-Lymphozyten verkörpern die zellvermittelte Immunantwort und tragen zur Unterstützung der B-Lymphozyten in Form von CD4-T-Helferzellen und CD8-zytotoxischen-T-Zellen bei.

2.1.3.1.1. MHCII-Moleküle und T-Helfer-Zellen

Als MHC-Klassen-Moleküle (major histocompatibility complex) bezeichnet man heterodimere peptidbindende Glykoproteine, die in zwei Isotypen exprimiert werden, MHCI und MHCII und die sich in ihrer Zellverteilung unterscheiden.

In die Gruppe der MHC-II-positiven antigenpräsentierenden Zellen gehören Immunzellen wie dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten, die von CD4-T-Helferzellen erkannt werden. Die Hauptfunktion der T-Helferzellen besteht darin, nach Erkennung spezifischer Peptide auf den antigenpräsentierenden Zellen, Effektorzellen wie B-Lymphozyten und Makrophagen zu aktivieren. Das MHCII-Molekül präsentiert exogene Antigene, wie z.B. Peptide von Krankheitserregern, die in Vesikeln der Makrophagen existieren oder die von B-Lymphozyten aufgenommen wurden. Zunächst erfolgt die Antigen-Endozytose, anschließend die Ansäuerung im Endosom und der Abbau des Antigens. Daraufhin folgt die Spaltung der Proteine und deren Lagerung in Vesikeln und im Anschluss der Transport ins Endoplasmatische Retikulum, wonach sie auf der Zelloberfläche fest gebunden an den MHCII-Komplex präsentiert werden. Dieser MHCII-Rezeptor wird von CD4-T-Helferzellen

abgetastet und bei Erkennung eines fremden Antigens werden die B-Zellen aktiviert und zur Antikörperproduktion angeregt, um eine Eliminierung zu bewirken (Walport et al., 2009).

Beim Hund wurden zwei Subtypen der MHCII-Moleküle festgestellt. Einer davon wird sowohl von aktivierten und inaktiven T-Lymphozyten als auch von B-Lymphozyten exprimiert. Die zweite Unterklasse wurde nur auf B-Zellen und aktivierten T-Lymphozyten detektiert (Doveren et al., 1986). Bei Katzen (Rideout et al., 1992) und Pferden (Crepaldi et al., 1986) werden MHCII-Moleküle von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Makrophagen exprimiert. Inaktivierte humane T-Lymphozyten bilden dagegen keine MHCII-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche aus (Holmes und Lunn 1994). Des Weiteren konnte die MHCII-Expression auf caninen Lymphozyten mittels eines monoklonalen Antikörpers (CVS20⁺) von der Geburt bis zu einem Alter von acht Monaten verfolgt werden und in diesem Zeitraum ein Anstieg der MHCII-Expression festgestellt werden (Holmes und Lunn 1994). Allerdings ist die genaue Funktion der MHCII-Moleküle auf T-Lymphozyten bei dieser Spezies noch nicht bekannt (Rideout et al., 1992).

Eine T-Zelle befindet sich zunächst in einem naiven Zustand. Bindet jedoch der T-Zellrezeptor an ein peptidbeladenes MHCII-Molekül, differenziert sich die naive T-Zelle unter Mitwirkung von Zytokinen zur T-Helferzelle. Die aktivierten CD4⁺-T-Zellen sezernieren Zytokine, welche wiederum B-Lymphozyten und CD8⁺-T-Zellen aktivieren (Balkwill und Burke 1989). Die CD4-T-Helferzellen lassen sich durch das Zytokinmuster, das sie sezernieren, weiter unterteilen in Th1- und Th2-Zellen (Coffman und Mosmann 1991). Makrophagen und dendritische Zellen schütten nach Stimulation durch Mikroorganismen Interleukin-12 (IL-12) aus. Th1-Zellen sezernieren wiederum die Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF- α . Damit aktivieren sie die zelluläre Antwort und induzieren eine Ansammlung von Makrophagen am Infektionsherd. Den Zytokinen obliegt hierbei eine wichtige Funktion. TNF- α wird von Th1-Zellen ausgeschüttet und aktiviert die Makrophagen, während IFN- γ zur Differenzierung von B-Zellen führt, das Wachstum von Th2-Zellen hemmt und ebenfalls zur Aktivierung von Makrophagen und zu einer gesteigerten MHCI- und MHCII-Expression auf der Zelloberfläche von Makrophagen beiträgt (Walport et al., 2009). Th2-Zellen produzieren die Zytokine IL-4, IL-5, IL-10, die zur Aktivierung von B-Zellen und zur Antikörpersynthese von B-Lymphozyten führen (Hodgkin et al., 1991). Den Zytokinen IL-4 und IL-10 wird eine Rolle bei der Induktion der MHCII-Expression zugesprochen. Des Weiteren soll IL-10 die Aktivierung und Vermehrung von Th1-Zellen hemmen und somit der Aktivierung der Makrophagen entgegenwirken und IL-5 die Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen stimulieren (Walport et al., 2009).

2.1.3.1.2. MHC I-Moleküle und zytotoxische T-Zellen

MHC I-antigenpräsentierende Zellen stellen alle kernhaltigen Zellen des Körpers dar. Sie präsentieren ausschließlich endogene Antigene auf der Zelloberfläche über den MHC I Komplex. Diese endogenen Antigene können Peptide von Proteinen sein, die im Zytosol synthetisiert werden, wie z.B. Fragmente von viralen Proteinen oder sich im Zytosol vermehrende Bakterien (Walport et al., 2009). Zytotoxische T-Zellen sind in der Lage, mit ihrem CD8-Oberflächenantigen Peptide zu erkennen, die an einen MHC I-Komplex gebunden sind. Nach Erkennung eines solchen Fremdartigens wird die Zerstörung der antigenträgenden Zellen induziert (Walport et al., 2009).

2.1.3.2. B-Lymphozyten

B-Lymphozyten entstammen der multipotenten hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark, diese differenziert sich weiter zur lymphoiden Vorläuferzelle, welche ihren Reifungsprozess zu B-Lymphozyten vollständig im Knochenmark vollzieht (Rink et al., 2011).

Die Stimulation der B-Lymphozyten führt zur Differenzierung der CD4-T-Zellen zu T-Helfer-2-Zellen. Dies wiederum hat die Ausschüttung von IL-4 und IL-13 zur Folge, welche die humorale Antwort der B-Zellen stimulieren, sich zu Plasmazellen zu differenzieren und nachfolgend zur Bildung von Antikörpern fähig zu sein.

B-Zellen besitzen auf ihrer Zelloberfläche einen B-Zellrezeptor. Dies ist ein membranständiger Antikörper, den die B-Zelle nach ihrer Aktivierung und Differenzierung zu einer Plasmazelle sezerniert. Dockt dort ein Antigen an, nehmen B-Zellen den Antigen-Antikörper-Komplex durch Endozytose auf. Dies führt zur Proteolyse des Antigens und zur Präsentation von Antigen-Fragmenten über den MHC II-Rezeptor an der Zelloberfläche (Walport et al., 2009).

2.2. Immunologische Differenzierung von Leukozyten im peripheren Blut von Hunden

Die immunologische Differenzierung von Leukozyten in ihre Subpopulationen erfolgt durch Zelloberflächenmoleküle, die mittels Bindung spezifischer monoklonaler Antikörper identifiziert werden können. Sie werden als CD-Moleküle (cluster of differentiation) bezeichnet und in der Reihenfolge ihrer zeitlichen Entdeckung nummeriert.

Tab. 1 : Ausgewählte Oberflächenantigene und ihre Funktion beim Hund

Oberflächenantigen	Antigenexprimierende Zellen	Funktion
CD3	T-Lymphozyten	Zelloberflächenexpression und Signalübertragung des T-Zellrezeptors
CD4	T-Helferzellen Polymorphkernige Granulozyten	Corezeptor für MHC-II
CD5	Alle T-Lymphozyten	Thymozytenreifung, T-Zellinteraktion, CD3-abhängige T-Zellstimulation
CD8	Zytotoxische T-Zellen	Corezeptor für MHC-I
CD21	B-Lymphozyten	Rezeptor für die Komplementkomponente C3d
MHC-II	B- und T-Zellen	Präsentation exogener Antigene an CD4-T-Zellen

Quelle : Cobbold und Metcalfe (1994), Tizard (2008), Walport et al. (2009), Gauthier et al. (2005)

2.2.1. Canines CD3-Oberflächenantigen

CD3 Moleküle sind nur auf der Oberfläche von T-Zellen zu finden (Tizard 2008). Es ist ein Trimer mit einer α - (25-28 kD), β - (20 kD) und γ - (20 kD) Einheit. Das Molekül ist mit dem Antigenrezeptor von T-Zellen (TCR) assoziiert und notwendig für die Zelloberflächenexpression und Signalübertragung des T-Zell-Rezeptors, wenn ein Antigen gebunden ist (Walport et al., 2009) (Tab.1).

2.2.2. Canines CD4-Oberflächenantigen

Das 59 kD große CD4-Glykoprotein ist üblicherweise auf T-Helferzellen sowie Thymozyten und Monozyten zu finden und stellt einen spezifischen MHCII-Molekül-Rezeptor dar (Tizard 2008) (Tab.1). Bei Hunden wurde diesbezüglich jedoch eine Ausnahme entdeckt. Hier wird das CD4-Oberflächenprotein auch in großen Mengen auf Granulozyten exprimiert und stabilisiert als T-Zell-Corezeptor die Interaktion zwischen dem T-Zell-Rezeptor und den MHC-II-tragenden Zellen (Williams 1997). Die genaue Funktion der MHCII-Moleküle auf den neutrophilen Granulozyten ist jedoch noch ungeklärt (Cobbold und Metcalfe 1994).

2.2.3. Canines CD5-Oberflächenantigen

Das canine CD5-Oberflächenantigen mit einem Molekulargewicht von 67 kD ist im Gegensatz zum Menschen oder Nager ein spezieller Marker für T-Lymphozyten, da es ausschließlich von diesen Zellen exprimiert wird. Es wird zwischen schwach und stark exprimierenden T-Zellsubpopulationen unterschieden. Die schwach exprimierenden Zellen wurden als $\gamma\delta$ -T-Zellen oder Natürliche Killerzellen vermutet (Cobbold und Metcalfe 1994), die bei Hunden frühestens mit einem Alter von drei Wochen nachgewiesen werden können (Faldyna und Toman 1998).

2.2.4. Canines CD8-Oberflächenantigen

Das CD8-Oberflächenantigen ist ein dimeres Glykoprotein, bestehend aus zwei Einheiten, CD8 α und CD8 β , mit einem Molekulargewicht von 32-34 kD. Dieses Protein wird von zytotoxischen T-Zellen exprimiert und dient als T-Zell-Co-Rezeptor für MHC-I-Moleküle (Tizard 2008; Walport et al., 2009).

2.2.5. Canines CD21-Oberflächenantigen

Das 145 kD große CD21-Glykoprotein wird als Oberflächenmolekül hauptsächlich von reifen B-Zellen, aber auch von einigen T-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert und dient als Rezeptor für die Komplementkomponente C3d (Tizard 2008). Es wird aber auch von Granulozyten und Monozyten exprimiert (Cobbold und Metcalfe 1994).

2.3. Entwicklung der Lymphozytenpopulationen beim Neonaten

Hunde sind multipar mit einer Tragezeit von 60 bis 63 Tagen. Der Thymus ist das erste lymphatische Organ, das sich im Fetus entwickelt. Die Thymusdifferenzierung beginnt am 27. Gestationstag mit dem sichtbar werden der Primordialanlagen. Er wird zwischen dem 35. und 40. Gestationstag lymphopoetisch aktiv und erreicht bis zum 45. Gestationstag seinen normalen postnatalen histologischen Aufbau (Kelly 1963; Bryant und Shifrine 1972). Dem Thymus folgen die sekundären lymphatischen Organe. Eine lymphozytäre Infiltration der Lymphknoten ist zwischen dem 45. und 52. Gestationstag und die Infiltration der Milz zwischen dem 50. und 55. Tag zu verzeichnen (Bryant und Shifrine 1972). Der Thymus besteht zu 12 % aus CD4 und zu 3 % aus CD8-T-Zellen (Somberg et al., 1994). Nach der Geburt erfolgt ein rasches Größenwachstum von Milz und Thymus mit einem sprunghaften Anstieg der absoluten Organgewichte ab einem Alter von zwei Monaten. Das Maximalgewicht wird im Alter von sechs Monaten erreicht (Yang und Gawlak 1989). Anschließend erfolgt eine lineare Thymusinvolution zwischen dem 6. und 23. Lebensmonat (Ploemen et al., 2003). Hieraus folgt eine Abnahme in der Produktion und Aktivität der Thymushormone (u.a. Thymosin und Thymulin), die eine tragende Rolle in der Differenzierung der T-Lymphozyten einnehmen, wie die Phänotypentwicklung der T-Zellen und die Modulation der peripheren T-Zell-Antworten (Berthiaume et al., 1999; Dall'Ara 2003).

In einer weiteren Studie wurde ebenfalls der Einfluss des Alters auf die Lymphozytensubpopulationen untersucht (Faldyna und Toman 1998). Hierbei waren achtzehn Beaglewelpen, die bis zum Alter von sechs Monaten untersucht wurden und zwölf adulte Hunde beteiligt. Am ersten Tag nach der Geburt konnte die Hälfte aller Lymphozyten als CD21-positiv und fast alle CD5⁺-T-Zellen im peripheren Blut als CD4-positiv nachgewiesen werden. Die größte Veränderung war bei den CD21⁺-B-Zellen zu verzeichnen. Im Laufe der ersten Lebenswoche erfolgte ein Anstieg der Lymphozyten, insbesondere der relativen Zahl der CD21-positiven Zellen. Ein deutlicher Abfall sowohl der prozentualen als auch der absoluten Zahlen der CD21⁺-Zellen war zwischen drei Monaten und ein bis zwei Jahren zu dokumentieren. Die relative Anzahl der CD8⁺-T-Zellen war zu Beginn recht niedrig, deren Zahl stieg jedoch mit zunehmendem Alter und während der gesamten Versuchsdauer an, während die relative Zahl der CD4⁺-T-Zellen sehr variabel war. Die Neutrophilenpopulation sank in den ersten Wochen bei gleichzeitigem Anstieg der Lymphozytenkonzentration (Faldyna und Toman 1998).

In einem weiteren Versuch wurde neben dem Einfluss des Geschlechts, der Rasse und der Art der Lymphozytenisolierung auch der Einfluss des Alters auf die Lymphozytensubpopulationen berücksichtigt (Faldyna et al., 2001). Für den Rassenvergleich wurden adulte Hunde im Alter zwischen ein und fünf Jahren der Rassen Beagle, Deutscher Schäferhund, Dalmatiner und Dackel verwendet. Aufgrund der Resultate konnten die Rassen in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Hohe Leukozytenwerte wiesen Dalmatiner ($10,07 \pm 2,29 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$) und Beagles ($10,37 \pm 1,54 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$) auf, während niedrigere Leukozytenzahl bei Dackeln ($8,91 \pm 1,67 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$) und Deutschen Schäferhunden ($9,58 \pm 2,32 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$) zu verzeichnen waren. Deutsche Schäferhunde zeigten weiterhin einen Anstieg der relativen CD8⁺-Werte während bei Dackeln ein Absinken der CD8⁺-Werte zu verzeichnen war. Die relativen CD4⁺-Werte zeigten bei beiden Rassen einen Anstieg (Faldyna et al., 2001).

In Studien, bei denen ein Alterseffekt auf die Lymphozytensubpopulationen bei Beaglewelpen vom Tag der Geburt bis zu einem Alter von drei Monaten im Vergleich zu adulten Hunden (1 - 8 Jahre) untersucht wurde, konnte festgestellt werden, dass Welpen in den ersten drei Lebensmonaten eine höhere Lymphozytenkonzentration als adulte Hunde aufweisen, sich darunter aber verhältnismäßig mehr CD21⁺-B-Zellen als bei adulten Hunden (1 - 2 Jahre) finden (Faldyna et al., 2001; Toman et al., 2002; Faldyna et al., 2005). Die Resultate zeigten weiterhin, dass der prozentuale Anteil der Lymphozyten an den Gesamtleukozyten bis zu einem Alter von sechs Monaten sinkt. Der prozentuale Anteil der CD8⁺-T-Lymphozyten stieg in den ersten drei Lebensmonaten an. Die absoluten Zahlen dagegen erhöhten sich nicht signifikant. Der relative Anteil der CD4⁺- T-Zellen unterlag in dieser Studie keinen altersbedingten Schwankungen, wohingegen bei den absoluten Zahlen eine Abnahme zu verzeichnen war. Sowohl die prozentualen als auch die absoluten Zahlen der CD21⁺-B-Zellen sanken altersabhängig (Faldyna et al., 2001).

In den ersten sechs Monaten haben Hunde höhere relative Werte an CD4⁺-T-Zellen als ältere Hunde. Diese Konstellation führt zu einer erhöhten CD4⁺/CD8⁺-Relation. Mit einem Alter von zehn bis zwölf Monaten nehmen die CD4⁺-T-Zellen ab, gleichzeitig nehmen die CD8⁺-T-Zellen zu. Daraus resultiert eine CD4⁺/CD8⁺-Relation in einem Bereich von 1:5-1:2 (Felsburg 2002).

Die Lymphozytenzusammensetzung innerhalb verschiedener Kompartimente (Blut, Lymphknoten, Milz) zeigt bei Welpen sowohl im Blut als auch in der Milz verhältnismäßig weniger CD3⁺-T-Lymphozyten, aber mehr CD21⁺-B-Zellen als beim adulten Hund. Die Mehrheit der T- und B-Lymphozyten beim Neonaten sind noch immatur und naiv (HogenEsch et al., 2004; Faldyna et al., 2005).

Vor der Geburt sind im peripheren Blut des Fetus viele unausgereifte B-Zellen nachzuweisen. Es ist anzunehmen, dass die immaturren B-Zellen vom Knochenmark über das Blutsystem in das primäre B-lymphopoetische Organ, die Milz, wandern. Dies würde erklären, warum noch beim Neonaten zu Beginn relativ viele CD21⁺-B-Zellen im Blut und in der Milz anzutreffen sind, die zu reifen B-Zellen differenzieren. Nicht ausgereifte B-Zellen durchlaufen zunächst eine negative Selektion in der Milz und rezirkulieren anschließend zu den Lymphknoten. In Lymphknoten dominieren dagegen zunächst naive T-Zellen (Faldyna 2005). Während der Neonatalphase sind mehr als 90 % der T-Zellen naive CD45RA⁺-T-Zellen. Nach vier Monaten erfolgt eine Phänotypkonversion zu CD45RA⁻-T-Zellen und die Zahl der peripheren aktivierten CD45RA⁺-T-Zellen sinkt auf 40 - 50 % ab (Somberg et al., 1996). Wird nach der Geburt das Immunsystem aktiviert, erfolgt die Rezirkulierung der T-Zellen und ein Anstieg deren Zahl in Blut und Milz, welches den prozentualen Anstieg der CD3⁺-T-Lymphozyten in Milz und Blut mit zunehmendem Alter erklärt (Faldyna et al., 2005).

Benyacoub et al. (2003) untersuchten in ihrer Studie Hundewelpen ab einem Alter von acht Wochen und führten Fütterungsversuche mit dem *Enterococcus faecium* Stamm SF68 durch, um einen immunstimulierenden Effekt nachzuweisen. Sie ermittelten keine signifikanten Unterschiede in der prozentualen Verteilung der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen oder in der CD4⁺/CD8⁺-Relation gegenüber der Kontrollgruppe. Allerdings stellte sich heraus, dass die CD21⁺/MHCII⁺ (ausgereifte B-Zellen) und die MHCII-Expression durch Monozyten in der mit *E. faecium* supplementierten Gruppe höher waren als in der Kontrollgruppe.

2.4. Lymphozytensubpopulationen beim adulten Hund

In einer Studie zu möglichen Alterseffekten auf das Immunsystem, wurden 47 Labrador Retriever gemäß ihren Alters in drei Gruppen eingeteilt: Jung (2,4 Jahre), mittelalt (5,8 Jahre) und alt (9,1 Jahre). Zwischen der jungen und mittelalten Gruppe erfolgte ein Abfall der B-Lymphozytenpopulation bei gleichzeitigem Anstieg der T-Lymphozyten. Der Lymphozytenanstieg war das Resultat der ansteigenden CD8⁺-T-Lymphozyten bei unveränderter CD4⁺-Konzentration (Greeley et al., 1996) (Tab. 3).

Sowohl Byrne et al. (2000) und Faldyna et al. (2001) als auch HogenEsch et al. (2004) bestätigten den Einfluss des Alters in ihren Studien, wobei ältere Hunde höhere relative Zahlen an CD3⁺-T-Zellen, niedrigere CD4⁺-T-Zellen und mehr CD8⁺-T-Zellen aufwiesen, einhergehend mit einer verkleinerten CD4⁺/CD8⁺ Relation im Vergleich zu den jüngeren Hunden (Tab. 2 und 3). Gomes et al. (2011) konnten ebenfalls altersabhängige Veränderungen der Lymphozytensubpopulationen nachweisen. Hierbei hatten zehn Jahre alte Beagle signifikant niedrigere CD5⁺-T-Lymphozyten, CD8⁺-T-Lymphozyten und CD21-B-Lymphozyten als Beagle im Alter von vier Jahren (Tab. 3).

In einer Langzeitstudie wurden 23 Labrador Retriever über acht Jahre lang im Alter von vier bis elf Jahren beprobt und die Entwicklung der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut verfolgt (Greeley et al., 2001). Im Alter von sieben bis elf Jahren war ein signifikanter Abfall der absoluten Lymphozytenzahlen von $\log 3,35 \pm 0,06/\text{mm}^3$ im Alter von sieben Jahren auf $\log 3,13 \pm 0,08/\text{mm}^3$ im Alter von elf Jahren zu beobachten. Unter den Lymphozytensubpopulationen nahmen die prozentualen Anteile der B-Zellen in den acht Jahren der Studie bei beiden Geschlechtern von 16 % auf 10 % ab, während die Zahl der T-Zellen in diesem Zeitraum nur bei den weiblichen Hunden einen Anstieg von 85 % auf 92 % verzeichnen ließen (Greeley et al., 2001).

Tab. 2: Gesamtlymphozyten und Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut von Hunden unterschiedlichen Alters (MW \pm SD)

Alter	Einheit	Gesamtlymphozyten	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD21 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	Referenzen
1 d	%		55,8 \pm 8,5	47,5 \pm 4,2	5,1 \pm 1,1	36,2 \pm 2,8	9,5 \pm 1,5	Faldyna et al. (2001)
				47,9 \pm 6,1	36,9 \pm 5,2	2,7 \pm 0,4	41,9 \pm 1,3	
5-6d	%	48,3 \pm 4,1		45,6 \pm 7,9	7,7 \pm 3,4	39,5 \pm 5,7	7,0 \pm 3,3	Faldyna et al. (2001, 2005)
	10 ⁹	5,51 \pm 1,22		2,51 \pm 0,74	0,41 \pm 0,17	1,66 \pm 0,58		
1 Wo			68,1 \pm 7,1	48,8 \pm 8,0	5,9 \pm 3,6	31,5 \pm 6,2		
2 Wo	%		57,1 \pm 10,3	42,3 \pm 6,8	9,5 \pm 2,3	35,2 \pm 9,0		Toman et al. (2002)
3 Wo			55,2 \pm 7,6	35,6 \pm 9,5	13,8 \pm 2,5	41,2 \pm 9,8		
4 Wo				56,4 \pm 5,0	42,1 \pm 6,3	10,1 \pm 3,6	42,7 \pm 8,7	
8 Wo	%	41,1 \pm 9,3		42,2 \pm 8,9	7,4 \pm 3,2	32,6 \pm 6,3	6,6 \pm 3,1	Faldyna et al. (2001, 2005)
	10 ⁹	5,02 \pm 0,92		2,15 \pm 0,74	0,37 \pm 0,20	1,63 \pm 0,42		
12 Wo	%		64,4 \pm 9,2	39,4 \pm 7,9	12,8 \pm 3,5	34,5 \pm 9,2		Toman et al. (2002)
24 Wo	%	24,6 \pm 3,0		45,4 \pm 2,0	12,2 \pm 2,5	22,0 \pm 5,9	3,8 \pm 0,7	Faldyna et al. (2001, 2005)
	10 ⁹	3,93 \pm 0,61		1,79 \pm 0,29	0,48 \pm 0,10	0,89 \pm 0,36		
	%			32,3 \pm 2,5	18,3 \pm 3,2	18,1 \pm 4,2	1,7 \pm 0,4	
1-2 J	%	27,8 \pm 5,4	81,7 \pm 5,8	45,9 \pm 7,4	18,9 \pm 3,3	14,8 \pm 4,0	2,5 \pm 0,6	Faldyna et al. (2001, 2005)
	10 ⁹	2,96 \pm 0,54	2,42 \pm 0,50	1,34 \pm 0,28	0,56 \pm 0,15	0,43 \pm 0,10		

Tab. 3: Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut von adulten Hunden

(in %; MW \pm SD)

Alter in Jahren Referenzen	CD3 ⁺	CD5 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD21 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
1,-2,5						
Greeley et al. (1996)	78,6 \pm 4,8		46,8 \pm 4,8	24,8 \pm 7,0	16,3 \pm 4,0	
Byrne et al. (2000)	79,5 \pm 2,5		45,1 \pm 5,4	17,0 \pm 5,5	22,7 \pm 5,2	3,17 \pm 0,96
Faldyna et al. (2001)	81,7 \pm 5,8		45,9 \pm 7,4	18,9 \pm 3,3	14,8 \pm 4,0	2,5 \pm 0,6
Toman et al. (2002)	81,7 \pm 5,8		45,9 \pm 7,4	18,9 \pm 3,3	14,8 \pm 4,0	
Massimino et al. (2003)	63,3		34,7	10,5	27,9	2,3
Hellweg et al. (2008)		82,2 - 84,6	47,7-50,9	20,7-21,7	14,7-15,4	2,34-2,48
3-6						
Dirscherl et al. (1995)		71,0 \pm 10,4	40,0 \pm 7,5	19,0 \pm 3,6		2,2 \pm 0,3
Greeley et al. (1996)	86,1 \pm 4,4		44,6 \pm 6,5	33,4 \pm 6,0	11,4 \pm 4,2	
Faldyna et al. (2001)	83,7 \pm 5,5		45,5 \pm 7,5	17,5 \pm 5,8	11,4 \pm 3,8	2,8 \pm 0,8
HogenEsch et al. (2004)	83		48	18	16	3,0 \pm 0,2
Reis et al. (2005)		73,8 - 74,6	44,6-46,4	26,7-28,9	10,1-14,9	
Gomes et al. (2011)*		845	396	188	184	
7-12						
Greeley et al. (1996)	85,7 \pm 3,6		43,0 \pm 4,7	29,0 \pm 6,8	12,4 \pm 4,6	
Byrne et al. (2000)	79,5 \pm 1,5		30,9 \pm 8,7	18,9 \pm 8,0	13,8 \pm 2,5	2,21 \pm 1,41
Faldyna et al. (2001)	83,6 \pm 5,3		40,3 \pm 4,2	23,1 \pm 3,8	15,0 \pm 6,3	1,8 \pm 0,5
Massimino et al. (2003)	64,5		22,5	17,2	15,0	1,2
HogenEsch et al. (2004)	85		40	30	13	1,8 \pm 0,2
Faldyna et al. (2005)	83,9 \pm 1,7		58,6 \pm 3,7	15,1 \pm 4,4	15,7 \pm 1,8	4,1 \pm 1,1
Gomes et al. (2011)*		609	389	117	83	

* Werte in Zellen / μ l

2.5. Aktivierung von Lymphozyten

Lymphozyten werden aktiviert, wenn sie über den Antigenrezeptor an das komplementäre Antigen binden. T-Zellen können mit ihrem spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) nur von antigenpräsentierenden Zellen prozessierte Antigene erkennen, die anschließend in Form von Peptidfragmenten auf körpereigenen MHC-Molekülen präsentiert werden. B-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche Immunglobuline (Antikörper) die an Proteinstrukturen auf der Oberfläche von Zellen, Bakterien und Parasiten binden können. Zusätzlich ist neben der Rezeptorbindung ein costimulatorisches Signal für die Proliferation und Differenzierung der Lymphozyten erforderlich (Clough und Roth 1998; Rink et al., 2011). Für T-Lymphozyten stellt IL-2 dieses zusätzliche Aktivierungssignal dar, welches die aktivierten T-Zellen selbst bilden. Ruhende T-Zellen exprimieren einen IL-2-Rezeptor geringer Affinität, im Gegensatz zu aktivierten Lymphozyten, die einen hochaffinen Rezeptor exprimieren und zusätzlich selbst IL-2 sezernieren (Walport et al., 2009). Ruhende Lymphozyten befinden sich in der G_0 -Phase (wenig affiner IL-2 Rezeptor). Mit der Aktivierung durch das Zusammentreffen mit einem Peptid/MHC-Komplex bei gleichzeitiger Costimulation gehen sie in die G_1 -Phase über, die sich durch eine gesteigerte RNA-Synthese sowie einen hochaffinen IL-2-Rezeptor und zusätzliche endogene IL-2-Bildung auszeichnet. Mit dem Übertritt in die S-Phase beginnt die DNA-Synthese. Bevor sich die Zellen schließlich in der M-Phase teilen, durchlaufen sie die Interphase, die allerdings auch übersprungen werden kann. Wird ein Antigen ohne den costimulierenden Faktor IL-2 erkannt, erfolgt die Inaktivierung der naiven T-Zellen und die anschließende Anergie. Somit können sie kein IL-2 mehr produzieren und bei einem Zusammentreffen mit einem Antigen nicht mehr proliferieren. Sind T-Zellen allerdings zu Effektorzellen proliferiert, dann ist keine weitere Costimulation durch IL-2 beim nächsten Zusammentreffen mit einem Antigen nötig (Walport et al., 2009).

Die Aktivierung der B-Zellen erfolgt durch ein Antigen und zusätzlich durch Signale von T-Helferzellen. Hierbei dockt eine $CD4^+$ -T-Helferzelle mit dem Peptid/MHCII-Komplex an den BCR der B-Zellen an. Dieser wiederum sendet Aktivierungszytokine an die B-Zellen, die sich zu Plasmazellen differenzieren und lösliche Immunglobuline bilden (Walport et al., 2009; Rink et al., 2011).

Polyklonale Mitogene lösen bei kultivierten Lymphozyten die Mitose aus und scheinen dieselben Wachstumsreaktionen zu stimulieren wie ein Antigen. Normalerweise befinden sich Lymphozyten in der G₀-Phase des Zellzyklus. Nach mitogener Stimulation treten sie in die G₁-Phase ein und durchlaufen den gesamten Zellzyklus. Als lymphoproliferative Mitogene werden Lektine verwendet, die spezifisch an die Membran-Glykoproteine der Lymphozyten reversibel binden. Hierzu gehören die aus Leguminosen extrahierten Mitogene Phytohämagglutinin (PHA), Concanavalin A (Con A) und Pokeweed Mitogen (PWM). Sie bewirken Agglutinationen, in deren Folge es zur Zellaktivierung und Proliferation kommt (Zhang et al., 2009). PHA stammt u.a. aus der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) und stimuliert die T-Zellen mit einem geringen Effekt auf B-Zellen (Tizard 2008; Zhang et al., 2009). Con A wird aus der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*) isoliert und stimuliert selektiv die T-Zellen und PWM hat seinen Ursprung in der Kermesbeere (*Phytolacca americana*) und stimuliert sowohl T- als auch B-Zellen (Walport et al., 2009; Zhang et al., 2009).

2.5.1. Lymphoproliferative Aktivität bei Hunden unterschiedlichen Alters

Die proliferative Aktivität von T-Lymphozyten (stimuliert mit PHA 1:400) bei neugeborenen Hundewelpen (0 - 4 Wochen) war niedriger als bei adulten Hunden (Gerber und Brown 1974). Daraufhin zeigte sich ein signifikanter Anstieg der T-Lymphozytenaktivität bei Welpen im Alter zwischen vier und sechs Wochen. Die maximale Aktivität konnte zwischen sechs Wochen und sechs Monaten festgestellt werden. Anschließend zeigte sich wieder eine deutliche Abnahme der T-Lymphozytenaktivität, wobei die Autoren als mögliche Ursache die Abnahme der T-Lymphozyten durch Involution des Thymus vermuteten. Eine ähnliche Beobachtung machten auch Somberg et al. (1996). Sie stellen fest, dass die proliferative Aktivität der Lymphozyten bei neugeborenen Welpen 50 % niedriger war gegenüber adulten Hunden und dass sich die Aktivität mit einem Alter von 24 Wochen an das Niveau adulter Hunde angepasst hat. Toman et al. (2002) dokumentierten eine höhere lymphoproliferative Aktivität bei Welpen im Alter zwischen drei und sieben Tagen im Vergleich zu den Welpen im Alter zwischen drei Wochen und drei Monaten (Tab. 6 und 7).

In einer weiteren Studie wurde neben der Entwicklung der Lymphozytensubpopulationen die Lymphozytenstimulation nicht nur im peripheren Blut, sondern auch in lymphatischen Organen wie Milz, Mesenterial- und Popliteallymphknoten bei Hundewelpen im Alter von einem Tag bis zu einem Monat im Vergleich zu adulten Hunden (7 - 10 Jahre), die auf Grund orthopädischer oder cardialer Störungen euthanasiert wurden, bestimmt (Faldyna et al., 2005). Hierzu wurden die Mitogene PHA (40 µg/ml), Con A (10 µg/ml) und PWM (10 µg/ml) verwendet. Welpen, einen Tag post natum, wiesen in der Milz (9000 ΔCPM) und den Lymphknoten (1800 ΔCPM) eine deutlich höhere proliferative Aktivität als im peripheren Blut (800 ΔCPM) auf, die diese Aktivität reduzierte sich ab einem Alter von zwei Wochen deutlich und erreicht im Adultstadium Werte von ca. 1000 ΔCPM in der Milz, 500 ΔCPM in den Lymphknoten und 100 ΔCPM im peripheren Blut (Faldyna et al., 2005).

Weiterhin wurde die altersabhängige lymphoproliferative Aktivität im peripheren Blut von 47 Labrador Retrievern untersucht (Greeley et al., 1996). Hierzu wurden sie ihrem Alter entsprechend in drei Gruppen eingeteilt: jung (2,4 Jahre), mittelalt (5,8 Jahre) und alt (9,1 Jahre). Die jüngeren und mittelalten Hunde zeigten eine deutlich stärkere proliferative Aktivität nach Stimulation durch vier Mitogene als die älteren Hunde in dieser Studie (Greeley et al., 1996) (Tab. 4).

Tab. 4 : Der Einfluss des Alters auf die proliferative Aktivität von Lymphozyten im peripheren Blut von Hunden (Greeley et al., 1996)

Mitogen ¹	Proliferative Aktivität [Δ CPM \pm SD] ²		
	Jung (2,4 J)	Mittelalt (5,8 J)	Alt (9,1 J)
Con A (6 µg/ml)	68000 \pm 22000	57000 \pm 21000	38000 \pm 15000
PHA (25 µg/ml)	49000 \pm 18000	30000 \pm 15000	20000 \pm 9000
PWM (1:250)	19000 \pm 9000	18000 \pm 8000	10000 \pm 7000
SEB (10 µg/ml)	14000 \pm 6000	n.d.	8000 \pm 4000

¹ Con A = Concanavalin A, PHA = Phytohämagglutinin, PWM = Pokeweed Mitogen, SEB = Staphylococcus Enterotoxin B, n.d. = nicht determiniert

² ΔCPM = Mittlere counts per minute

In einer Langzeitstudie wurden 23 Labrador Retriever über acht Jahre im Alter von vier bis elf Jahren beprobt und neben der oben bereits beschriebenen Entwicklung der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut auch die Reaktion der Lymphozyten auf die Stimulation durch Mitogene verfolgt. Die Stimulierbarkeit von Lymphozyten mit den Mitogenen Con A, PHA und PWM nahm signifikant im Alter von vier bis elf Jahren ab (Greeley et al., 2001) (Tab. 5).

Tab. 5: Der Einfluss des Alters auf die proliferative Aktivität von Lymphozyten im peripheren Blut von Hunden (Greeley et al., 2001)

Mitogen ¹	Proliferative Aktivität [CPM] ²	
	4 Jahre	11 Jahre
PHA	4,5	4,2
PWM	4,2	4,0
Con A	4,75	4,5

¹Con A = Concanavalin A, PHA = Phytohämagglutinin, PWM = Pokeweed Mitogen,

²CPM = Counts per minute

Tab. 6: Die proliferative Aktivität von Lymphozyten im peripheren Blut bei Hundewelpen am ersten Lebenstag (Faldyna et al., 2005)

Mitogene ¹	Proliferative Aktivität (MW ± SD) ²	
	[CPM] ³	[SI] ³
Kontrolle	758 ± 594	
Con A ⁴	4202 ± 1746	6.5 ± 1.6
PHA ⁵	1915 ± 1627	2.5 ± 0.9
PWM ⁶	1715 ± 516	3.7 ± 1.1

¹Con A = Concanavalin A, PHA = Phytohämagglutinin, PWM = Pokeweed Mitogen,

²MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung,

³CPM = Counts per minute, SI = Stimulationsindex,

⁴Con A: 10 µg/ml, ⁵PHA: 40 µg/ml, ⁶PWM: 10 µg/ml

Tab. 7: Die proliferative Aktivität von Lymphozyten im peripheren Blut bei Hundewelpen im Verlauf der ersten zwölf Lebenswochen (Toman et al., 2000)

Alter der Hunde ¹	Proliferative Aktivität (MW \pm SD) ²	
	Con A ³	
	CPM ⁴	SI ⁴
1. LT	11872 \pm 8662	20.7 \pm 8.9
3. LT	16172 \pm 6679	25.5 \pm 14.2
1. LW	15340 \pm 8578	24.4 \pm 15.5
2. LW	12752 \pm 7618	25.6 \pm 22.8
3. LW	8766 \pm 5266	28.6 \pm 26.7
4. LW	7381 \pm 4226	37.4 \pm 26.2
8. LW	8924 \pm 4519	43.4 \pm 34.0
12. LW	7866 \pm 4813	35.1 \pm 18.8

¹LT = Lebenstag, LW = Lebenswoche

²MW= Mittelwert, SD = Standardabweichung

³Con A = Concanavalin A

⁴CPM = Counts per minute, SI = Stimulationsindex

2.6. Toleranzentwicklung der B- und T-Zellen gegenüber Autoantigenen

2.6.1. Reifung der B-Zellen im Knochenmark

B-Zellen reifen im Knochenmark und sind dort für ihre Entwicklung auf die nicht-lymphatischen Stromazellen angewiesen, da diese notwendige Wachstumsfaktoren (Stammzellfaktor, IL-7) für die Differenzierung der Zellen liefern. Aus pluripotenten Stammzellen entstehen über Pro-B-Zellen durch Umordnung verschiedener Genloci Prä-B-Zellen, die zur Bildung eines Prä-B-Rezeptors befähigt sind. Dieser Rezeptor verleitet die Zelle, sich in kleine Prä-B-Zellen zu teilen. Unreife B-Zellen exprimieren nur das IgM Molekül auf ihrer Zelloberfläche und werden auf ihre Toleranz gegenüber Selbstantigenen selektiert (Walport et al., 2009).

2.6.2. Zentraler Toleranzmechanismus der B-Zellen

Es kommt zur negativen Selektion von unreifen B-Zellen, wenn sie Rezeptoren exprimieren, die multivalente Liganden (ubiquitäre körpereigene Antigene der Zelloberfläche, wie MHC) erkennen (Walport et al., 2009). Entwickelt beispielsweise eine B-Zelle einen Rezeptor für ein MHC-Oberflächenantigen, dann durchläuft sie zunächst ein Rezeptor-Editing. Hierbei kommt es zum Stillstand in der Entwicklung der B-Zelle, zur Senkung der IgM-Oberflächenexpression und der anschließenden Umordnung der L-Ketten-Gene. Dies führt zur Expression einer neuen leichten Kette, die zusammen mit der vorherigen schweren Kette einen neuen Rezeptor bildet. Reagiert der neue Rezeptor nun nicht mehr mit Autoantigenen, kann die Zelle ihre Entwicklung fortsetzen. Sollte sie jedoch dann immer noch stark auf körpereigene Determinanten reagieren, wird der programmierte Zelltod (Apoptose) eingeleitet und die Zelle wird aus der B-Zell-Population eliminiert (klonale Deletion) (Nemazee 2006; Walport et al., 2009). Wenn sich unreife B-Zellen an lösliche Autoantigene binden, die den B-Zellrezeptor quervernetzen können, wie z. B. Serumproteine, erfolgt die klonale Anergie dieser Zelle. Das heißt, sie können aufgrund einer unterbrochenen Signalweiterleitung und der geminderten Expression von sekretorischen IgM nicht auf Antigene reagieren. Sie wandern in die Peripherie, wo sie anergisch bleiben und nur IgD exprimieren können (Walport et al., 2009).

Selektierte unreife B-Zellen exprimieren IgM (B-Zellrezeptor), verlassen dann das Knochenmark und wandern in die T-Zell-reichen Zonen der peripheren lymphatischen Organe. Dort erfolgt eine erneute Selektion der B-Zellen. Sie müssen von den T-Zellen ein „Überlebenssignal“ erhalten, ansonsten erfolgt ebenfalls die Apoptose (Walport et al., 2009). Die selektierten B-Zellen wandern in die Lymphfollikel und exprimieren auf der Zelloberfläche das CD21-Antigen. Anschließend rezirkulieren sie zwischen dem Knochenmark und den peripheren lymphatischen Organen, bis sie auf ein Antigen treffen (Walport et al., 2009).

2.6.3. Reifung und zentraler Toleranzmechanismus der T-Zellen

Die T-Zellen entstammen einer mit den B-Zellen gemeinsamen Knochenmarksstammzelle, deren Entwicklung findet allerdings im Gegensatz zu den B-Zellen im Thymus statt. Zunächst sind diese Vorläuferzellen $CD4^-/CD8^-$ und werden zu Natürlichen Killerzellen oder bei Durchlauf eines Selektionsprozesses zu T-Helferzellen. Dies ist ein Zweistufenprozess, der in der Thymusrinde beginnt. Je nachdem, wie stark die Prä-T-Zelle ($CD4^+$, $CD8^+$) mit dem MHC reagiert, erfolgt die Apoptose oder eine positive Selektion (Pezzutto et al. 2007).

T-Zellen werden zunächst als Thymozyten bezeichnet und die einzelnen Stadien der Entwicklung lassen sich aufgrund von unterschiedlichen Kombinationen der Zelloberflächenmoleküle CD3, CD4 und CD8 voneinander unterscheiden. Die früheste Zellpopulation im Thymus exprimiert keines dieser Oberflächenantigene. Da sie weder CD4 noch CD8 exprimieren, nennt man sie „doppelnegativ“. Aus diesen Vorläuferzellen entwickeln sich zwei T-Zelllinien: γ/δ -T-Zelle, die, selbst wenn sie reif sind, keine CD4 und CD8-Moleküle aufweisen, aber CD3-positiv sind und α/β -T-Zellen. α/β -T-Zellen sind auch zunächst doppelt negativ ($CD4^-/CD8^-/CD3^+$). Im nächsten Schritt exprimieren sie den Vorläufer des T-Zellrezeptors (Prä-T-Zell-Rezeptor). Dieser verbindet sich mit dem CD3-Molekül zu einem Komplex, welches dazu führt, dass sich die Zelle vermehrt und schließlich CD4 und CD8 exprimiert. Diese Vorstufe ist demnach zunächst „doppelt positiv“. Diese Zellen exprimieren dann zunächst geringe Mengen des T-Zellrezeptors, welcher Selbst-MHC-Moleküle mit einer geringen Affinität erkennen muss (Nemazee 2006). Ist dies der Fall, dann erfolgt die positive Selektion und die Zellen exprimieren hohe Mengen des T-Zellrezeptors an der Zelloberfläche. Anschließend beenden sie die Expression eines der beiden Corezeptormoleküle und differenzieren sich im Thymusmark zu einfach positiven CD4- oder CD8-Thymozyten. Daraufhin erfolgt die negative Selektion der Zellen, die auf Autoantigene reagieren. Erst dann werden die positiv selektierten T-Zellen in die Peripherie ausgeschleust (Walport et al., 2009).

2.7. Toleranzentwicklung gegenüber Nahrungsproteinen

2.7.1. Das darmassoziierte lymphatische Gewebe

Das darmassoziierte lymphatische Gewebe (GALT; gut associated lymphatic tissue) ist ein vom systemischen Immunsystem in vielen Aspekten unabhängiges Immunkompartiment und besteht aus mehreren Strukturen wie den Peyerschen Platten (PP), einzelnen Lymphknötchen sowie diffus in der Schleimhaut verteilten Lymphozyten und Plasmazellen (Guilford et al., 1996).

2.7.2. Lymphknötchen

Lymphknötchen finden sich entlang des gesamten Darmkanals in der Lamina propria wie auch in der Tela submucosa entlang der Lymphgefäße und stellen eine diffuse Anhäufung von Lymphozyten ohne bindegewebige Begrenzung dar (Nickel et al., 2004).

2.7.3. Peyersche Platten

Ansammlungen von dicht beieinander liegenden Lymphknötchen in der *Lamina propria* und *Tela submucosa* werden als Peyersche Platten (PP) bezeichnet (Nickel et al., 2004). Ihre Größe und Anzahl variiert innerhalb der Säugetierklasse und ist abhängig von Alter, Körpermasse des Tieres und der Darmregion (Kararli 1995). So befinden sich bei Wiederkäuern, Schweinen, Pferden, Hunden und Menschen 80 bis 90 % der PP im *Ileum*. Beim Hund ist eine durchschnittliche Anzahl von 26-39 PP im *Jejunum* und *Ileum* anzutreffen (Kararli 1995). Die Verteilung innerhalb der Darmregionen ist jedoch individuell unterschiedlich, mit Ausnahme der 4 - 5 PP im proximalen Duodenum und einer einzelnen langen Peyerschen Platte im *Ileum*. Diese beginnt an der antimesenterialen Seite des proximalen *Ileums* und endet am ileozäkalen Übergang (Kararli 1995). Form und Größe der Peyerschen Platten sind variabel. Sie können mit bloßem Auge als weiße erhabene Flächen mit einer Größe von ungefähr wenigen Millimetern bis 4 cm je nach Darmregion reichen und bestehen aus B-Zellen enthaltenden Lymphfollikeln. Die genannten Spezies besitzen noch einen zweiten Typ von PP im *Jejunum*. Diese bestehen aus kleineren Lymphfollikeln, die neben den B-Zellen auch etwa 30 - 40 % T-Zellen enthalten. Sowohl PP als auch Lymphknötchen sind von einem follikelassoziierten Epithel bedeckt. Dieses enthält die M-Zellen, die im Gegensatz zum restlichen Darmepithel keine resorptiven Fähigkeiten haben. Ihre Aufgabe wird darin gesehen, luminal Antigenen aufzunehmen, diese den subepithelialen Lymphozyten zu präsentieren und die Immunantwort zu regulieren (Guilford et al., 1996).

2.7.4. Aufgaben und Funktionen des darmassoziierten lymphatischen Gewebes

Das GALT schützt den Organismus vor oral aufgenommenen Pathogenen und sorgt für die lebenswichtige Ausbildung einer oralen Toleranz gegenüber Nahrungsbestandteilen und der physiologischen Darmflora.

Die Entwicklung einer Futtermittelallergie oder oralen Toleranz ist offenbar abhängig von der Balance zwischen den Th1- und Th2-Zellen. Ist das Gleichgewicht mehr in Richtung der Th2 Zellen verlagert, ist die Ausbildung einer IgE-vermittelten Allergie durch die ausgeschütteten Zytokine IL-4 und IL-5 begünstigt. Th1-Zellen produzieren IFN- γ und unterdrücken zusammen mit den TGF- β und IL-10 sezernierenden regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}) die Immunantwort der T-Helferzellen auf ein Antigen (Dearman und Kimber 2009). Auch bei Mäusen mit Inflammatory Bowel Disease wurde festgestellt, dass eine bestimmte CD4-T-Zellpopulation, sogenannte regulatorische T-Zellen, die Zytokine IL-10 und TGF- β produzieren und dies zur Milderung der Symptome führte (Asseman et al., 1999).

Prinzipielle Toleranz- bzw. Sensibilisierungsmechanismen wurden bei Hunden in zwei Studien mit Ovalbumin untersucht. Hierbei wurde überprüft ob, eine frühe Sensibilisierung zu einer allergischen Prädisposition gegenüber Allergenen führt und die allergenspezifischen Serum IgE- und IgG-Konzentrationen mittels ELISA-Test gemessen. In einer Studie mit Hunden wurden Welpen in zwei Gruppen eingeteilt, wovon die erste Gruppe ab dem ersten Lebenstag subkutan mit Ovalbumin (OVA), Erdnussextrakt und Birkenpollen sensibilisiert wurde. Wiederholte Injektionen in den Wochen 2, 4, 6, 10, 14, 22, 30, 38 und 47 folgten. Bei der zweiten Gruppe erfolgte die erstmalige Injektion mit den Antigenen ab einem Alter von vier Monaten mit anschließenden Injektionen in den Wochen 16, 18, 20, 22, 26, 30, 38 und 48. Um festzustellen, ob eine frühe Sensibilisierung zu einer allergischen Prädisposition gegenüber anderen Allergenen führt, wurde den Hunden im Alter von zehn bis zwölf Monaten ein Wiesen-Lieschgras-Allergen in zweiwöchigem Abstand injiziert und die allergenspezifischen Serum IgE- und IgG-Werte mittels ELISA-Test gemessen. Früh exponierte Hunde hatten signifikant höhere OVA-spezifische IgE-Titer entwickelt als spät sensibilisierte Hunde. Die IgG-Konzentrationen verhielten sich entgegengesetzt. Nach Inhalationsbelastung mit aerosolisiertem OVA-Antigen konnte bei den früh sensibilisierten Hunden eine wesentlich stärker ausgeprägte allergische Reaktion als bei den spät sensibilisierten Hunden nachgewiesen werden. Somit könnte die Vermeidung von Allergenen im jungen Alter einen vorbeugenden Effekt auf die IgE- vermittelte Allergie bei Hunden haben (Schiessl et al., 2003).

Zemann et al. (2003) führten eine Studie zur Induktion der oralen Toleranz bei neugeborenen Beaglewelpen durch. Sie teilten die Hunde in zwei Gruppen ein, wovon eine als Kontrollgruppe diente und die andere zur Toleranzinduktion verwendet wurde. Hierzu führten sie zunächst eine subkutane Sensibilisierung mit Graspollen-Antigen als Kontrolle in den Lebenswochen 0, 2, 4 und 6 durch, gefolgt von einer 28-tägigen Fütterung mit Ovalbumin (OVA) (10 mg OVA gelöst in 50 ml Kuhmilch) in den Wochen neun bis dreizehn zur Induktion einer oralen Toleranz gegenüber diesem Allergen. Dem schloss sich eine subkutane Immunisierung mit Graspollen-Antigen und OVA an, gefolgt von einem Challengetest. Die erfolgreiche Toleranzinduktion sollte die spezifischen IgE-Werte auch in Anwesenheit von Antigenen reduzieren. Die Hunde mit einer induzierten oralen Toleranz gegenüber OVA wiesen zu keiner Zeit erhöhte spezifische IgE- oder IgG-Werte auf, im Gegensatz zu den nicht mit OVA gefütterten Hunden (Kontrollgruppe), die einen signifikant höheren spezifischen IgE-Wert aufwiesen. Hunde, bei denen die orale Toleranz induziert wurde, zeigten in einem konjunktivalen Provokationstest eine schwächere Reaktion als die Kontrollgruppe. IgG stieg ebenfalls an, aber nicht in dem Maße wie die Konzentrationen des IgE. Des Weiteren konnte ermittelt werden, dass die orale Toleranz mit einer erhöhten Interleukin-10 IL-10 und Transforming growth factor-Produktion (TGF- β) durch CD4⁺-T-Zellen verknüpft war (Zemann et al., 2003).

Gezielte experimentelle Ansätze zur Untersuchung der Toleranzentwicklung bei Jungtieren gegenüber Nahrungsantigenen liegen bei Hunden bislang noch nicht vor. Der bisherige Kenntnisstand beruht im Wesentlichen auf Analogieschlüssen aus der Humanernährung und anderen Spezies. Auch bei Nutztieren spielt die Frage der Toleranzentwicklung gegenüber Nahrungsantigenen eine große Rolle, insbesondere aufgrund der weit verbreiteten Verwendung von Leguminosen als Proteinträger. In einer Studie wurden Ferkel in verschiedene Gruppen eingeteilt, die jeweils auf unterschiedliche Weise von der Muttermilch abgesetzt wurden, um zu untersuchen, ob dem Post-Weaning Diarrhoea Syndrome (PWD) möglicherweise eine Abwehrreaktion gegenüber Nahrungsproteinen zugrunde liegen könnte (Miller et al., 1984). Es konnte dokumentiert werden, dass ein frühes Absetzen oder eine orale Gabe geringer Mengen eines Beifutters neben der Muttermilchaufnahme an drei Tagen in der ersten Lebenswoche zu schwerwiegenden Durchfällen führte. Im Gegensatz hierzu zeigten Ferkel, die ab der ersten Lebenswoche kontinuierlich bis zum Absetztermin mit fester Nahrung beigefüttert, oder erst mit einem Alter von fünf Wochen abgesetzt wurden, keinerlei Symptome einer Futterunverträglichkeit. Hieraus konnten die Autoren schließen, dass ein kontinuierliches Angebot geringer Mengen eines Antigens in der frühen postnatalen Phase zur immunologischen Toleranz führte (Miller et al., 1984).

Des Weiteren wurden zwei Absetzdiäten, die entweder unbehandeltes oder hydrolysiertes Casein als alleinige Proteinquelle enthielten, miteinander verglichen (Miller et al., 1984). Hierbei zeigte sich, dass die aufgeschlossene Proteinquelle im Gegensatz zur unbehandelten Caseinquelle zu keinerlei klinischen Symptomen einer PWD führte. Dieses veranlasste die Autoren zur Annahme, dass eine allergische Reaktion gegenüber Nahrungsproteinen die Manifestation der PWD begünstigt (Miller et al., 1984).

In einer Serie von Versuchen wurden Mäuse, mit einer gewichtsbezogenen Dosis Ovalbumin (OVA, Hühnerei-Albumin, 1 mg/g KM) in unterschiedlichen Altersstufen (1, 3, 7, 14 oder 42 d) zwangsgefüttert und nach 28 d durch die Injektion von 100 µg OVA in den Fußballen systemisch immunisiert. Die Tiere, die mit OVA im Alter zwischen 1 und 7 d nach der Geburt gefüttert wurden, entwickelten keine orale Toleranz, sondern bildeten Antikörper gegen das OVA (Strobel und Ferguson 1984). Durch Variation des Fütterungsregimes wurde versucht die Entwicklung der oralen Toleranz zu beeinflussen (Strobel und Ferguson 1984). Hierzu wurden die Tiere in mehrere Gruppen eingeteilt, die entweder einmalig an Lebenstag 1, 4 oder 14 mit OVA gefüttert wurden oder täglich über einen bestimmten Zeitraum von vier oder vierzehn Tagen. In diesen Versuchen zeigte sich, dass Mäuse die einmalig am ersten Lebenstag mit OVA gefüttert wurden Antikörper gegen OVA bildeten. Im Gegensatz hierzu zeigten Mäuse die an den ersten vier Lebenstagen einmal täglich mit OVA gefüttert wurden, eine deutlich geringere Antikörper-Antwort (Strobel und Ferguson 1984). In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Effekt der Antigenosis auf die Entwicklung der oralen Toleranz überprüft, indem eine definierte OVA-Dosis entweder einmalig am vierten Lebenstag oder die gleiche Antigenosis aufgeteilt über einen Zeitraum von vierzehn Tagen verabreicht wurde. In diesem Zusammenhang entwickelten Mäuse, die nur einmalig die OVA Dosis am vierten Lebenstag bekamen, keine orale Toleranz. Eine Induktion der oralen Toleranz konnte allerdings durch die Aufteilung der Dosis auf vierzehn Tage erreicht werden (Strobel und Ferguson 1984). Die Autoren gingen deshalb davon aus, dass tägliche Gaben eines Antigens über einen längeren Zeitraum effektiver in der Unterdrückung einer Futtermittelhypersensitivität sind, als die einmalige Fütterung des Antigens mit insgesamt der gleichen Dosis (Strobel und Ferguson 1984). Zur Bestimmung des Einflusses des Absetzens auf die Entwicklung der oralen Toleranz wurden die Tiere entweder am Tag des Absetzens (21. LT), drei Tage vor dem Absetztermin oder drei Tage nach dem Absetzen mit OVA gefüttert. Hierbei konnte bei Mäusen, die am Tag des Absetzens mit OVA gefüttert wurden, keine orale Toleranz festgestellt werden. Im Gegensatz hierzu war die Induktion der oralen Toleranz bei Mäusen erfolgreich, die mit OVA drei Tage vor und drei Tage nach dem Absetzen gefüttert wurden (Strobel und Ferguson 1984).

Beim Menschen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass insbesondere wiederholte Gaben niedriger Dosen eines Nahrungsmittelantigens zur aktiven Unterdrückung von T-Effektorzellen durch die Zytokine (IL-10 und TGF- β) der regulatorischen CD4⁺-T-Zellen führte (von Hertzen et al., 2009). Die Entwicklung einer Futtermittelallergie oder oralen Toleranz ist offenbar abhängig von der Balance zwischen den Th1- und Th2-Zellen. Ist das Gleichgewicht mehr in Richtung der Th2-Zellen verlagert, ist die Ausbildung einer IgE-vermittelten Allergie durch die ausgeschütteten Zytokine IL-4 und IL-5 begünstigt. Th1-Zellen produzieren IFN- γ , IL-12 und TNF- α und unterdrücken zusammen mit den TGF- β und IL-10 sezernierenden regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}) die Immunantwort der T-Helferzellen auf ein Antigen (Dearman und Kimber 2009). Regulatorische T-Zellen bestehen aus drei Phänotypen: IL-10 produzierende Tr1-Zellen, TGF- β -produzierende Th3-Zellen und den Transkriptionsfaktor FoxP3-exprimierende Zellen (Sun et al., 2009). Den regulatorischen T-Zellen werden diverse Funktionen zugesprochen, u.a. neben der Suppression von Allergie und Asthma auch die Induktion der oralen Toleranz gegenüber diätetischen Antigenen (Corthay 2009). Bei Menschen lassen sich die T_{Reg} -Zellen (CD25⁺ / CD4⁺ / FoxP3⁺) mittels Anti-CD25- und FoxP3-Antikörper identifizieren (Corthay 2009). Für den Hund gibt es bisher nicht die Möglichkeit, CD25-Moleküle nachzuweisen. Allerdings ist die Identifizierung und Quantifizierung der T_{Reg} -Zellen auch mittels Detektion der FoxP3-Transkriptionsfaktor-exprimierenden CD4⁺ / FoxP3⁺-T-Zellen beim Hund möglich und zurzeit die Methode, um regulatorische T-Zellen in Hunden bestimmen zu können (Biller et al., 2007; Keppel et al., 2008). Bei einem IL-10-Anstieg im Serum war ein gleichzeitiger Anstieg der T_{Reg} -Konzentration im peripheren Blut zu verzeichnen (Keppel et al., 2008). Des Weiteren konnte in der Humanmedizin festgestellt werden, dass IL-10 nicht nur die T-Zell-Toleranz, sondern auch die spezifische Antikörper Isotypkonformation der B-Zellen reguliert (Akdis 2006) und die totale und allergenspezifische IgE-Produktion vermindert (Akdis et al., 1998). Keppel et al. (2008) haben herausgefunden, dass Hunde, die einer allergenspezifischen Immuntherapie (gegenüber verschiedenen Allergenen) unterzogen wurden, deutlich höhere T_{Reg} -Populationen und auch höhere IL-10 Werte hatten als gesunde Kontrollhunde und der Anstieg der T_{Reg} -Population eine bedeutende Rolle im Erfolg dieser Therapieform einnimmt. Allerdings waren zu Beginn der Immuntherapie keine Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen in den IL-10- und T_{Reg} -Werten zu verzeichnen. Der prozentuale Anteil der T_{Reg} -Zellen an der Gesamt-T-Zellpopulation beläuft sich beim gesunden Hund auf Werte von ca. 5 %, die Serum-IL-10-Konzentration schwankte zwischen 11,2 und 71,5 ng/L (Kjelgaard-Hansen et al., 2007; Keppel et al., 2008). Beim Hundewelpen sind noch keine Untersuchungen im Zusammenhang mit der Toleranzentwicklung gegenüber Futtermittelantigenen vorgenommen worden.

Andre et al. (1996) ermittelten Unterschiede in der Zytokinproduktion zwischen Nahrungsmittelallergikern und gesunden Menschen und postulierten, dass die Ergebnisse von der Inkubationsdauer abhängen würden. So zeigten sich nach einer *in-vitro* Inkubation von 24 und 48 h deutlich höhere IL-4-Werte bei Allergikern als bei gesunden Menschen, wohingegen sich die IFN- γ -Werte nicht unterschieden. Nach 72 h zeigte sich ein umgekehrtes Bild, indem die IFN- γ -Produktion höher in der Kontrollgruppe als bei den Allergikern war und sich in der IL-4-Produktion keine Unterschiede nachweisen ließen. Eine signifikante Korrelation zwischen den totalen Serum-IgE-Werten und der Zytokinproduktion ließ sich nicht nachweisen. Matsumoto et al. (1991) hingegen konnten bei Menschen eine signifikante Korrelation zwischen den IL-4 und IgE-Werten feststellen, was vermuten lässt, dass diese beiden Faktoren in der Entstehung einer Nahrungsmittelhypersensitivität in Zusammenhang stehen könnten. In zwei humanmedizinischen Studien, bei denen die Zytokinproduktion (IL-4 und IFN- γ) von Kindern mit einer nachgewiesenen Nahrungsmittelhypersensitivität mit toleranten Kindern verglichen wurden, war die *in-vitro* IL-4-Produktion bei den allergischen Kindern deutlich höher als bei den nicht-allergischen Patienten. Im Gegensatz hierzu konnte bei toleranten Kindern deutlich mehr IFN- γ nachgewiesen werden (Campbell et al., 1998; Schade et al., 2000). Beim Hund wurde in dieser Hinsicht eine Studie veröffentlicht, die einen Zusammenhang zwischen der Th1/ Th2-Balance durch durchflusszytometrische Messung der Zytokine IL-4 und IFN- γ und dem Alter der Hunde feststellen konnte. Mit zunehmendem Alter der Hunde stiegen die Zahlen der Th1- und Th2-Subpopulationen und das Th1:Th2-Verhältnis an (Horiuchi et al., 2007).

Es ist bekannt, dass im Zuge der Toleranzentwicklung eine klonale Anergie von T-Zellen stattfindet. Diese wird durch die anormale Präsentation von Antigen durch die Antigen präsentierenden Zellen (APC) und besonders durch das Fehlen von einer Reihe Co-stimulierender Faktoren, wie dem Oberflächenprotein CD80 (B7.1) und dem intrazellulären Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) induziert. Beim Menschen ist davon auszugehen, dass die immunologische Toleranz gegenüber Nahrungsantigenen lebenslang andauert (Strobel 2001).

Untersuchungen zur Toleranzentwicklung liegen für den Hund bislang nicht vor. Allgemein wird davon ausgegangen, dass die APC, z.B. die Dendritischen Zellen, Nahrungsproteine aufnehmen, die auf das darmassoziierte lymphatische Lymphgewebe in der intestinalen Mukosa auftreffen und den CD4-T-Zellen präsentieren. Expressieren die MHCII-tragenden Dendritischen Zellen oder auch Enterozyten kein CD80 oder IZA-1-Molekül, führt deren Antigenpräsentation zur Anergie der naiven CD4-Zellen und somit zur oralen Toleranz. Bei Anwesenheit von costimulatorischen Faktoren kommt es dagegen zur Sensibilisierung (Strobel 2001).

Beim Menschen weiß man, dass die Hauptallergene in erster Linie Proteine von Kuhmilch, Nüssen, Leguminosen, Eiern und Meeresfrüchten sind (Lehrer et al., 1996). Bei insgesamt 198 Hunden aus verschiedenen Studien wurden die gängigen Futtermittelallergene für den Hund, die mittels Eliminationsdiät und anschließender Provokation durch einzelne Komponenten diagnostiziert wurden, zusammengefasst (Verlinden et al., 2006) (Tab. 8).

Insgesamt zeigten 36 % der Hunde eine allergische Reaktion gegenüber Rind und 28 % gegenüber Milch. Der Rest verteilte sich auf Weizen (18 %), Schaf / Lamm (6,6 %), Ei (10 %), Huhn (9,6 %), Soja (6 %) und Schwein (4 %) (Verlinden et al., 2006).

Nach Walton (1967) sind multiple Hypersensibilitäten gegenüber Nahrungsproteinen bei Hunden und Katzen eher ungewöhnlich. Harvey (1993) und Paterson (1995) zeigten aber, dass 35 - 48 % der Hunde gegenüber mehr als einer Futterkomponente allergisch waren. Bei Harvey (1993) reagierten dreizehn Hunde (52 %) auf nur eine Futterkomponente und zwölf Hunde (48 %) auf mehr als eine. Des Weiteren bemerkten sie, dass Hunde, die auf Milch reagierten, genauso auf Käse reagierten, und umgekehrt (Harvey 1993). Nach Jeffers et al. (1996) reagierten Hunde durchschnittlich gegenüber 2,4 Futterkomponenten sensibel. Neun Hunde reagierten nur auf ein Protein, elf Hunde auf zwei, zwei Hunde auf drei, ein Hund auf vier Proteine und zwei Hunde auf fünf Proteine. 80 % der Hunde reagierten auf ein bis zwei Allergene, während 64 % auf mehr als zwei Substanzen positiv reagierten (Jeffers et al., 1996). Die Resultate der gängigsten Studien in dieser Hinsicht beim Hund ergaben, dass Proteine von Rind und Milch die zwei am häufigsten auftretenden Allergene darstellen (Tab. 8).

Bei einer Homologie der Proteine von über 70 % ist von einer Kreuzreaktivität auszugehen, während sie bei einer Homologie unter 35 % als unwahrscheinlich gilt (Dearman und Kimber 2009). Des Weiteren besteht in der Kreuzreaktivität ein Zusammenhang in der phylogenetischen Herkunft der tierischen Proteine. So reagieren Menschen, die auf bovines Serumalbumin im Rindfleisch allergisch sind, auch auf Schweine- und Schaffleisch, aber nicht auf Geflügelproteine.

Ebenso besteht eine Kreuzreaktivität zwischen den Proteinen des Hühnerfleisches und der Hühnereier sowie zwischen Rindfleisch- und Kuhmilchproteinen (Restani et al., 2009).

Als weiteres Kriterium hinsichtlich der Entwicklung von oraler Toleranz sind die strukturellen Eigenschaften der Futterproteine zu nennen (Untersmayr und Jensen-Jarolim 2006). Die meisten für die Veterinärmedizin als relevant identifizierten Futtermittelantigene sind partiell hitzeresistent und können der Verdauung standhalten (Guilford et al., 1996). Der Abbau der Proteine während der gastrointestinalen Passage führt zur Hydrolyse in freie Aminosäuren oder Oligopeptide, welche prinzipiell eine orale Toleranz induzieren können. Wenn die Proteine allerdings den Proteasen standhalten oder aber nur teilweise verdaut werden und sowohl die Konformation stabil und die antigen wirksamen Epitope intakt bleiben, kann es zur Sensibilisierungsreaktion kommen (Untersmayr und Jensen-Jarolim 2006). Bis zu 2 % der diätetischen Proteine könnten nach Schätzungen in der Lage sein, die intestinale Mucosa in mehr oder weniger intaktem Zustand zu passieren. Diese Proteine können möglicherweise von den Enterozyten mittels Endozytose aufgenommen werden, in den Lysosomen abgebaut und auf der Enterozytenoberfläche durch das MHCII-Molekül präsentiert werden (Guilford et al., 1996; Untersmayr und Jensen-Jarolim 2006). Der Großteil der Antigene dürfte allerdings nicht über die Enterozyten, sondern über die M-Zellen die intestinale Mukosa passieren und dem GALT präsentiert werden (Guilford et al., 1996; Untersmayr und Jensen-Jarolim 2006).

Die Molekulargröße der Proteine ist neben der Resistenz gegenüber dem Verdauungsprozess für die mögliche Auslösung einer Futtermittelallergie von Bedeutung. Bei Menschen lösen in der Regel Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 10 - 70 kD eine Lebensmittelallergie aus (Verlinden et al., 2006). Beim Menschen ist erwiesen, dass Allergene zwischen 3,5 - 5 kD zu einer deutlichen Reduktion der Allergenität führten. Beim Hund wird unterstellt, dass ebenfalls Glykoproteine an der Auslösung von Allergien beteiligt sind. Das Molekulargewicht wird zwischen 10 - 40 kD angegeben (Guilford und Matz 2003), aber selbst Allergene mit 4,5 kD können offenbar eine immunologische Reaktion auslösen (Verlinden et al., 2006). Die so genannten hypoallergenen enzymatisch hydrolysierten Diäten beinhalten Peptide mit einem geringen Molekulargewicht. Dadurch sollen die antigenen Eigenschaften reduziert werden. Allerdings war zu beobachten, dass es bei geringerem Molekulargewicht zu Akzeptanzproblemen aufgrund eines bitteren Geschmacks kam (Verlinden et al., 2006).

Tab. 8: Anzahl der am häufigsten diagnostizierten Futtermittelallergene beim Hund (modifiziert nach Verlinden et al. (2006))

	Rind	Milch	Weizen	Lamm/ Schaf	Ei	Huhn	Soja	Schwein	Hase	Fisch	Dosenfutter	Trockenfutter ¹	Diverse ²	Anzahl der Tiere	Alter der Hunde
Walton (1967)	13	22	11	6	3	-		4	1	2	17	-	5	82	5 Mo -10 J
Jeffers et al. (1991)	12	5	4	-	2	3	3	-	-	-	-	2	-	13	-
Harvey (1993)	6	11	8	1	4	1	-	-	-	-	-	-	1	25	6 Mo -12 J
Denis und Paradis (1994)	8	4	1	1	2	2	-	1	1	-	-	-	2	14	
Paterson (1995)	13	2	5	5	4	2	1	2	-	-	-	-	6	20	1 - 9 J
Jeffers et al. (1996)	15	7	6	-	5	7	8	-	-	-	-	-	3	25	-
Chesney (2002)	5	4	-	-	-	4	-	1	-	-	-	10	3	19	3 Mo - 8 J
Σ	72	55	35	13	20	19	12	8	2	2	17	12	20	198	
%	36	28	18	6,6	10	9,6	6	4	1	1	8,6	6	10		

¹ kommerzielles Futter, genaues Futtermittelantigen konnte nicht identifiziert werden² Getreide, Reis, Kekse, Schokolade, Gluten

2.7.5. Futtermittelunverträglichkeiten

Eine adverse Reaktion gegen Futtermittel wird häufig in zwei Gruppen eingeteilt: Hypersensitivität und Futtermittelintoleranz. Als Hypersensitivität bezeichnet man eine immunologische Reaktion gegenüber Futterbestandteilen, wogegen eine Futtermittelintoleranz eine nicht-immunologische Basis hat, wie z.B. einen Enzymmangel bei der Laktoseintoleranz. Adverse Futtermittelreaktionen können als Typ 1 (Soforttyp durch Mastzelldegranulation) innerhalb weniger Minuten bis Stunden, als Typ 3 durch Bildung von Immunkomplexen oder als Typ 4 (verzögerter Typ) innerhalb von Stunden bis einigen Tagen nach Antigenexposition auftreten (Jeffers et al., 1991).

Beim Hund äußern sich sowohl Futtermittelallergien als auch Futtermittelunverträglichkeiten entweder in dermatologischen oder gastrointestinalen Symptomen. Bei den Hautsymptomen ist v.a. der Pruritus zu nennen, während sich die gastrointestinalen Symptome vorwiegend in Form von Durchfall und Erbrechen äußern (Foster et al., 2003a). Das Mittel der Wahl zur Diagnostik einer Futtermittelallergie ist ein langwieriges Verfahren (Elimination, Provokation und Identifikation des Antigens). Klassischerweise wird der Hund zunächst ausschließlich mit einer selbst hergestellten Diät, bestehend aus einer bisher noch nicht gefütterten Protein- und Kohlenhydratquelle über einen Zeitraum von drei (Harvey 1993) bis zehn Wochen (Rosser 1993) gefüttert, bis die klinischen Symptome zurückgehen. Danach wird ein Provokationstest mit dem ursprünglichen Futter durchgeführt. Kommt es hierbei zu einem Rückfall, gilt dies als Bestätigung, dass der Patient gegen den entsprechenden Futterbestandteil empfindlich ist (Mueller und Tsohalis 1998). Nachfolgend ist das Tier wieder mit der Eliminationsdiät zu füttern, bis die Symptome nicht mehr auftreten. Zur Identifikation der für die klinische Symptomatik verantwortlichen Allergene kann im Abstand von sieben bis zehn Tagen in Form einer Provokationsfütterung jeweils ein neuer Futterbestandteil der Diät zugefügt werden. Die Reaktion auf ein unverträgliches Futtermittel erfolgt meist innerhalb von ein bis zwei Tagen (Mueller und Tsohalis 1998).

Halliwell und Kunkle (1978) haben als Alternative den Radioallergosorbent-Test (RAST) zur quantitativen Messung allergenspezifischer IgE im Hundeserum entwickelt. Die Korrelation der positiven RAST-Testergebnisse mit positiven intradermalen Tests war mit 12,5 bis 88 % sehr variabel, abhängig vom untersuchten Allergen. Kleinbeck et al. (1989) entwickelten einen ELISA-Test zur Detektion allergenspezifischer IgE Antikörper im Hundeserum, welcher mittlerweile neben dem intradermalen Hauttest ein kommerziell erhältlicher Allergietest ist, um sowohl Futtermittelhypersensitivitäten als auch Allergien gegenüber Umweltantigenen zu diagnostizieren.

Die Korrelation zwischen dem ELISA-Test und dem Hauttest betrug im Durchschnitt 52 % und variierte zwischen 43 und 64 %, abhängig vom getesteten Allergen (Kleinbeck et al., 1989). Der intradermale Test detektiert nur IgE, die an Mastzellen in der Haut gebunden sind, während der ELISA-Test IgE im Serum detektieren soll, wenn eine Typ 1 Hypersensitivität ursächlich vorliegt (Jeffers et al., 1991). Keiner dieser genannten Tests kann eine Futtermittelintoleranz oder eine Typ 2-, 3- und 4- Futtermittelhypersensitivität detektieren (Jeffers et al., 1991). In einer Studie von Jeffers et al. (1991) wurden verschiedene diagnostische Möglichkeiten zur Erkennung einer Futtermittelallergie im Vergleich untersucht (Eliminationsdiät, intradermaler Hauttest und ELISA). Die Sensitivität eines Allergietests bezeichnet die Fähigkeit des Tests den Anteil der erkrankten Tiere an der Gesamtheit der tatsächlich erkrankten Tiere zu detektieren (Jeffers et al., 1991). Die Spezifität gibt die Wahrscheinlichkeit wieder mit dem Test die gesunden Tiere auch als gesund zu identifizieren (Jeffers et al., 1991). Die Sensitivität und Spezifität sollten möglichst an hundert Prozent reichen, da sonst zu viele Tiere falsch-negativ bzw. falsch-positiv getestet werden (Jeffers et al., 1991). In der vorliegenden Studie betrug die Sensitivität des Hauttests nur 10,3 %. Die Spezifität dagegen lag bei 95,6 % (Jeffers et al., 1991) Ähnlich ungünstige Ergebnisse zeigten sich für den verwendeten ELISA-Test (Sensitivität 13,8 %, Spezifität 86,6 %) (Jeffers et al., 1991). In einer ähnlichen Studie von Mueller und Tsohalis (1998) wurde ein IgE-ELISA-Test mit monoklonalen Antikörpern eingesetzt, um Futtermittelallergien zu diagnostizieren. Bei keinem der Hunde, bei denen vorher durch eine Eliminationsdiät eine Futtermittelallergie festgestellt wurde, wies der ELISA-Test ein positives Resultat auf. Die Sensitivität lag nach dieser Studie bei 0 %, die Spezifität bei 98 %. Dieses erklärten die Autoren damit, dass die meisten adversen Reaktionen gegenüber Futtermitteln nicht IgE-vermittelt sind. Hill et al. (1995) verglichen die IgE-, IgG- und IgA-Gehalte im Serum von Hunden mit Endoparasiten, atopischer Dermatitis und von gesunden Hunden. Sie stellten keine signifikanten Unterschiede in der IgE-Konzentration zwischen den drei Gruppen fest. Bei Menschen können Endoparasiten zu einer erhöhten Anzahl IL-4-produzierender CD4-T-Helfer-Zellen führen. IL-4 ist ein relevantes Zytokin für die Stimulation der IgE-Produktion, IFN- γ dagegen hemmt die IgE-Produktion (Hill et al., 1995). Hunde besitzen allgemein eine hohe IgE-Serumkonzentration, was durch das Auftreten intestinaler Parasiten zu begründen sein könnte (Halliwell 1993). Neben der Anwesenheit von Parasiten beeinflusst möglicherweise auch die übliche regelmäßige Vakzinierung die IgE-Serumkonzentration bei Hunden. In einer Studie wurde gezeigt, dass nach der Tollwutimpfung sowohl in der sechzehnten Lebenswoche und im ersten Lebensjahr, aber besonders im zweiten und dritten Lebensjahr ein Anstieg der totalen Serum-IgE-Konzentration zu verzeichnen war (HogenEsch et al., 2002).

Der Effekt der Tollwutvakzine auf die IgE-Konzentration ist möglicherweise nicht durch das Antigen selber, sondern durch die Aluminium-Adjuvantien verursacht. Aluminiumsalze sind bekannt dafür, Antigen-spezifische IgE-Antikörper sowohl bei Hunden als auch Menschen zu induzieren (HogenEsch et al., 2002).

Die Ergebnisse der *in-vitro*-Allergietests sind häufig falsch-positiv. Dieses wird darauf zurückgeführt, dass die verfügbaren monoklonalen und polyklonalen Antikörper sowohl mit IgE als auch mit IgG im Hundeserum reagieren (Wassom und Grieve 1998). IgE-Antikörper müssen spezifisch an Rezeptoren auf Mastzellen binden, um die Ausschüttung des Histamins zu bewirken. Der Mastzellrezeptor für die IgE-Moleküle ist ein Tetramer, bestehend aus einer α -, einer β - und zwei γ -Ketten, wobei nur die α -Kette auf der Zelloberfläche zu finden ist (Wassom und Grieve 1998). Die extrazellulär gelegene α -Kette bindet an den Fc-Teil des IgE-Moleküls. Aufgrund der Spezifität der α -Kette für die IgE-Moleküle sollte es keine Kreuzreaktionen mit anderen Immunglobulinen wie IgG mehr geben (Wassom und Grieve 1998). Deshalb basieren die neueren allergenspezifischen ELISA-Tests auf der Verwendung eines humanen Fc ϵ R1 α - Rezeptors für die *in-vitro*-Detektion von caninem IgE (Stedman et al., 2001). Bei Hunden wurde ein Fc ϵ R1 α -basierter IgE-ELISA für Flohspeichel-, Pollen- und Hausstauballergene im Vergleich zum intradermalen Hauttest (IDST) eingesetzt. Die Sensitivität des *in-vitro* Tests lag bei 64-100 % und die Spezifität bei 79-100 %, wenn der intradermale Hauttest als Standard genutzt wurde (Wassom und Grieve 1998). Foster et al. (2003b) verglichen ebenfalls die Aussagekraft des Fc ϵ R1 α -ELISA-Tests mit dem intradermalen Hauttest in Bezug auf Umwelt- (Graspollen und Pilzsporen) sowie Flohspeichelallergene beim Hund. Hierbei lag die Sensitivität je nach getestetem Allergen zwischen 6,3 und 77,1 % und die Spezifität zwischen 64,2 und 99,3 %, wenn der intradermale Hauttest als Standard angesehen wurde.

2.8. Futtermittelantigen-induzierte Lymphozytenstimulationstests

Diese Methode findet vor allen Dingen in der Humanallergologie Anwendung im Zusammenhang mit der Erforschung Nahrungsmittelantigen-induzierter Allergien bei Kindern mit der Fragestellung, ob eine Allergie bei Kindern anhand der Stimulierbarkeit der Lymphozyten durch die Antigene nachweisbar und / oder sogar vorhersehbar ist (Kondo et al., 1992). Es wurde sogar diskutiert, diese Methode, die eine signifikant höhere Sensitivität als die herkömmlichen IgE-ELISA bietet, als alternatives Testverfahren durchzuführen (Kondo et al., 1992; Ishida et al., 2004). Innerhalb der ersten zwei Jahre entwickelten 93,3 % der Neugeborenen, deren Lymphozyten im Nabelschnurblut eine erhöhte lymphoproliferative Aktivität (Stimulationsindex (SI) > 1,5) gegenüber den getesteten Antigenen Ovalbumin und bovines Serumalbumin aufwiesen, eine klinisch manifeste Unverträglichkeit gegenüber Hühnereiern oder Kuhmilch (Sensitivität 85,7 %) (Kondo et al., 1992). Die gleichzeitige Messung der spezifischen IgE bei diesen Kindern erreichte nur eine Sensitivität von 42,9 %. Nur bei drei von sieben allergischen Kindern konnten IgE-Werte > 0,5 IU/ml nachgewiesen werden (Kondo et al., 1992). Die Stimulierung der Lymphozyten aus Nabelschnurblut bei Neugeborenen durch Nahrungsmittelantigene wird als Resultat der *in- utero* Exposition diskutiert (Hoffman aus Warner 1994). In einer späteren Studie konnten die Autoren aufgrund der hohen Variabilität zwischen den Individuen und der überlappenden Werte zwischen den Versuchsgruppen diese Methode allerdings nicht als sinnvoll für die Diagnostik oder Vorhersage von Kuhmilchallergien erachten (Hoffman et al., 1997). Lediglich im Gruppenvergleich waren Signifikanzen feststellbar (Hoffman et al., 1997). Hierbei wiesen 27 Kinder mit IgE vermittelter Kuhmilchallergie im Lymphozytenstimulationstest mit einem SI von 19,2 im Mittel eine signifikant höhere Proliferationsfähigkeit gegenüber Milchprotein auf, gegenüber 21 gesunden Kontrollkindern mit einem durchschnittlichen SI von 14,2 (Hoffman et al., 1997).

Neun von elf allergischen Hunden, die zuvor mittels einer Eliminationsdiät auf die Futtermittelallergene (u.a. Schweine-, Rinder- (Milch), Hühnerei- und Sojaproteine) getestet wurden, zeigten im Lymphozytenstimulationstest eine positive Reaktion ($SI > 2$) gegenüber den als positiv getesteten Allergenen (Ishida et al. 2004). Im Gegensatz hierzu wurden gleichzeitig mittels eines IgE-ELISA nur fünf der elf allergischen Hunden positiv getestet (Ishida et al., 2004). Während bei Kindern im Alter von einem Monat bis zu sieben Jahren, von denen 27 nachweislich, mittels Eliminationsdiät und anschließender Provokation getestet, an einer Kuhmilchallergie litten, nur 15 Kinder mittels eines kuhmilchallergen-induzierten Lymphozytenstimulationstest als positiv ermittelt werden konnten (Spezifität 55,5 %) (Motrich et al., 2003). Von diesen fünfzehn Kindern wiesen elf gastrointestinale Symptome auf. 16 von 27 Kindern (59,3 %) hatten erhöhte Werte an spezifischen IgE. Interessanterweise wiesen hier die höchsten IgE-Werte jene Kinder auf, die im Lymphozytenstimulationstest nicht positiv getestet wurden (Motrich et al., 2003).

2.9. Veränderungen der hämatologischen Parameter und des Differentialblutbildes in den ersten Lebenswochen eines Hundewelpen

2.9.1. Hämatologische Parameter

Bereits 1946 wurden altersbedingte Veränderungen der Blutparameter bei Hundewelpen nachgewiesen (Ederstrom und Deboer 1946). Hierbei ist die Erythrozytenkonzentration (RBC), der Hämoglobingehalt (HGB) und der Hämatokrit (HKT) während der ersten zwei bis vier Lebenswochen kontinuierlich signifikant gesunken (Ederstrom und Deboer 1946; Rüsse 1971; Earl et al., 1973; Shifrine et al., 1973; Lund et al., 2000). Dies kehrte sich anschließend in einen stetigen Anstieg der Erythrozytenzahl bis zur achten Lebenswoche (Rüsse 1971; Earl et al., 1973; Lund et al., 2000) bzw. bis zum Erreichen der adulten Konzentrationen im sechsten Lebensmonat um (Ederstrom und Deboer 1946; Shifrine et al., 1971; Weiße et al., 1971; Harper et al., 2003) (Tab. 9 und 10). Das mittlere Erythrozyteneinzelvolumen (MCV) war besonders in der postnatalen Phase aufgrund der makrozytären RBC recht hoch (Harper et al., 2003) und nimmt zusammen mit der mittleren Hämoglobinkonzentration pro Erythrozyt (MCH) bis zu einem Alter von vier (Ederstrom und Deboer 1946) bzw. acht Wochen kontinuierlich ab (Shifrine et al., 1971; Lund et al., 2000), während die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) keine Veränderungen aufwies (Ederstrom und Deboer 1946). Des Weiteren wurde ein Rassevergleich zwischen Beagle, Deutscher Schäferhund und Golden Retriever vollzogen, wobei herauskam, dass die Werte der MCH, MCV und ein Teil der MCHC im Vergleich zu den beiden anderen Rassen, bei den Beaglewelpen fast immer signifikant erniedrigt waren (Lund et al., 2000).

Tab. 9: Hämatologische Parameter bei Beaglewelpen in den ersten Lebenswochen (Harper et al., 2003)

Alters- kategorien	Parameter					
	WBC [$10^9/l$]	RBC [$10^{12}/l$]	HGB [g/dl]	HKT [%]	MCV [fl]	MCHC [g/l]
3 - 8 Wo	19	4,9	12,3	36		
8 - 16 Wo	14,5	5,1	12,6	38	68,1*	339*
16 Wo - 1 J	18,5	5,8	14,5	42		

* keine signifikanten Veränderungen

2.9.2. Differentialblutbild

Bei neugeborenen Beaglewelpen wird ein Abfall der Gesamtzahl der Leukozyten in den ersten zwei bis drei Lebenswochen von anfänglich ca. $16,5 - 16,8$ auf $10,5 - 12,3 \times 10^9/l$, gefolgt von einem Wiederanstieg bis zu Höchstwerten von $17,9 \times 10^9/l$ in der achten Lebenswoche berichtet (Anderson und Gee 1958; Shifrine et al., 1973). Dem folgte ein allmähliches Absinken der Gesamtzahl bis zum sechsten Monat auf Werte von $14,3 \times 10^9/l$ (Anderson und Gee 1958). Andere Autoren berichteten dagegen ein kontinuierliches Sinken der Gesamtzahl der weißen Blutkörperchen vom ersten ($14 - 15 \times 10^9/l$) bis zum sechsten Lebensmonat ($12 \times 10^9/l$) (Weiße et al., 1971) (Tab. 11). Die Ursache in der hohen Leukozytenzahl bei neugeborenen Hunden wurde im Geburtsstress vermutet (Dial 1992; Mischke et al., 2003). Mit der Geburt geht eine Mobilisierung der neutrophilen Granulozyten aus dem Marginalpool und/oder Lymphozyten aus dem lymphatischen System durch die Freisetzung von Adrenalin und Corticosteroiden einher, gefolgt von einer kurzzeitigen Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl (Jain 1986; Mischke et al., 2003).

Im weißen Blutbild neugeborener Welpen wurde eine starke Linksverschiebung beobachtet (Mulligan 1945). Während der ersten Lebenswoche konnten sowohl ein signifikanter Anstieg der Lymphozyten als auch ein paralleler signifikanter Abfall der Zahl der neutrophilen Granulozyten verzeichnet werden (Müller 1967; Rüsse 1971).

Die Zahl der Neutrophilen kann sogar am ersten Lebenstag bis zu drei Mal höher als die der Lymphozyten sein (Faldyna und Toman 1998). Im Verlauf der ersten zwei Lebenswochen sinkt die Zahl der Neutrophilen, während die Lymphozyten zunehmen und annähernd ein Verhältnis von 1:1 erreichen (Tagaki 1923; Faldyna und Toman 1998). Zwischen dem 30. und 40. Lebenstag ist der Anteil der Lymphozyten etwas höher als der der Neutrophilen (Tagaki 1923), gefolgt von einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten ab dem 40. Lebenstag (Tagaki 1923; Faldyna und Toman 1998).

Tab. 10: Die Dynamik der hämatologischen Parameter bei Beagle- und Mischlingswelpen in den ersten sechs Lebensmonaten (MW \pm SD)

Alter	RBC [$10^{12}/l$]	HGB [g/dl]	HKT [%]	MCV [fl]	MCH [pg]	MCHC [g/dl]	WBC [$10^9/l$]	PLT [$10^9/l$]	Referenzen
	5,54-4,45	16,8-15,2							Rüsse 1971 ¹
0-3 d	4,8 \pm 0,8	15,8 \pm 2,9		94,2 \pm 5,9	32,7 \pm 1,8	34,6 \pm 1,4	16,8 \pm 5,7		Shifrine et al. 1971 ²
	5,1	15,2		93	30	32	12	302	Earl et al. 1973 ²
4 d	4,97 \pm 0,44	14,0 \pm 1,4	43,1 \pm 4,0	86,3 \pm 7,1	28,2 \pm 1,4	32,5 \pm 1,3			Lund et al. 2000 ²
	4,54 \pm 0,26	14,0 \pm 0,88							Rüsse 1971 ¹
5 d	3,83 \pm 0,18	12,5 \pm 0,79							Rüsse 1971 ¹
	4,14 \pm 0,20	13,1 \pm 0,62							Rüsse 1971 ¹
7-10 d	3,9 \pm 0,5	11,8 \pm 1,6		86,8 \pm 3,5	30,2 \pm 1,6	34,9 \pm 1,7	15,2 \pm 3,3		Shifrine et al. 1971 ²
	4,60	12,9		89,0	28,0	32,0	14,1	352	Earl et al. 1973 ²
2 Wo	3,59 \pm 0,42	9,4 \pm 0,9	29,2 \pm 2,9	81,6 \pm 3,5	26,4 \pm 1,7	32,4 \pm 1,4			Lund et al. 2000 ²
	4,08 \pm 0,53	12,13 \pm 1,92							Rüsse 1971 ¹
3 Wo	3,5 \pm 0,3	9,9 \pm 1,1		81,5 \pm 3,3	28,0 \pm 2,0	34,3 \pm 1,6	13,6 \pm 4,4		Shifrine et al. 1971 ²
	3,90	10,0		81,5	25,5	31,5	11,7	290	Earl et al. 1973 ²
4 Wo	3,7 \pm 0,4	9,5 \pm 1,2		75,9 \pm 3,7	25,4 \pm 1,6	33,3 \pm 1,7	12,3 \pm 3,4		Shifrine et al. 1971 ²
	3,80	9,70		83,0	25,0	31,0	11,2	272	Earl et al. 1973 ²
4 Wo	3,16 \pm 0,30	8,44 \pm 1,01	25,2 \pm 4,7	80,1 \pm 14,6	26,8 \pm 3,22	33,9 \pm 3,65	14,7 \pm 3,9	278 \pm 59	Weiß e et al. 1971 ²
	3,9 \pm 0,4	9,6 \pm 0,9		71,7 \pm 3,5	24,3 \pm 1,6	33,5 \pm 1,4	13,9 \pm 3,3		Shifrine et al. 1971 ²
	4,10	9,50		73,0	23,0	32,0	12,9	287	Earl et al. 1973 ²
	3,87 \pm 0,56	8,0 \pm 1,2	26,3 \pm 4,2	67,9 \pm 3,7	20,7 \pm 1,7	30,4 \pm 1,7			Lund et al. 2000 ²

¹ Untersuchung an Mischlingswelpen² Untersuchung an Beaglewelpen

Tab. 10: Die Dynamik der hämatologischen Parameter bei Beagle- und Mischlingswelpen in den ersten sechs Lebensmonaten (MW \pm SD)

Alter	RBC [$10^{12}/l$]	HGB [g/dl]	HKT [%]	MCV [fl]	MCH [pg]	MCHC [g/dl]	WBC [$10^9/l$]	PLT [$10^9/l$]	Referenzen
5 Wo	4,0 \pm 0,3	9,4 \pm 0,7		69,5 \pm 3,0	23,3 \pm 0,9	33,2 \pm 1,7	14,2 \pm 3,1		Shifrine et al. 1971 ²
6 Wo	4,1 \pm 0,4	9,2 \pm 0,7		68,2 \pm 2,6	22,4 \pm 1,0	32,4 \pm 1,7	15,3 \pm 3,7		Shifrine et al. 1971 ²
	4,70	10,2		69,0	22,0	31,5	16,3	371	Earl et al. 1973 ²
7 Wo	4,5 \pm 0,4	10,1 \pm 0,8		66,9 \pm 2,9	22,5 \pm 2,0	32,7 \pm 1,7			Shifrine et al. 1971 ²
	4,57 \pm 0,25	9,23 \pm 0,66							Rüsse 1971 ¹
	3,97 \pm 0,33	9,06 \pm 0,77	27,1 \pm 2,5	68,4 \pm 5,86	22,9 \pm 1,90	33,6 \pm 1,94	13,1 \pm 3,1	345 \pm 99	Weißer et al. 1971 ²
2 Mo	4,7 \pm 0,4	10,3 \pm 0,9		65,8 \pm 2,3	21,8 \pm 1,2	32,6 \pm 1,8	15,7 \pm 4,4		Shifrine et al. 1971 ²
	4,90	11,2		72,0	22,5	32,0	15,0	324	Earl et al. 1973 ²
	5,33 \pm 0,64	10,3 \pm 1,5	34,2 \pm 5,2	64,1 \pm 5,0	19,4 \pm 1,8	30,3 \pm 1,7			Lund et al. 2000 ²
3 Mo	4,26 \pm 0,46	10,89 \pm 0,63	30,5 \pm 2,6	71,9 \pm 6,01	25,7 \pm 1,78	35,8 \pm 2,09	13,5 \pm 4,2	303 \pm 76	Weißer et al. 1971 ²
4 Mo	4,44 \pm 0,31	11,0 \pm 0,51	32,7 \pm 2,3	73,6 \pm 4,88	24,9 \pm 1,22	33,8 \pm 1,82	12,9 \pm 3,5	330 \pm 67	Weißer et al. 1971 ²
5 Mo	4,66 \pm 0,38	12,0 \pm 0,42	35,1 \pm 1,9	75,4 \pm 4,56	25,8 \pm 1,88	34,3 \pm 1,40	13,4 \pm 2,4	323 \pm 74	Weißer et al. 1971 ²
6 Mo	4,96 \pm 0,23	12,9 \pm 0,96	36,2 \pm 2,4	72,9 \pm 2,69	26,0 \pm 1,14	35,7 \pm 1,63	12,5 \pm 2,0	299 \pm 45	Weißer et al. 1971 ²

¹ Untersuchung an Mischlingswelpen² Untersuchung an Beaglewelpen

Tab. 11: Die Dynamik des Differentialblutbildes bei Beagle- und Mischlingswelpen in den ersten sechs Lebensmonaten (MW \pm SD)

Alter	Lymphozyten		Stabkernige		Segmentkernige		Monozyten		Eosinophile		Basophile		Referenzen				
	10 ⁹ /l	%	10 ⁹ /l	%	10 ⁹ /l	%	10 ⁹ /l	%	10 ⁹ /l	%	10 ⁹ /l	%					
0 - 3 d	18-34		37-19		38-36		1,00		1-5				Rüsse 1971 ¹				
	3,70 \pm 2,30		9,20 \pm 4,60		1,40 \pm 1,30		0,40 \pm 0,40						Shifrine et al. 1971 ²				
	1,90	15,8	0,23	1,90	8,60	72,0	0,90	7,20	0,40	3,10	0,00		Earl et al. 1973 ²				
4 d	2,14 \pm 1,14		22,3 \pm 9,6		0,43 \pm 0,39		4,9 \pm 4,3		5,75 \pm 0,95		61,5 \pm 9,8		0,46 \pm 0,24	5,0 \pm 2,6	0,53 \pm 0,34	5,7 \pm 3,4	Mischke et al. 2003 ²
	35,0		17,0		40,0		1,00		2,00							Rüsse 1971 ¹	
	38,0		17,0		38,0		1,00		3,00								
7 - 10 d	43,0		12,0		38,0		0,40		2,00							Rüsse 1971 ¹	
	5,10 \pm 1,40		7,70 \pm 2,30		1,40 \pm 0,70		0,70 \pm 0,60									Shifrine et al. 1971 ²	
	4,30	30,4	0,50	3,50	7,40	52,6	1,10	7,70	0,80	5,50	0,01	0,10				Earl et al. 1973 ²	
2 Wo	3,56 \pm 0,92		39,3 \pm 9,8		0,31 \pm 0,37		2,8 \pm 3,0		4,77 \pm 1,44		49,5 \pm 9,0		0,27 \pm 0,16	3,0 \pm 1,2	0,51 \pm 0,30	5,2 \pm 2,2	Mischke et al. 2003 ²
	26,0		18,0		44,0		0,30		7,00								Rüsse 1971 ¹
	4,90 \pm 1,70		6,90 \pm 3,10		1,10 \pm 0,60		0,50 \pm 0,50										Shifrine et al. 1971 ²
3 Wo	3,80	32,9	0,21	1,80	5,20	54,1	0,70	5,80	0,60	5,20	0,00	0,00				Earl et al. 1973 ²	
	24,0		5,00		62,0		5,00		4,00								Rüsse 1971 ¹
	5,10 \pm 1,60		5,60 \pm 1,90		1,20 \pm 0,60		0,30 \pm 0,30										Shifrine et al. 1971 ²
4 Wo	5,00	45,0	0,09	0,80	5,10	45,2	0,70	6,60	0,30	2,80	0,00					Earl et al. 1973 ²	
	6,30 \pm 2,50		0,31 \pm 0,14		7,26 \pm 1,80		0,51 \pm 0,19		0,31 \pm 0,19		0,00						Weiße et al. 1971 ²
	5,40 \pm 1,60		6,80 \pm 2,00		1,00 \pm 0,60		0,40 \pm 0,40										Shifrine et al. 1971 ²

¹ Untersuchung an Mischlingswelpen² Untersuchung an Beaglewelpen

Tab. 11: Die Dynamik des Differentialblutbildes bei Beagle- und Mischlingswelpen in den ersten sechs Lebensmonaten (MW ± SD)

Alter	Lymphozyten		Stabkernige		Segmentkernige		Monozyten		Eosinophile		Basophile		Referenzen
	10 ⁹ /l	%	10 ⁹ /l	%	10 ⁹ /l	%	10 ⁹ /l	%	10 ⁹ /l	%	10 ⁹ /l	%	
4Wo	4,50	35,1	0,06	0,50	7,20	55,8	0,80	6,10	0,25	1,90	0,01	0,10	Earl et al. 1973 ²
	6,18±1,86	45,5±11,1	0,22±0,19	1,80±1,80	6,24±1,96	47,0±10,2	0,31±0,18	2,30±1,20	0,39±0,24	3,00±1,70			Mischke et al. 2003 ²
5Wo	5,40±1,90		7,00±2,00				1,30±0,70		0,40±0,30				Shifrine et al. 1971 ²
6Wo	6,10±1,90		7,40±2,40				1,30±0,60		0,30±0,30				Shifrine et al. 1971 ²
	5,70	34,7	0,05	0,30	9,00	55,3	1,10	6,60	0,50	3,20	0,00		Earl et al. 1973 ²
7Wo	5,40±1,30		7,80±2,20				1,40±0,60		0,30±0,30				Shifrine et al. 1971 ²
	49,0		8,00		36,0		0,25		2,00				Rüsse 1971 ¹
	5,99±1,71		0,11±0,07		6,47±1,50		0,39±0,18		0,11±0,10		0,00		Weiße et al. 1971 ²
2Mo	5,00±1,50		8,50±2,90				1,40±0,70		0,40±0,40				Shifrine et al. 1971 ²
	5,00	33,4	0,08	0,50	8,50	56,7	1,00	6,80	0,40	2,60	0,00		Earl et al. 1973 ²
	6,12±1,83	43,1±10,7	0,21±0,23	1,40±1,40	7,66±3,08	50,9±10,7	0,28±0,16	2,20±1,10	0,33±0,28	2,20±1,80			Mischke et al. 2003 ²
3Mo	5,65±2,43		0,21±0,21		6,90±3,93		0,50±0,24		0,19±0,28		0,00		
4Mo	5,76±1,31		0,10±0,07		6,29±2,82		0,46±0,14		0,30±0,32		0,01		Weiße et al. 1971 ²
5Mo	5,00±0,92		0,17±0,15		7,16±1,72		0,58±0,16		0,54±0,31		0,00		
6Mo	4,06±1,47		0,12±0,07		7,12±1,95		0,62±0,18		0,54±0,34		0,02		

¹ Untersuchung an Mischlingswelpen² Untersuchung an Beaglewelpen

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Versuchsziel

Es wurde ein Fütterungsversuch im Cross-over-Design durchgeführt, bei dem der Effekt zweier Rationen, die sich lediglich in der Proteinzusammensetzung unterschieden (Tab. 13), auf die immunologischen und verdauungsphysiologischen Parameter von Hundewelpen getestet werden sollte.

Dieser Versuch wurde am Institut für Tierernährung des Fachbereichs Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin durchgeführt.

3.2. Versuchstiere

Für die Untersuchungen standen insgesamt sechzehn Beaglewelpen aus zwei Würfen zu je acht Welpen zur Verfügung, die im Abstand von zwei Monaten geboren wurden (Tab. 12).

3.3. Versuchsplan

Die Welpen wurden bis zur dritten Lebenswoche ausschließlich durch die Muttermilch ernährt. Anschließend erfolgte die Einteilung in zwei Versuchsgruppen, wobei aus jedem Wurf jeweils vier Welpen nach Geschlecht und Gewicht einer Fütterungsgruppe zugeordnet wurden (Tab. 12), und es begann eine kontrollierte Beifütterung der Welpen mit dem jeweiligen Versuchsfutter. In der sechsten Lebenswoche wurden die Welpen von den Muttertieren abgesetzt und jeweils vier Welpen entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit zusammen gehalten. Zehn Wochen nach der ersten Beifütterung erfolgte ein Wechsel der Diäten mit einer weiteren Fütterungsphase von acht Wochen (Abb. 1).

In der achten und zwölften Lebenswoche erfolgte die routinemäßige subkutane Impfung gegen Staupe, Leptospirose, Zwingerhusten, Hepatitis contagiosa canis, Parvovirose und Tollwut (nur in der zwölften Woche) (Virbagen[®] canis SHAPPi / L bzw. LT, Virbac, Bad Oldesloe). Ab der zweiten Lebenswoche erfolgte die regelmäßige Entwurmung der Welpen und Muttertiere im 14-tägigen Abstand mit Fenbendazol (Banminth[®] Paste, Pfizer, New York, USA, Dosierung laut Angabe des Herstellers) bis zu einem Alter von acht Wochen und die letzte Behandlung in der zwölften Lebenswoche vor der zweiten Impfung.

Tab. 12: Verteilung der Welpen auf die beiden Versuchsgruppen

	Gruppe 1	Geschlecht*	Gruppe 2	Geschlecht*
Wurf 1 Nannis Welpen geb.: 26.11.2010	Casper	m	Blacky	m
	Hero	m	Spotty	m
	Henry	m	Jack	m
	Pete	m	Charly	m
Wurf 2 Cassys Welpen geb.: 03.02.2011	Maja	w	Roxy	w
	Holly	w	Ronja	w
	Lennox	m	Bruno	m
	Samson	m	Caesar	m

*m = männlich, w = weiblich

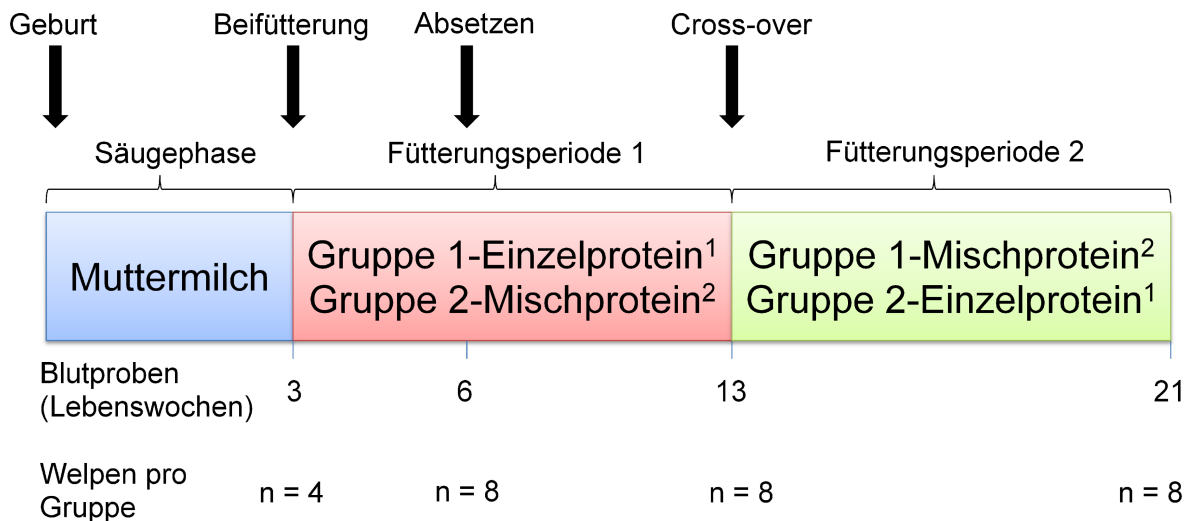


Abb. 1: Übersicht des Versuchsdesigns

¹Hühnerprotein; ²Hühner-, Fisch-, Sojaprotein und Hüttenkäse

3.4. Versuchsfutter

Die Welpen wurden mit einem im Institut für Tierernährung selbst hergestellten Futter ernährt (Tab. 13, 14, 15). Dieses entsprach bezüglich der Gehalte sowohl an Nähr- und Mineralstoffen als auch an Vitaminen den Empfehlungen für die Ernährung im Wachstum befindlicher Hunde. Geflügel- Fisch- und Sojaprotein sowie Hüttenkäse wurden als Proteinquellen gewählt, da sich diese vier in ihren allergieauslösenden Proteinfamilien deutlich voneinander unterscheiden und somit eine Kreuzreaktivität in der Diagnostik ausgeschlossen werden konnte. Aufgrund des geburtsbedingt um zwei Monate verzögerten Versuchseintrittes des zweiten Wurfes, wurden für diese acht Welpen um einem Futtermittel vorzubeugen, die beiden Rationen unmittelbar vor Versuchsbeginn mit den gleichen Komponenten der ersten Futtermischung neu hergestellt.

Tab. 13: Zusammensetzung der beiden Versuchsdiäten

Komponenten	Diät A ¹ und AI ² (%)	Diät B ¹ und BI ² (%)
Gekochtes Hühnerherz	49,5	41
Fischmehl	-	3,0
Hüttenkäse (20 % Fett i.TS)	-	2,5
Sojaextraktionsschrot	-	2,5
Reisquellmehl	42,1	42,6
Sonnenblumenöl	3,3	4,0
Futtercellulose	1,6	1,6
Kalziumkarbonat	0,5	0,4
Kalziumphosphat	1,8	1,5
Prämix-FU-Mineral ³	1,2	1,2

¹ A und B: Ration A und B des ersten Wurfes,

² AI und BI: neu hergestellte Rationen A und B des zweiten Wurfes

³ Zusammensetzung in 100 g TS:

Kalzium: 13,75 %, Natrium: 13,0 %, Mg: 5,50 %, Eisen (Eisencarbonat): 300 mg, Kupfer (Kupfersulfat): 100 mg, Zink (Zinkoxid): 500 mg, Mangan (Manganoxid): 600 mg, Jod (Kalziumjodat): 8 mg, Vitamin A: 60000 IE, Vitamin D: 12000, Vitamin E: 800 mg, Vitamin B1: 25 mg, Vitamin B2: 25 mg, Vitamin B6: 40 mg, Vitamin B12: 200 µg, Niazin: 250 mg, Biotin: 2500 µg, Folsäure: 10 mg, Pantothensäure: 100 mg

Tab. 14: Errechnete Nährstoffgehalte der beiden Rationen bezogen auf 100 g TS

Analyse	Einheit	Diät A ¹ und AII ²	Diät B ¹ und BII ²
Rohprotein	%	26	26
Verd. Rohprotein	%	23,8	23,6
Ums. Energie	MJ	1,75	1,73
Rohfett	%	12	11,9
Rohfaser	%	1,9	1,9
Rohasche	%	2,6	3,6
Kalzium	mg	1216	1232
Phosphor	mg	720	760
Natrium	mg	303	311
Kalium	mg	211	296
Magnesium	mg	132	145
Eisen	mg	13	14
Zink	mg	16	15
Kupfer	mg	2,5	2,4
Mangan	mg	12	11

¹ A und B: Ration A und B des ersten Wurfes,

² AII und BII: neu hergestellte Rationen A und B des zweiten Wurfes

Tab. 15a: Analysierte Nährstoffgehalte der beiden verzehrfertigen Rationen bezogen auf 100 g TS

Analyse	Einheit	Diät A	Diät B
Feuchtegehalt*	%	78,3	78,1
Rohprotein	%	21,8	23,1
Verd. Rohprotein ¹	%	19,1	20,3
Ums. Energie ²	MJ	1,65	1,68
Rohfett	%	9,0	9,9
Rohfaser	%	1,9	1,8
NfE ³	%	13,5	13,1
Rohasche	%	5,3	5,2
Kalzium	mg	1015	934
Phosphor	mg	804	796
Natrium	mg	262	303
Kalium	mg	222	297
Magnesium	mg	184	179
Eisen	mg	25	24
Zink	mg	10	10
Kupfer	mg	2,1	2,0
Mangan	mg	12	11

*bezogen auf 100g ursprüngliche Substanz

¹Schätzung des verdaulichen Rohproteingehaltes im Futter nach Opitz (1996):

verdauliches Rohprotein: $(0,908 - 0,0156 \times \% \text{ Rohfaser in TS}) \times \% \text{ Rohprotein in TS}$

²Berechnung der umsetzbaren Energie in 100 g Frischsubstanz nach der Formel von Kienzle et al. (1998):

1. Berechnung des Bruttoenergie-Gehaltes (GE):

$$\text{GE (MJ/100g)} = 0,02385 \text{ Rp} + 0,03934 \text{ Rfe} + 0,01717 \text{ NfE} + 0,01717 \text{ Rfa}$$

2. Schätzung der sV der Bruttoenergie anhand des Rfa-Gehaltes in der TS:

$$\text{sV GE (\%)} = 91,2 - 1,43 \text{ Rfa (\% TS)}$$

3. Berechnung der verdaulichen Energie (DE)

$$\text{DE} = \text{GE} \times \text{sV GE (\%)} / 100$$

4. Berechnung der metabolischen Energie (ME)

$$\text{ME (MJ/100g)} = \text{DE} - 0,00434 \text{ MJ} \times \text{Rp (g/100 g)}$$

³Berechnung des NfE-Gehaltes: $\text{NfE (\%)} = 100 - \text{Feuchte} - \text{Rp} - \text{Rfe} - \text{Ra} - \text{Rfa}$

Tab. 15b: Nährstoffgehalte der beiden verzehrfertigen Rationen bezogen auf 100 g TS

Analyse	Einheit	Diät A II	Diät B II
Feuchtegehalt*	%	82,7	81,5
Rohprotein	%	21,6	23,4
Verd. Rohprotein ¹	%	19,0	20,6
Ums. Energie ²	MJ	1,65	1,68
Rohfett	%	9,0	10,1
Rohfaser	%	1,9	1,8
NfE ³	%	10,8	11,0
Rohasche	%	5,3	5,3
Kalzium	mg	1045	1008
Phosphor	mg	819	855
Natrium	mg	293	313
Kalium	mg	241	321
Magnesium	mg	196	196
Eisen	mg	26	26
Zink	mg	13	12
Kupfer	mg	3,3	3,1
Mangan	mg	11	13

*bezogen auf 100 g ursprüngliche Substanz

¹Schätzung des verdaulichen Rohproteingehaltes im Futter nach Opitz (1996):

verdauliches Rohprotein: $(0,908 - 0,0156 \times \% \text{ Rohfaser in TS}) \times \% \text{ Rohprotein in TS}$

²Berechnung der umsetzbaren Energie in 100 g Frischsubstanz nach der Formel von Kienzle et al. (1998):

1. Berechnung des Bruttoenergie-Gehaltes (GE):

$$\text{GE (MJ/100g)} = 0,02385 \text{ Rp} + 0,03934 \text{ Rfe} + 0,01717 \text{ NfE} + 0,01717 \text{ Rfa}$$

2. Schätzung der sV der Bruttoenergie anhand des Rfa-Gehaltes in der TS:

$$\text{sV GE (\%)} = 91,2 - 1,43 \text{ Rfa (\% TS)}$$

3. Berechnung der verdaulichen Energie (DE)

$$\text{DE} = \text{GE} \times \text{sV GE (\%)} / 100$$

4. Berechnung der metabolischen Energie (ME)

$$\text{ME (MJ/100g)} = \text{DE} - 0,00434 \text{ MJ} \times \text{Rp (g/100 g)}$$

³Berechnung des NfE-Gehaltes: $\text{NfE (\%)} = 100 - \text{Feuchte} - \text{Rp} - \text{Rfe} - \text{Ra} - \text{Rfa}$

3.5. Klinische Allgemeinuntersuchung

Der Gesundheitszustand der Welpen wurde täglich kontrolliert.

3.6. Körpermasse

Die Gewichtskontrolle erfolgte bis zur sechsten Lebenswoche täglich, anschließend drei Mal wöchentlich bis zum Ende der Versuchsreihe.

3.7. Ermittlung der Fäzeskonsistenz

Hierzu wurde über den gesamten Versuchszeitraum zwei Mal wöchentlich (Dienstag und Freitag) die Kotkonsistenz pro Fütterungsgruppe mittels des Scoring Systems nach Moxham (2001) beurteilt (Tab. 16). Diese wurde, um die Fehlerquote so gering wie möglich zu halten, sowohl stets von derselben Person als auch immer zur gleichen Zeit ermittelt.

Tab. 16: Das eingesetzte Scoring System zur Beurteilung der Kotproben

Codierung	Kotkonsistenz	Beurteilung
1	hart, krümelig	
2	fest, geformt	physiologisch
3	weich, noch geformt	noch in Ordnung
4	breiig	Durchfall
5	wässrig	schwerer Durchfall

3.8. Methoden

3.8.1. Blutentnahme

Am 21. Lebenstag wurde jedem Hund durch Punktion der *Vena jugularis* mit einer sterilen Einmalkanüle (\emptyset 0,7 x 30 mm, Henry Schein, Hamburg) und einer Monovette mit Membran-Adapter (Multi Adapter, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) insgesamt ca. 2 - 4 ml Blut verteilt auf Lithium-Heparin- und K-EDTA-Röhrchen, entnommen. An den darauf folgenden Probenentnahmezeitpunkten (Lebenstag 42, 77 und 133) erfolgte bei jedem Hund durch Punktion der *Vena cephalica* mit einer sterilen Einmalkanüle (\emptyset 0,9 x 40 mm, Henry Schein, Hamburg) die Entnahme von insgesamt 3,5 - 10 ml Blut verteilt auf Lithium-Heparin- und K-EDTA-Röhrchen. Hiervon wurden 1,5 - 8 ml heparinisiertes Vollblut (Monovette, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) direkt nach der Entnahme für durchflusszytometrische Untersuchungen und die Lymphozytenproliferationstests verwendet. Für die hämatologische Untersuchung (Blutbild und Differentialblutbild) wurden ca. 0,5 - 1 ml Blut in K-EDTA-Röhrchen (Monovette, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) entnommen und an die Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin übergeben.

Nachfolgend sind alle verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte jeweils am Ende eines Abschnittes in tabellarischer Form aufgeführt.

3.8.2. Durchflusszytometrie

3.8.2.1. Isolierung der Leukozyten mittels Gradientenzentrifugation

3.8.2.1.1. Prinzip

Dieses Verfahrens beruht auf der Tatsache, dass ein synthetisch hergestelltes Polysaccharid aus Saccharose und Epichlorhydrin (Ficoll®) eine höhere Dichte als die Monozyten und Lymphozyten, aber eine geringere Dichte als Erythrozyten und Granulozyten aufweist. Nach der Zentrifugation bildet sich eine leicht zu entnehmende lymphozytenreiche Schicht oberhalb des Ficolls®.

3.8.2.1.2. Durchführung

Nach 1:2 Verdünnung des Vollblutes mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (Biochrom AG, Berlin) wurden 10 ml dieses Blut / PBS-Gemischs auf Ficoll® (Biochrom AG, Berlin) geschichtet. Nach einer 30 minütigen Zentrifugationsphase bei Raumtemperatur und 515 x g konnte die Interphase mit den mononukleären Zellen steril entnommen und in ein mit 10 ml PBS vorgelegtem Röhrchen übertragen werden. Dem schlossen sich zwei Waschschriffe mit PBS und die Lysis der Erythrozyten an. Hierzu wurde das Pellet zunächst in 1 ml PBS resuspendiert und mit autoklaviertem und zuvor steril filtriertem Erythrozyten-Lyse-Puffer (Tab. 22) bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert und anschließend wieder mit PBS gewaschen. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet in 1 ml Zellkulturmedium (Tab. 27) resuspendiert und die Zellen in einem Neubauer Hämozytometer (Paul Marienfeld, Lauda Königshofen) gezählt.

3.8.2.1.3. Bestimmung der Zellzahl

Zum Anfärben der mononukleären Zellen wurden zu 90 µl der Zellsuspension 10 µl Trypanblau (Biochrom AG, Berlin) gegeben. Davon wurden 10 µl in die Neubauer-Zählkammer übertragen und die Zellen innerhalb der sechzehn Quadrate (= vier Großquadrate) unter dem Mikroskop ausgezählt. Folgende Formel diente zur Berechnung der Gesamtzellzahl in der Ausgangslösung bei einem Volumen von 0,1 µl pro Großquadrat:

Gesamtzellzahl der Ausgangslösung = Ermittelte Zellzahl x 10^4 x Verdünnungsfaktor (1:10) x Volumen der Zellsuspension.

Durch den Zusatz der geeigneten Menge Zellkulturmedium wurde die Zelldichte jeweils auf 1×10^7 / ml eingestellt. Davon wurde 1 ml für den Lymphozytenproliferationstest entnommen und auf 4×10^6 Zellen pro ml (bzw. $1,6 \times 10^7$ / ml) eingestellt.

3.8.2.1.4. Markieren der Zellen mit Antikörpern

Zum Nachweis von Zelloberflächenantigenen wurde die indirekte Membran-Immunofluoreszenz eingesetzt. Diese beruht auf der Markierung eines bereits an der Zelle gebundenen Antikörpers (Primärantikörper) durch einen mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) gekoppelten zweiten Antikörpers (IgG1 oder IgG2_α) (Sekundärantikörper).

Zu 100 µl der Zellsuspension wurden 50 µl des verdünnten Primärantikörpers (Tab. 17) in FACS-Röhrchen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) pipettiert und auf Eis für 25 min inkubiert. Bei den verwendeten Antikörpern handelte es sich um hundespezifische anti-CD4-, anti-CD8-, anti-CD21-, anti-CD3-, anti-CD5-Antikörper und einen kreuzreaktiven anti-horse-MHCII-Antikörper (Tab. 17). Zur Kontrolle wurde eine Probe ohne Einsatz von primärem Antikörper mitgeführt. Anschließend wurden nicht gebundene Antikörper in zwei Schritten, durch Zugabe von 2 ml FACS-Puffer (Tab. 23) und Zentrifugation (5 min, 1500 rpm, 4 °C) ausgewaschen. Der Überstand wurde verworfen und anschließend der vorverdünnte Sekundärantikörper (Tab. 18) den resuspendierten Zellen hinzugesetzt. Dem folgte eine Inkubationsphase von 25 min auf Eis unter Lichtschutz. Anschließend wurden wieder 2 ml FACS-Puffer in jedes Röhrchen gegeben und bei 1500 rpm, 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets entweder in 300 µl FACS Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch gemessen oder für die CD4⁺/Foxp3⁺-Markierung weiterverarbeitet

Tab. 17: Markierungsprotokoll für den ersten Inkubationsschritt bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der mononukleären Zellen des Blutes

Primärer AK ¹	Firma, Kat.Nr.	Stadt	Klon	Isotyp	Verdünnung	Sekundärer AK
Mouse anti-dog CD3	Serotec, MCA 1774GA	Düsseldorf	CA17.2A12	IgG ₁	1:50	Goat anti-mouse IgG ₁ : R-FITC
Mouse anti-dog CD4	Serotec, MCA 1998S	Düsseldorf	CA13.1E4	IgG ₁	1:10	Goat anti-mouse IgG ₁ : R-FITC
Mouse anti-dog CD8β	Serotec, MCA 1775S	Düsseldorf	CA15.4G2	IgG ₁	1:20	Goat anti-mouse IgG ₁ : R-FITC
Mouse anti-dog CD21	Serotec, MCA 1781S	Düsseldorf	CA2.1D6	IgG ₁	1:100	Goat anti-mouse IgG ₁ : R-FITC
Mouse anti-horse MHC Class II	Serotec, MCA 1085	Düsseldorf	CVS20	IgG ₁	1:100	Goat anti-mouse IgG ₁ :R-PE
Rat anti-dog CD5	Serotec, MCA 1037G	Düsseldorf	YKIX322.3	IgG _{2a}	1:100	Mouse anti-rat IgG _{2a} heavy chain: FITC

¹AK: Antikörper

Tab. 18: Markierungsprotokoll für den zweiten Inkubationsschritt bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der mononukleären Zellen des Blutes

Sekundärer AK ¹	Firma, Kat.Nr.	Stadt, Land	Klon	Verdünnung
Goat anti-mouse IgG ₁ : R-FITC	Southern Biotech, 1070-02	Birmingham, USA	k. A. ²	1:200
Goat anti-mouse IgG ₁ : R-PE	Southern Biotech, 1070-09	Birmingham, USA	k. A.	1:200
Mouse anti-rat IgG _{2a} heavy chain: FITC	Serotec, MCA 278F	Düsseldorf	MARG2a-1	1:100

¹AK: Antikörper; ²k.A.: keine Angabe

3.8.2.2. Intrazelluläre CD4⁺/Foxp3⁺-Doppelfärbung

Nach dem letzten Reinigungsschritt der Oberflächenmarkierung wurde nach Anleitung des Herstellers 1 ml der zuvor frisch hergestellten Foxp3 Fixierung / Permeabilisierung-Lösung (eBiosciences, San Diego, USA) (Tab. 19) zu den isolierten Leukozyten hinzugegeben und bei Raumtemperatur unter Lichtschutz über Nacht (18 h) nach Empfehlung von Biller et al. (2007) inkubiert. Anschließend wurden 2 ml eines 1:10 in Aqua dest. verdünnten Permeabilisierungspuffers (eBioscience, San Diego, USA) hinzugegeben und die Proben bei 300 - 400 x g bei Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet erneut in 2 ml Permeabilisierungspuffer resuspendiert und 1 µl anti-mouse/rat Foxp3-Antikörper/10⁶-Zellen (Tab. 20) hinzugegeben und im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe weiterer 2 ml des Permeabilisierungspuffers erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 300 - 400 x g und Raumtemperatur für 5 Minuten. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert und im Durchflusszytometer (FACSCalibur®, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) gemessen.

Tab. 19: Rezept der Fixierungs-/Permeabilisierungslösung für die intrazelluläre Färbung

Reagenz	Anteil
Foxp3 Fixierung/Permeabilisierung Konzentrat (eBiosciences)	1 Teil
Foxp3 Fixierung/Permeabilisierung Verdünner (eBiosciences)	3 Teile

Tab. 20: Antikörper für die intrazelluläre Proteinmarkierung (FoxP3)

Antikörper	Firma, Kat.Nr.	Stadt, Land	Klon
Anti-mouse/rat Foxp3, rat IgG2a: PE	Becton Dickinson, 12-5773	Franklin Lakes, USA	FJK-16s

3.8.2.4. Messung und Auswertung der Daten

Die Messung der gefärbten Zellen erfolgte in einem Durchflusszytometer (FACSCalibur[®]) mit Hilfe des Programms CellQuestPro (Becton Dickinson, USA). Zu Beginn der Versuche wurde das Gerät auf die zu messenden Zellen eingestellt und diese Einstellungen als „Setup“ gespeichert, welches bei jeder Messung wieder aufgerufen wurde.

Ziel der Auswertung war es, den prozentualen Anteil der CD4⁺-, CD8⁺, CD21⁺- und CD3⁺-CD5⁺/MHCII⁺- und CD4⁺/Foxp3⁺- Lymphozyten an der gesamten Lymphozytenpopulation zu bestimmen und die CD4⁺/CD8⁺-Ratio zu errechnen.

3.8.2.5. Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Durchflusszytometrie

Tab. 21: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Hersteller	Stadt, Land	Artikelnummer
Ammoniumchlorid	Merck	Darmstadt	1.01146
Kaliumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	HN08.1
EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	8040.3
Dulbeccos Phosphate buffered saline (PBS) ohne Ca/Mg	Biochrom AG	Berlin	L182-01
Albuminfraktion V	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	8076.2
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA	352008
Greinerröhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One	Frickenhausen	188271
Trypanblau 0,5%, (w/v)	Biochrom AG	Berlin	L6323
Ficoll® (Biocoll)	Biochrom AG	Berlin	L6155
Foxp3 Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent	eBioscience	San Diego, USA	00-5521
Permeabilisierungs-Puffer	eBioscience	San Diego, USA	00-8333
Neubauer Hämozytometer	Paul Marienfeld	Lauda Königshofen	0640010

Tab. 22: Zusammensetzung des Erythrozyten-Lyse-Puffer

Ammoniumchlorid NH ₄ Cl	8,3 g
Kaliumhydrogencarbonat KHCO ₃	1,0 g
EDTA	0,03 g
in Aqua bidest auflösen und auf 1 Liter mit Aqua bidest auffüllen.	

Tab. 23: Zusammensetzung des FACS-Puffer

Albuminfraktion V	5g
Aqua bidest	700ml
PBS 10x	100ml
aufgefüllt auf 1L mit Aqua bidest	

Tab. 24: Verwendete Geräte für die Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Hersteller	Stadt, Land	Typ
Wasserbad	Grant Instruments Ltd	Cambridgeshire, UK	SUB14
Zentrifuge	Heraeus Holding GmbH	Hanau	Megafuge 1.OR
Durchflusszytometer mit Computereinheit	Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA	FACSCalibur®
Laminar Air Flow	Esco GB Ltd	Wiltshire, UK	Airstream® Max Class II BSC

3.8.3. Lymphozytenproliferationstest

3.8.3.1. Prinzip

Mit Hilfe des Bromdesoxyuridin (BrdU) ist es möglich, die Proliferation von Zellen unter bestimmten Zellkulturbedingungen zu analysieren. BrdU ist ein Thymidinanalogon, das dem Kulturmedium zugesetzt wird und von den proliferierenden Zellen in phosphorylierter Form anstelle des Nukleotids Desoxythymidintriphosphat (dTTP) während der S-Phase des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA eingebaut wird.

Anhand eines Maus-Anti-BrdU-Antikörpers, der mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) konjugiert wurde, kann eine stattgefundene DNA-Synthese durchflusszytometrisch nachgewiesen werden.

3.8.3.2. Durchführung des Stimulationstests

Zur Untersuchung der Lymphozytenproliferationsfähigkeit wurde Vollblut verwendet. Ausgehend von einer Zelldichte von $1 \times 10^7/\text{ml}$ wird eine Zelldichte von $4 \times 10^6/\text{ml}$ für den mitogeninduzierten Lymphozytenstimulationstest eingestellt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gestellt. In die ersten drei Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden für die Negativkontrolle nur 25 μl Zellkulturmedium hinzugegeben, in die zweite, dritte und vierte Reihe wurden jeweils pro Vertiefung 25 μl Mitogenverdünnung von Pokeweed Mitogen (PWM), Concanavalin A (Con A) oder Phytohämagglutinin (PHA) pipettiert (Tab. 25). Jeweils 100 μl der Zellsuspension wurden pro Vertiefung in 96-U-Well-Zellkulturplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) für den Ansatz der Zellkultur pro Hund aufgetragen. Die Endkonzentration pro Vertiefung betrug 4×10^5 Zellen pro ml.

Nach 48 h wurden 12,5 μl vorverdünntes BrdU (1:100 in PBS) in jede Vertiefung pipettiert. Weitere 24 h später wurde jede Kondition in ein FACS-Röhrchen überführt und bei 1500 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 250 μl eines zuvor in Aqua dest. 1:10 verdünnten Permeabilisierungspuffers (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) resuspendiert und für weitere 18-24 h inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen mit FACS-Puffer bei 1500 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 250 μl DNase I-Verdünnung (1:10 in DNase-Puffer, Tab. 28) gelöst und für 30 min bei 37 °C inkubiert (Biocenter 170, Renggli AG Salvis Lab, Rotkreuz, Schweiz). Nach einem weiteren Waschschrift mit FACS-Puffer wurden 50 μl des zuvor verdünnten FITC conjugated mouse anti-BrdU-Antikörpers (Tab. 26) in jedes Röhrchen pipettiert und 30 min auf Eis unter Lichtschutz inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Pellets in 300 μl FACS-Puffer resuspendiert und die proliferierten Zellen in einem FACSCalibur®-Durchflusszytometer gemessen.

3.8.3.3. Messung und Auswertung der Daten

Die Zählung der mittels anti-BrdU-Antikörper markierten und proliferierten Lymphozyten erfolgte durchflusszytometrisch mit Hilfe des Programms CellQuestPro (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA).

Zur Auswertung der Daten wurde der Stimulationsindex (SI) ermittelt. Dieser gibt das Vielfache an, um das die Proliferation durch Stimulation mit den Mitogenen PWM, Con A und PHA gegenüber dem reinen Zellkulturmedium (Kontrolle) zugenommen hat.

$$\text{Stimulationsindex (SI): } \frac{\text{Mitogenstimulierte Zellen}}{\text{Unstimulierte Zellen}}$$

Tab. 25: Verwendete Mitogene für den Lymphozytenproliferationstest

Mitogen	Firma, Kat.Nr.	Stadt, Land	Vorverdünnung	Endkonzentration
PWM	Sigma, L8777	St. Louis, USA	1:80	2,5 µg/ml
Con A	Sigma, C5275	St. Louis, USA	1:40	5 µg/ml
PHA-M	Sigma, L8902	St. Louis, USA	1:20	10 µg/ml

Tab. 26: Verwendeter anti-BrdU-Antikörper

Antikörper	Firma, Kat. Nr.	Stadt, Land	Vorverdünnung
Mouse anti BrdU FITC	Becton Dickinson, 556028	Franklin Lakes, USA	1:5 in FACS-Puffer

Tab. 27: Rezept Zellkulturmedium

Substanz	Zugabe
RPMI 1640 w/stable Glutamin	500 ml
Fetales Kälberserum	50 ml
Hepes Puffer	5 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml

Tab. 28: Rezept DNase I Puffer

Natriumchlorid	4,383 g
Magnesiumchlorid	0,427 g
HCl	5 µl (aus 1M Lösung)
auf 500 ml mit Aqua bidest auffüllen	

3.8.3.4. Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für den Lymphozytenproliferationstest

Tab. 29: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für den Lymphozytenproliferationstest

Bezeichnung	Hersteller	Stadt, Land	Artikelnummer
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG	Berlin	FG1215
HEPES-Puffer	Biochrom AG	Berlin	L1613
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG	Berlin	S0615
5-Bromo-2`deoxyuridine (BrdU)	Sigma	St. Louis, USA	B5002
Permeabilisierung Solution 2 Buffer	Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA	347692
PBS Dulbecco	Biochrom AG	Berlin	L 1820
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG	Berlin	A2213
96-U-Well-Mikrotiterplatte	Greiner Bio-One	Frickenhausen	650 180
Greinerröhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One	Frickenhausen	188271
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA	352008
Ficoll (Biocoll)	Biochrom AG	Berlin	L6155
Spritzenaufsatzfilter, 0,2 µm steril	VWR	Darmstadt	5140061
Trypanblau	Fluka Chemie AG	Buchs, Schweiz	93590
DNase I	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA	DN25
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	9265.1
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	2189.2
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	K025.1

Tab. 30: Verwendete Geräte für den Lymphozytenproliferationstest

Bezeichnung	Hersteller	Stadt, Land	Typ
Brutschrank	Renggli AG Salvis Lab	Rotkreuz, Schweiz	Biocenter 170
Zentrifuge	Heraeus Holding GmbH	Hanau	Megafuge 1.OR
Durchflusszytometer mit Computereinheit	Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA	FACSCalibur®

3.8.4. Proteinextraktion und Proteinbestimmung nach Bradford

3.8.4.1. Durchführung der Proteinextraktion

Für die vorliegende Arbeit wurde das Proteinextrakt aus den vier verfütterten Proteinquellen (Hühnerherzen, Fischmehl, Sojaextraktionsschrot, Hüttenkäse) und einer Negativkontrolle (Schweinefleisch) mittels einer Extraktion in Sörensen-Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) (Tab. 34 a+b) modifiziert nach Han et al. (2000) hergestellt. Für den futtermittelantigeninduzierten Lymphozytenproliferationstest wurden fünf verschiedene Antigenkonzentrationen (zwischen 30 und 500 µg/ml) verwendet.

Hierzu wurden zunächst das Schweinefleisch und die Hühnerherzen mit einer Schere zerkleinert und anschließend mit einer Klinge fein zerkleinert, während der Hüttenkäse mit einer Gabel gequetscht wurde. Das Sojaextraktionsschrot sowie das Fischmehl wurden vorher nicht weiter behandelt. Von jeder Probe wurden nun 3 g in ein 50 ml Greiner-Röhrchen überführt, mit dem Sörensen-Puffer 1:10 verdünnt und mit einem Dispergiergerät (T10-basic Ultra-Turrax, IKA, Staufen) 4 x 30 s homogenisiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation (Avanti J-26 XP, Beckman Coulter, Krefeld) der Proben bei 20000 x g für 15 min bei 4 °C. Der Überstand wurde in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt und die festen Bestandteile für weitere 10 min, bei 20000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Der letzte Schritt wurde noch einmal wiederholt, diesmal wurde die Zentrifugationsdauer auf 20 min erhöht. Im Fischmehl hatten sich auf der Überstandsoberfläche grobe Schwebepartikel angesammelt. Diese wurden mittels eines feinporigen Metallsiebes entfernt. Anschließend wurden alle Überstände durch einen Papierfaltenfilter von den groben Schwebepartikeln befreit und eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 20000 x g und 4 °C durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Filtration des Zentrifugationsüberstandes zunächst durch einen feinporigen unsterilen Filter (0,45 µm) und anschließend die Sterilfiltration durch einen 0,2 µm feinen Filter und die Aliquotierung des Extraktes zu je 1 ml Volumen in sterile Eppendorfröhrchen. Die gewonnenen Proteinextrakte wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -25 °C gelagert. Des Weiteren wurde 1 ml des Proteinextraktes zu je 100 µl für die Proteinbestimmung aliquotiert. Da aus diesem ersten Durchgang von den Proben Hühnerherz, Fischmehl und Sojaextraktionsschrot weniger Überstand als erwartet gewonnen wurde, wurden in einem zweiten Durchgang nochmals mit jeweils 4 g dieser drei Futtermittel eine Proteinextraktion wie oben erwähnt durchgeführt.

3.8.4.2. Proteinbestimmung nach Bradford

3.8.4.2.1. Prinzip

Proteine besitzen keine natürliche Färbung, weshalb sie zunächst mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 angefärbt werden müssen um in einem sichtbaren Wellenlängenbereich gemessen werden zu können. Dieser Farbstoff bildet in saurer Lösung mit den Seitenketten der Proteine Komplexe, gleichzeitig verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs auf 595 nm. Der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplexes ist höher als der des freien Farbstoffes, weshalb die Zunahme der Absorption bei 595 nm durch die Bildung des Komplexes photometrisch (Photometer Ultrospec 3300 pro, Pharmacia Biotech, Nümbrecht) gemessen werden kann. Die Intensität des Farbstoffes steht dabei in linearem Zusammenhang mit der vorhandenen Proteinkonzentration.

3.8.4.2.2. Durchführung

Zunächst wurde eine Rinderserumalbumin (BSA) - Kalibrierungsreihe (10 - 150 µg/ml) erstellt. Hierzu wurde eine Stammlösung (10 mg/ml) angesetzt, in der 110 mg BSA in 11 ml Sörensen-Puffer (Tab. 35a, 35b) gelöst wurden. Hieraus wurden im Doppelansatz durch eine 1:10 Verdünnung mit Sörensen-Puffer 10 ml einer 1 mg/ml konzentrierten Lösung hergestellt und durch nochmalige 10 fache Verdünnung dieser Lösung mit Sörensen-Puffer eine 100 µg/ml konzentrierte Lösung hergestellt. Weitere Konzentrationen wurden nach einer Mischtablette erstellt (Tab. 31).

Tab. 31: Mischtablette zur Erstellung der BSA-Kalibrierreihe

Kalibrierlösung BSA [µg/ml]	Volumen Sörensen-Puffer [µl]	Volumen 100 µg/ml [µl]	Volumen 1 mg/ml [µl]
10	900	100	
20	800	200	
40	600	400	
60	400	600	
80	200	800	
100		1000	
120	880		120
150	850		150

3.8.4.2.3. Messung und Auswertung der Daten

Vor der Messung der Proteingehalte erfolgte zunächst die Verdünnung der Proben (Tab. 32) mit dem Sörensen-Puffer, in dem auch die zu ermittelnde Proteinprobe vorliegt. Die Messung der Proben erfolgte im Doppelansatz. Hierzu wurden 100 µl der jeweiligen vorverdünnten Probe in Halbmikroküvetten vorgelegt und 1 ml Bradford-Reagenz (Tab. 36) hinzugeben. Nach einer drei bis maximal zehn minütigen Inkubationsphase bei Raumtemperatur konnte die Absorption bei 595 nm photometrisch gemessen werden. Als Blindwert wurden 100 µl Sörensen-Puffer auf 1 ml Bradford-Reagenz mitgemessen.

Mit Hilfe der Swift Photometer Software Quantification (Pharmacia Biotech, Nümbrecht) konnte eine lineare Kalibrierungskurve für einen Proteingehalt von 10 - 150 µg/ml mittels Regressionsgleichung ($y = 384,13x - 3,0126$) in Excel erstellt werden. Der Regressionskoeffizient (Bestimmtheitsmaß) betrug $R^2 = 0,9967$. Die Berechnung der tatsächlichen Proteinkonzentration in den Extrakten erfolgte, indem die photometrisch gemessenen Extinktionswerte der Proteinextrakte unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors mit der Formel für die lineare Regressionsgleichung der Referenzlösungen auf den Proteingehalt pro Milliliter Extrakt umgerechnet wurden.

Proteinkonzentration in µg/ml = $(384,13x - 3,0126) * \text{Verdünnungsfaktor}$

x = gemessene Extinktion bei 595 nm

Tab. 32: Verdünnungsprotokoll der Proteinextrakte mittels Sörensen-Phosphatpuffer für die Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford

Proteinextrakt	Verdünnungsfaktor
Hüttenkäse	1:50
Fischprotein	1:10
Hühnerprotein	1:10
Schweineprotein	1:100
Sojaprotein	1:25

Tab. 33: Gemessene mittlere Proteingehalte im hergestellten Proteinextrakt

Proteinextrakt	Proteingehalt [$\mu\text{g}/\text{ml}$]
Hüttenkäse	4796
Fischprotein	750
Fischprotein 2 ¹	615
Hühnerprotein	1133
Hühnerprotein 2 ¹	1053
Schweineprotein	8084
Sojaprotein	3070
Sojaprotein 2 ¹	2350

¹ Aus dem zweiten Durchgang gewonnenes Proteinextrakt

3.8.4.2.4. Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Proteinextraktion und Proteinbestimmung nach Bradford

Tab. 34: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Proteinextraktion und Proteinbestimmung nach Bradford

Bezeichnung	Hersteller	Stadt, Land	Artikelnummer
Dinatriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat (M=358,14/g)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	T106.1
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (M=137,99/g)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	K300.1
Plastibrand® 1,5 ml Halbmikroküvetten (PMMA)	Brand GmbH + Co KG	Wertheim	759115
Rinderserumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	8076
Coomassie Brilliant Blau G-250	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	9598
Ethanol 96%			
o-Phosphorsäure 85%			
Trichter	Vitlab GmbH	Großostheim	709
Faltenfilter	Whatman	Kent, UK	10311651
Spritzenaufsatzfilter, 0,45 µm	VWR	Darmstadt	5140062
Spritzenaufsatzfilter, steril 0,2 µm	VWR	Darmstadt	5140061

Tab. 35a: Zusammensetzung des 20 mM Sörensen-Natriumphosphatpuffers (pH 7,4); Schritt 1

Substanz	Erzielte molare Masse (M)	Zugabe (g)
Dinatriumhydrogenphosphat (M=358,14/g)	0,02	7,1628 in 1 Liter Aqua bidest lösen
Natriumdihydrogenphosphat (M=137,99/g)	0,2	27,598 in 1 Liter Aqua bidest lösen

Tab. 35b: Zusammensetzung des 20 mM Sörensen-Natriumphosphatpuffers (pH 7,4); Schritt 2

Substanz	Zugabe
0,2 molare Natriumdihydrogenphosphatlösung	100 ml
Zugabe von 0,02 molarer Dinatriumhydrogenphosphatlösung bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 7,4	2900 ml

Tab. 36: Zusammensetzung des Bradford Reagenz

Coomassie Brilliant Blau G-250	20 mg
Ethanol 96%	25 ml
o-Phosphorsäure 85%	50 ml
Aqua bidest	425 ml
Durch Faltenfilter filtrieren	

Tab. 37: Verwendete Geräte für die Proteinextraktion und Proteinbestimmung nach Bradford

Bezeichnung	Hersteller	Stadt, Land	Typ
Zentrifuge	Beckman Coulter	Krefeld	Avanti J-26 XP
Dispergiergerät	IKA	Staufen	T10-basic Ultra-Turrax
Photometer	Pharmacia Biotech	Nümbrecht	Ultrospec 3300 pro

3.8.4.5. Durchführung eines futtermittelantigeninduzierten Lymphozytenproliferationstests

Ausgehend von einer Zelldichte von 1×10^7 /ml wurde eine Zelldichte von $1,6 \times 10^7$ /ml für diesen Stimulationstest eingestellt und die Ansätze bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gestellt. Pro Kondition wurden drei Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit je 25 μ l Zellsuspension und 100 μ l Proteinextrakt in einer Endkonzentration von 4×10^5 Zellen/ml beimpft. Die gewonnenen Proteinextrakte wurden jeweils unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut, geschüttelt und auf eine Endkonzentration (durch Verdünnung mit Zellkulturmedium) von 30, 75, 125, 250 oder 500 μ g/ml eingestellt (Tab. 38).

Der weitere Ablauf entsprach dem eines mitogeninduzierten Lymphozytenstimulationstests mit dem einzigen Unterschied, dass hier die Zellen bis zum BrdU-Zusatz fünf Tage (statt drei) bei 37 °C und 5,0 % CO₂-Atmosphäre inkubiert wurden.

Tab. 38: Mischtablette von Proteinextrakt und Zellkulturmedium für jeweils 2600 µl

Probe	Endkonzentration in µg/ml									
	125		250		500		75		30	
	PE	Medium	PE	Medium	PE	Medium	PE	Medium	PE	Medium
Hüttenkäse	85	2515	169	2431	339	2262				
Fischprotein 1	543	2058	1084	1516	2168	432	325	2275	130	2470
Fischprotein 2	660	1940					396	2204	159	2442
Hühnerprotein 1	359	2241	717	1883	1435	1165	215	2385	86	2514
Hühnerprotein 2	386	2214					232	2369	93	2508
Schweineprotein	50	2550	101	2500	201	2399				
Sojaprotein 1	132	2468	265	2335	529	2071				
Sojaprotein 2	173	2427	346	2254	692	1908				

Immer erst kurz vor Gebrauch angesetzt

3.8.5. Verdaulichkeitsversuch

3.8.5.1. Durchführung

Die Bestimmung der scheinbaren Verdaulichkeit (sV) der Rohnährstoffe in den Fäzes während des Verdaulichkeitsversuchs erfolgte mithilfe des Verdaulichkeitsmarkers Chromoxid (Cr_3O_2) im Futter. In den mehligem Anteil des Versuchsfutters wurde jeweils wenige Tage vor Verfütterung Chromoxid in einer Konzentration von 0,5 % eingemischt. Jede Fütterungsperiode dauerte vier Tage mit anschließender Sammlung der frisch abgesetzten Fäzes morgens und nachmittags. Hierzu wurden die Hunde zeitweise separiert um eine individuelle Zuordnung der Proben gewährleisten zu können.

3.8.5.2. Auswertung

Sowohl die Fäzesproben als auch die Proben der beiden verzehrfertigen Versuchsrationen wurden nach Ermittlung des Frischgewichtes bei - 20 °C zwischengelagert und anschließend bis zur Gewichtskonstanz gefriergetrocknet. Die getrockneten Proben wurden gemahlen und zur Bestimmung der Rohnährstoffgehalte (Rohprotein, Rohfett, Rohfaser, Rohasche), der Mineralstoffe (Kalzium, Phosphor, Natrium und Kalium) und des Indikators Chromoxid einer Analyse nach den Vorschriften der VDLUFA (Methodenbuch III, 1997) (Tab. 39) unterzogen und anschließend deren scheinbare Verdaulichkeit errechnet.

Die Berechnung der scheinbaren Verdaulichkeit (sV) erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{sV [\%]} = 100 - [(\text{Indikator}_{\text{Futter}} / \text{Indikator}_{\text{Kot}}) \times (\text{Nährstoff}_{\text{Kot}} / \text{Nährstoff}_{\text{Futter}}) \times 100]$$

Tab. 39: Analysierte Rohnähr- und Mineralstoffe im Futter und den Fäzes sowie die hierfür angewandte Methodik nach VDLUFA (Methodenbuch III, 1997)

Parameter	VDLUFA-Vorschrift	Methodik
Trockensubstanz	VDLUFA Methoden 3.1	Trocknung
Rohprotein	VDLUFA Methode 4.1.2	Dumas-Verbrennungsmethode
Rohfett	VDLUFA Methode 5.1.1	Extraktion mit Petroleumbenzin
Rohfaser	Angelehnt an VDLUFA, Verwendung von Filterbags im Fiber Analyzer Ankom 2000	Extraktion mit Schwefelsäure und Natronlauge (anstelle von Kalilauge)
Rohasche	VDLUFA Methode 8.1	Veraschung
Kalzium	VDLUFA Methode 10.3.1 Modifikation	Flammenphotometrisch nach Säureaufschluss
Phosphor	VDLUFA Methode 10.6.1	Photometrisch nach Säureaufschluss
Natrium	VDLUFA Methode 10.1.1	Flammenphotometrisch nach Säureaufschluss
Kalium	VDLUFA Methode 10.2.1	Flammenphotometrisch nach Säureaufschluss

3.8.6. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung erfolgte mit IBM SPSS Statistics 19.0 für Windows.

3.8.6.1. Statistische Auswertung der Ergebnisse des hämatologischen Blutbildes, des Differentialblutbildes, der Verteilung der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut und des mitogeninduzierten Lymphozytenproliferationstests

Die Auswertung der Daten am ersten Blutentnahmezeitpunkt erfolgte aufgrund der geringen Stichprobenzahl nur deskriptiv. Der Wurfefekt konnte mangels fehlender Werte nicht berücksichtigt werden. Die Parameter wurden mit dem Allgemeinen Linearen Modell (Univariat; Scheffé-Test) für den Faktor „Gruppe“ auf Unterschiede getestet. Für die nachfolgenden Zeitpunkte wurden die Parameter mit dem Allgemeinen Linearen Modell (Univariat; Scheffé-Test) für die Faktoren „Gruppe“ und „Wurf“ auf Unterschiede getestet. Lag die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 %, wurde der Unterschied als signifikant erachtet. Signifikante Unterschiede wurden in den Tabellen mit Indizes (^{a,b,c,d}) versehen, wobei Werte mit unterschiedlichen Indizes sich signifikant unterschieden. Die Versuchsergebnisse wurden für jeden Zeitpunkt in Form des arithmetischen Mittelwertes und seiner Standardabweichung angegeben.

3.8.6.2. Statistische Auswertung der Ergebnisse des hämatologischen Blutbildes, des Differentialblutbildes, der Verteilung der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut und des mitogeninduzierten Lymphozytenproliferationstests in Abhängigkeit des Alters der Welpen

Für die Überprüfung eines signifikanten Einflusses des Alters der Welpen auf die Ergebnisse wurde für den Test auf Normalverteilung der Shapiro-Wilk-Test verwendet. Lag keine Normalverteilung vor, wurde für den Vergleich der Mann-Whitney-U-Test als nicht parametrischer Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Für normalverteilte Parameter wurden die Mittelwerte mit der einfaktorischen ANOVA (Scheffé-Test) und dem Faktor „Alter der Welpen“ auf Signifikanzen getestet. Lag die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 %, wurde der Unterschied als signifikant erachtet. Signifikante Unterschiede wurden in den Tabellen mit Indizes (^{a,b,c,d}) versehen, wobei Werte mit unterschiedlichen Indizes sich signifikant unterschieden. Die Versuchsergebnisse wurden für jede Alterskategorie in Form des arithmetischen Mittelwertes und seiner Standardabweichung angegeben.

3.8.6.3. Statistische Auswertung des futtermittelantigeninduzierten Lymphozytenproliferationstests

Für den Test auf Normalverteilung der Daten des futtermittelantigeninduzierten Lymphozytenproliferationstests wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet. Lag keine Normalverteilung vor, wurde für den Vergleich der Mann-Whitney-U-Test als nicht parametrischer Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Normalverteilte Parameter wurden mittels einfaktorieller ANOVA und dem Scheffé-Test als PostHoc-Test für den Faktor „Gruppe“ auf Unterschiede getestet. Lag die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 %, wurde der Unterschied als signifikant erachtet. Signifikante Unterschiede wurden in den Tabellen mit Indizes ^(a,b,c,d) versehen, wobei Werte mit unterschiedlichen Indizes sich signifikant unterschieden. Die Versuchsergebnisse wurden in Form des arithmetischen Mittelwertes und seiner Standardabweichung angegeben.

3.8.6.4. Statistische Auswertung der Kotkonsistenzen und des Verdaulichkeitsversuchs

Sowohl die Kotkonsistenzen als auch die Parameter des Verdaulichkeitsversuchs wurden mit dem Allgemeinen Linearen Modell (Univariat) und dem Scheffé-Test als PostHoc-Test für die Faktoren „Gruppe“ und „Wurf“ auf Unterschiede getestet. Lag die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 %, wurde der Unterschied als signifikant erachtet. Signifikante Unterschiede wurden in den Tabellen mit Indizes ^(a,b,c,d) versehen, wobei Werte mit unterschiedlichen Indizes sich signifikant unterschieden. Die Versuchsergebnisse wurden in Form des arithmetischen Mittelwertes und seiner Standardabweichung angegeben.

4. ERGEBNISSE

4.1. Blutuntersuchung

Aufgrund des geringen Probenmaterials, besonders am ersten Probenentnahmetag, konnten nicht bei allen Welpen alle vorgesehenen Tests durchgeführt werden. Des Weiteren war es nicht möglich, zum ersten Zeitpunkt (3. LW) die Wurfunterschiede darzustellen, da hier jeweils nur Vollblut eines einzigen Welpen aus dem ersten Wurf gewonnen werden konnte.

4.1.1. Blutbild in Abhängigkeit der Fütterung

Die hämatologischen Parameter unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt zwischen den beiden Versuchsgruppen. Eine Ausnahme stellten die Thrombozyten am vierten Blutentnahmezeitpunkt dar. Hierbei war die Zahl der Blutplättchen in der Mischproteingruppe signifikant höher als in der Einzelproteingruppe (Tab. 40 - 43).

4.1.2. Blutbild in Abhängigkeit der Wurfzugehörigkeit

Zu jedem Zeitpunkt ließen sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Würfen nachweisen. In der sechsten Lebenswoche wies die mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC) bei den Welpen des ersten Wurfs einen signifikant höheren Wert als bei den Welpen des zweiten Wurfs auf, während die Konzentration der Thrombozyten in Wurf 2 (W2) deutlich höher als in Wurf 1 (W1) war. Dieses änderte sich in der dreizehnten Lebenswoche, bei der nur das mittlere Erythrozytenvolumen (MCV) und der mittlere Hämoglobingehalt (MCH) signifikante Wurfunterschiede aufwiesen, wobei jeweils der zweite Wurf höhere Werte als der erste aufzeigte. Am letzten Zeitpunkt konnten Unterschiede zwischen dem MCHC und der Gesamtleukozytenzahl zwischen den Würfen nachgewiesen werden. Auch hier sind bei den acht Welpen des zweiten Wurfs höhere Werte als bei den Welpen des ersten Wurfs erreicht worden (Tab. 40 - 43).

4.1.3. Differentialblutbild in Abhängigkeit der Fütterung

Im Differentialblutbild traten keine signifikanten Differenzen zwischen den beiden Versuchsgruppen auf. Lediglich in der dritten Lebenswoche, vor Beginn des Fütterungsversuchs, konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Gr.1 > Gr.2) in der absoluten und relativen Zahl der eosinophilen Granulozyten festgestellt werden. Auch hier sind wieder deutliche Wurfunterschiede feststellbar gewesen (Tab. 44 - 47).

4.1.4. Differentialblutbild in Abhängigkeit der Wurfzugehörigkeit

Zwischen der 6. und 21. Lebenswoche waren die prozentualen Anteile der Lymphozyten bei den Welpen aus Wurf 1 signifikant erhöht im Vergleich zu jenen des zweiten Wurfes. Die absoluten und relativen Zahlen der neutrophilen Granulozyten waren während des gesamten Zeitraumes in Wurf 2 (W2) signifikant höher als in Wurf 1 (W1). Die absoluten und relativen Werte der basophilen Granulozyten waren in der sechsten Lebenswoche in Wurf 1 signifikant höher als in Wurf 2, wohingegen sich das Verhältnis zum vierten Zeitpunkt umkehrte. Die absoluten und relativen Werte der eosinophilen Granulozyten unterschieden sich lediglich in der dreizehnten Lebenswoche signifikant zwischen den beiden Würfen ($W1 > W2$).

Tab. 40: Ergebnisse der hämatologischen Untersuchung der Welpen der Gruppen 1 und 2 zum Zeitpunkt 1

		Gruppe 1 (n=3)		Gruppe 2 (n=4)		p-Werte
		MW	SD	MW	SD	
Erythrozyten	[10 ¹² /l]	3,95	0,17	4,06	0,12	0,397
Hämoglobin	[g/dl]	9,30	0,53	9,25	0,39	0,890
Hämatokrit	[%]	29,2	1,78	29,7	1,36	0,723
MCV	[fl]	73,9	1,35	73,2	1,40	0,509
MCH	[pg]	23,5	0,76	22,8	0,59	0,210
MCHC	[g/dl]	31,8	0,98	31,2	0,48	0,310
Thrombozyten	[10 ⁹ /l]	323	21,7	377	62,5	0,223
Leukozyten	[10 ⁹ /l]	12,9	0,18	14,2	1,28	0,148

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung

Tab. 41: Ergebnisse der hämatologischen Untersuchung der Welpen der Gruppen 1 und 2 und Würfe 1 und 2 zum Zeitpunkt 2 (n = 8)

		Gruppe 1 ¹		Gruppe 2 ²		Wurf 1 ³		Wurf 2 ⁴		p-Werte		
		MW ⁵	SD ⁶	MW	SD	MW	SD	MW	SD	Gruppe	Wurf	Gruppe*Wurf
Erythrozyten	[10 ¹² /l]	4,53	0,17	4,43	0,14	4,52	0,14	4,44	0,18	0,297	0,396	0,591
Hämoglobin	[g/dl]	9,85	0,34	9,73	0,49	10,0 ^a	0,18	9,56 ^b	0,47	0,499	0,027	0,287
Hämatokrit	[%]	30,1	1,12	29,9	1,52	30,1	1,33	30,0	1,35	0,825	0,905	0,799
MCV	[fl]	66,5	1,33	67,5	3,26	66,6	3,07	67,5	1,75	0,462	0,507	0,824
MCH	[pg]	21,8	0,42	21,9	0,80	22,2 ^a	0,41	21,5 ^b	0,63	0,597	0,031	0,431
MCHC	[g/dl]	32,7	0,59	32,5	1,79	33,4 ^a	1,40	31,9 ^b	0,65	0,746	0,026	0,361
Thrombozyten	[10 ⁹ /l]	307	84,2	291	137	225 ^a	78,7	374 ^b	83,6	0,710	0,003	0,237
Leukozyten	[10 ⁹ /l]	13,7	1,36	13,4	1,55	12,7 ^a	1,34	14,5 ^b	0,83	0,613	0,011	0,613

¹Gruppe1: Einzelprotein, ²Gruppe 2: Mischprotein, ³Wurf 1: Nannis Welpen, ⁴Wurf 2: Cassys Welpen, ⁵MW: Mittelwert, ⁶SD: StandardabweichungDie MW in einer Zeile mit verschiedenen Superskripten (^a, ^b) unterscheiden sich signifikant voneinander (p < 0,05)

Tab. 42: Ergebnisse der hämatologischen Untersuchung der Welpen der Gruppen 1 und 2 und Würfe 1 und 2 zum Zeitpunkt 3 (n = 8)

		Gruppe 1 ¹		Gruppe 2 ²		Wurf 1 ³		Wurf 2 ⁴		p-Werte		
		MW ⁵	SD ⁶	MW	SD	MW	SD	MW	SD	Gruppe	Wurf	Gruppe*Wurf
Erythrozyten	[10 ¹² /l]	6,00	0,38	5,81	0,36	5,88	0,37	5,93	0,37	0,308	0,773	0,252
Hämoglobin	[g/dl]	12,5	0,94	11,8	0,94	11,7	1,02	12,5	0,78	0,144	0,091	0,956
Hämatokrit	[%]	37,2	2,62	35,0	3,05	35,1	3,41	37,2	2,17	0,146	0,159	0,938
MCV	[fl]	62,0	0,55	60,3	4,64	59,6 ^a	3,35	62,7 ^b	2,57	0,247	0,038	0,079
MCH	[pg]	20,8	0,40	20,3	1,37	19,9 ^a	0,93	21,1 ^b	0,65	0,191	0,003	0,028
MCHC	[g/dl]	33,5	0,57	33,6	0,93	33,4	0,92	33,7	0,55	0,741	0,493	0,881
Thrombozyten	[10 ⁹ /l]	363	45,0	318	82,7	352	72,9	329	66,6	0,200	0,515	0,270
Leukozyten	[10 ⁹ /l]	12,9	2,58	13,1	1,72	12,8	2,40	13,3	1,93	0,858	0,647	0,527

¹Gruppe. 1: Einzelprotein, ²Gruppe 2: Mischprotein, ³Wurf 1: Nannis Welpen, ⁴Wurf 2: Cassys Welpen, ⁵MW: Mittelwert, ⁶SD: Standardabweichung,

Die MW in einer Zeile mit verschiedenen Superskripten (^a, ^b) unterscheiden sich signifikant voneinander (p < 0,05)

Tab. 43: Ergebnisse der hämatologischen Untersuchung der Welpen der Gruppen 1 und 2 zum Zeitpunkt 4 (n = 8)

		Gruppe 1 ¹		Gruppe 2 ²		Wurf 1 ³		Wurf 2 ⁴		p-Werte		
		MW ⁵	SD ⁶	MW	SD	MW	SD	MW	SD	Gruppe	Wurf	Gruppe*Wurf
Erythrozyten	[10 ¹² /l]	6,21	0,22	6,48	0,35	6,37	0,39	6,33	0,25	0,113	0,808	0,518
Hämoglobin	[g/dl]	13,8	0,63	14,2	0,94	13,8	0,74	14,1	0,87	0,378	0,474	0,885
Hämatokrit	[%]	41,3	1,78	42,6	2,18	42,8	1,98	41,1	1,83	0,191	0,101	0,858
MCV	[fl]	66,5	2,41	65,9	2,36	67,3	2,63	65,0	1,29	0,590	0,055	0,488
MCH	[pg]	22,2	0,62	22,0	0,96	21,7 ^a	0,71	22,5 ^b	0,68	0,704	0,046	0,266
MCHC	[g/dl]	33,4	1,20	33,5	1,51	32,3 ^a	0,60	34,6 ^b	0,50	0,764	< 0,001	0,332
Thrombozyten	[10 ⁹ /l]	304 ^a	38,5	252 ^b	50,3	259	42,6	296	54,7	0,028	0,105	0,337
Leukozyten	[10 ⁹ /l]	10,5	1,38	11,0	1,85	9,70 ^a	1,40	11,8 ^b	1,03	0,461	0,008	0,642

¹Gruppe1: Mischprotein, ²Gruppe 2: Einzelprotein, ³Wurf 1: Nannis Welpen, ⁴Wurf 2: Cassys Welpen, ⁵MW: Mittelwert, ⁶SD: Standardabweichung

Die MW in einer Zeile mit verschiedenen Superskripten (^a, ^b) unterscheiden sich signifikant voneinander (p < 0,05)

Tab. 44: Ergebnisse des Differentialblutbildes der Welpen der Gruppen 1 und 2 zum Zeitpunkt 1

		Gruppe 1 (n=3)		Gruppe 2 (n=4)		p-Werte
		MW ¹	SD ²	MW	SD	
Lymphozyten	[10 ⁹ /l]	7,47	0,17	8,71	1,50	0,224
	[%]	58,1	1,95	61,2	4,96	0,480
Neutrophile Granulozyten	[10 ⁹ /l]	4,52	0,22	4,69	0,34	0,480
	[%]	35,1	2,00	33,4	4,33	0,516
Monozyten	[10 ⁹ /l]	0,59	0,44	0,58	0,47	1,000
	[%]	4,53	3,29	4,13	3,40	0,724
Eosinophile Granulozyten	[10 ⁹ /l]	0,27 ^a	0,03	0,17 ^b	0,05	0,016
	[%]	2,10 ^a	0,20	1,20 ^b	0,32	0,008
Basophile Granulozyten	[10 ⁹ /l]	0,02	0,01	0,02	0,01	0,186
	[%]	0,14	0,11	0,13	0,01	0,703

¹MW: Mittelwert, ²SD: Standardabweichung

Die MW der Gruppe mit verschiedenen Superskripten (^a, ^b) unterscheiden sich signifikant voneinander (p < 0,05)

Tab. 45: Ergebnisse des Differentialblutbildes der Welpen der Gruppen 1 und 2 und Würfe 1 und 2 zum Zeitpunkt 2 (n = 8)

		Gruppe 1 ¹		Gruppe 2 ²		Wurf 1 ³		Wurf 2 ⁴		p-Werte		
		MW ⁵	SD ⁶	MW	SD	MW	SD	MW	SD	Gruppe	Wurf	Gruppe*Wurf
Lymphozyten	[10 ⁹ /l]	6,23	0,10	6,59	0,66	6,40	0,82	6,42	0,91	0,438	0,980	0,375
	[%]	45,5	6,22	49,5	5,58	50,6 ^a	4,91	44,4 ^b	5,69	0,152	0,033	0,587
Neutrophile Granulozyten	[10 ⁹ /l]	5,97	1,21	5,84	1,29	4,94 ^a	0,74	6,87 ^b	0,65	0,738	< 0,001	0,940
	[%]	43,3	5,83	43,1	5,52	38,8 ^a	3,40	47,5 ^b	3,14	0,906	< 0,001	0,808
Monozyten	[10 ⁹ /l]	1,24	0,48	0,78	0,51	1,01	0,40	0,93	0,66	0,105	0,557	0,708
	[%]	9,18	3,50	5,89	3,81	8,60	3,06	6,46	4,58	0,103	0,274	0,680
Eosinophile Granulozyten	[10 ⁹ /l]	0,24	0,12	0,17	0,06	0,20	0,08	0,20	0,11	0,184	0,900	0,566
	[%]	1,69	0,76	1,24	0,40	1,51	0,48	1,41	0,79	0,186	0,761	0,497
Basophile Granulozyten	[10 ⁹ /l]	0,04	0,01	0,04	0,01	0,05 ^a	0,01	0,03 ^b	0,01	0,474	0,047	1,000
	[%]	0,33	0,16	0,30	0,15	0,41 ^a	0,12	0,21 ^b	0,10	0,686	0,006	1,000

¹Gruppe. 1: Einzelprotein, ²Gruppe 2: Mischprotein, ³Wurf 1: Nannis Welpen, ⁴Wurf 2: Cassys Welpen, ⁵MW: Mittelwert, ⁶SD: Standardabweichung

Die MW in einer Zeile mit verschiedenen Superskripten (^a, ^b) unterscheiden sich signifikant voneinander (p < 0,05)

Tab. 46: Ergebnisse des Differentialblutbildes der Welpen der Gruppen 1 und 2 und Würfe 1 und 2 zum Zeitpunkt 3 (n = 8)

		Gruppe 1 ¹		Gruppe 2 ²		Wurf 1 ³		Wurf 2 ⁴		p-Werte		
		MW ⁵	SD ⁶	MW	SD	MW	SD	MW	SD	Gruppe	Wurf	Gruppe*Wurf
Lymphozyten	[10 ⁹ /l]	4,97	1,56	5,85	1,14	5,98	1,45	4,85	1,17	0,209	0,114	0,790
	[%]	38,1	7,02	45,1	11,0	47,0 ^a	10,2	36,2 ^b	5,46	0,084	0,013	0,284
Neutrophile Granulozyten	[10 ⁹ /l]	6,46	1,63	6,09	1,66	5,10 ^a	1,21	7,45 ^b	0,95	0,522	0,001	0,482
	[%]	50,2	10,1	46,1	10,1	40,0 ^a	6,33	56,3 ^b	4,77	0,157	< 0,001	0,771
Monozyten	[10 ⁹ /l]	0,99	0,56	0,91	0,70	1,07	0,72	0,83	0,50	0,794	0,474	0,393
	[%]	8,54	3,50	6,63	4,89	8,94	4,70	6,23	3,45	0,368	0,209	0,260
Eosinophile Ganulozyten	[10 ⁹ /l]	0,38	0,40	0,26	0,20	0,50 ^a	0,36	0,15 ^b	0,09	0,367	0,019	0,288
	[%]	2,88	2,49	1,96	1,39	3,78 ^a	2,03	1,06 ^b	0,55	0,222	0,002	0,210
Basophile Granulozyten	[10 ⁹ /l]	0,04	0,01	0,04	0,01	0,04	0,01	0,03	0,01	1,000	0,381	0,657
	[%]	0,29	0,08	0,26	0,07	0,31	0,08	0,24	0,05	0,510	0,064	1,000

¹Gruppe. 1: Einzelprotein, ²Gruppe 2: Mischprotein, ³Wurf 1: Nannis Welpen, ⁴Wurf 2: Cassys Welpen, ⁵MW: Mittelwert, ⁶SD: Standardabweichung

Die MW in einer Zeile mit verschiedenen Superskripten (^a, ^b) unterscheiden sich signifikant voneinander (p < 0,05)

Tab. 47: Ergebnisse des Differentialblutbildes der Welpen der Gruppen 1 und 2 und Würfe 1 und 2 zum Zeitpunkt 4 (n = 8)

		Gruppe 1 ¹		Gruppe 2 ²		Wurf 1 ³		Wurf 2 ⁴		p-Werte		
		MW ⁵	SD ⁶	MW	SD	MW	SD	MW	SD	Gruppe	Wurf	Gruppe*Wurf
Lymphozyten	[10 ⁹ /l]	4,61	0,76	4,76	0,70	4,68	0,79	4,69	0,68	0,703	0,987	0,482
	[%]	44,3	7,28	43,9	5,96	48,2 ^a	4,33	40,0 ^b	5,58	0,880	0,009	0,645
Neutrophile Granulozyten	[10 ⁹ /l]	5,10	1,38	5,11	1,37	4,09 ^a	0,82	6,12 ^b	0,86	0,985	0,001	0,925
	[%]	48,2	8,13	45,9	5,93	42,1 ^a	5,09	52,0 ^b	4,78	0,391	0,002	0,641
Monozyten	[10 ⁹ /l]	0,55	0,17	0,82	0,37	0,67	0,21	0,71	0,40	0,093	0,767	0,626
	[%]	5,23	1,61	7,54	2,95	6,83	2,12	5,94	3,07	0,091	0,494	0,869
Eosinophile Granulozyten	[10 ⁹ /l]	0,21	0,09	0,26	0,08	0,26	0,08	0,21	0,09	0,263	0,336	0,933
	[%]	2,03	0,83	2,44	0,96	2,65	0,82	1,81	0,80	0,343	0,068	0,662
Basophile Granulozyten	[10 ⁹ /l]	0,03	0,01	0,03	0,01	0,02 ^a	0,00	0,04 ^b	0,01	1,000	< 0,001	0,474
	[%]	0,29	0,11	0,25	0,05	0,21 ^a	0,04	0,33 ^b	0,09	0,232	0,003	0,058

¹Gruppe. 1: Mischprotein, ²Gruppe 2: Einzelprotein, ³Wurf 1: Nannis Welpen, ⁴Wurf 2: Cassys Welpen, ⁵MW: Mittelwert, ⁶SD: Standardabweichung

Die MW in einer Zeile mit verschiedenen Superskripten (^a, ^b) unterscheiden sich signifikant voneinander (p < 0,05)

4.1.5. Auswertung unter Berücksichtigung des Alters der Welpen

Um den Einfluss des Alters der Hunde zu berücksichtigen, wurde unabhängig vom Versuchsfutter der Hunde, für jeden Altersabschnitt die Mittelwerte der Parameter berechnet. Die Altersabschnitte entsprechen in diesem Fall den vier Blutentnahmezeitpunkten (3., 6., 13. und 21. LW).

4.1.5.1. Ergebnisse des hämatologischen Blutbildes unter Berücksichtigung des Alters der Welpen

Sowohl die Zahl der Erythrozyten als auch die Hämoglobinkonzentration und der Hämatokrit nahmen im Verlauf stetig zu, während die Anzahl der Thrombozyten und Leukozyten im Verlauf von Zeitpunkt zu Zeitpunkt signifikant geringer wurde (Tab. 48).

So stieg die Zahl der roten Blutkörperchen stetig signifikant von der 3. LW bis zur 21. LW an. Der Hämoglobingehalt und der Hämatokrit unterlagen ebenfalls einem signifikanten Anstieg, jedoch erst ab der sechsten Lebenswoche. Die hämatologischen Indizes (MCV, MCH) fielen zwischen den ersten drei Zeitpunkten signifikant ab, um anschließend in der 21. Lebenswoche wieder anzusteigen. Die Zahl der Plättchen und weißen Blutkörperchen fiel zwischen dem ersten und vierten Blutentnahmezeitpunkt signifikant ab (Tab. 48).

4.1.5.2. Ergebnisse des Differentialblutbildes unter Berücksichtigung des Alters der Welpen

Im Differentialblutbild sank im Verlauf die absolute und relative Lymphozytenzahl, während die relativen Gehalte der neutrophilen Granulozyten zunahmen (Tab. 49).

In der dritten Lebenswoche war der Anteil der Lymphozyten fast doppelt so hoch wie jener der neutrophilen Granulozyten. Bis zur sechsten Lebenswoche hatten sich die Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten durch Absinken der Lymphozyten und einem simultanen Anstieg der Neutrophilen so weit angenähert, dass das Verhältnis bei nahezu 1:1 lag. Ab der dreizehnten Lebenswoche war der Anteil der Lymphozyten im peripheren Blut geringfügig unter den der neutrophilen Granulozyten gesunken (Tab. 49).

Tab. 48: Die Veränderung der hämatologischen Parameter in Abhängigkeit des Alters der Welpen (n = 16)

Alter in Wochen	RBC [$10^{12}/l$]		HGB [g/dl]		HKT [%]		MCV [fl]		MCH [pg]		MCHC [g/dl]		PLT [$10^9/l$]		WBC [$10^9/l$]	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
3	4,01 ^a	0,14	9,27 ^a	0,41	29,5 ^a	1,43	73,5 ^a	1,32	23,1 ^a	0,72	31,4 ^a	0,74	354 ^a	54,1	13,6 ^a	1,15
6	4,48 ^b	0,16	9,79 ^a	0,41	30,0 ^a	1,29	67,0 ^b	2,46	21,9 ^b	0,62	32,6	1,29	299	110	13,6 ^a	1,42
13	5,91 ^c	0,36	12,1 ^b	0,98	36,1 ^b	2,97	61,2 ^c	3,31	20,5 ^c	1,00	33,6 ^b	0,75	341 ^a	68,5	13,0 ^a	2,12
21	6,35 ^d	0,32	14,0 ^c	0,80	42,0 ^c	2,04	66,2 ^b	2,33	22,1 ^{ab}	0,78	33,4 ^b	1,32	278 ^b	51,0	10,7 ^b	1,60

Die MW in einer Spalte mit verschiedenen Superskripten (^{a,b,c,d}) unterscheiden sich signifikant voneinander ($p < 0,05$)

Tab. 49: Die Veränderung des Differentialblutbildes in Abhängigkeit des Alters der Welpen (n = 16)

Alter in Wochen	Lymphozyten				Neutrophile				Monozyten				Basophile				Eosinophile			
	$10^9/l$		%		$10^9/l$		%		$10^9/l$		%		$10^9/l$		%		$10^9/l$		%	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
3	8,17 ^a	1,25	59,8 ^a	4,03	4,62	0,29	34,1 ^a	3,40	0,58	0,42	4,30	3,07	0,20 ^a	0,01	0,13 ^a	0,07	0,21	0,07	1,59	0,54
6	6,41 ^b	0,84	47,5 ^b	6,06	5,90	1,21	43,2	5,49	1,01	0,53	7,53	3,92	0,04 ^b	0,01	0,31 ^b	0,15	0,20	0,10	1,46	0,63
13	5,41 ^c	1,40	41,6 ^c	9,65	6,28	1,60	48,1 ^b	10,0	0,95	0,61	7,58	4,22	0,04 ^b	0,01	0,28 ^b	0,08	0,32	0,31	2,42	2,01
21	4,68 ^c	0,71	44,1 ^{bc}	6,43	5,10	1,33	47,1 ^b	6,97	0,68	0,31	6,38	2,59	0,03 ^b	0,01	0,27 ^b	0,09	0,23	0,09	2,23	0,89

Die MW in einer Spalte mit verschiedenen Superskripten (^{a,b,c}) unterscheiden sich signifikant voneinander ($p < 0,05$)

4.2. Durchflusszytometrische Untersuchungen

4.2.1. Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung in Abhängigkeit der Fütterung

Zu statistisch signifikanten Veränderungen in den Lymphozytenpopulationen kam es während des Versuchs zwischen den beiden Fütterungsgruppen nicht (Tab. 50 - 53).

4.2.2. Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung in Abhängigkeit der Wurfzugehörigkeit

Es ließen sich jedoch einige Unterschiede zwischen den beiden Würfen feststellen. So waren in der sechsten und dreizehnten Lebenswoche die CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozytenpopulationen im zweiten Wurf signifikant höher als im ersten Wurf, einhergehend mit einer signifikant höheren CD4⁺/CD8⁺-Ratio für den ersten Wurf. In der 21. Lebenswoche war der Anteil der CD4⁺-T-Lymphozytenpopulation im zweiten Wurf nach wie vor unverändert höher als beim ersten Wurf. Die CD8⁺-T-Zellen des ersten Wurfes stiegen in der 21. Lebenswoche deutlich an und lagen diesmal signifikant höher als die Zahl der CD8-T-Zellpopulation des zweiten Wurfes, einhergehend mit einem erhöhten CD4⁺/CD8⁺-Verhältnis für den zweiten Wurf. Außerdem konnte zum dritten Zeitpunkt eine höhere CD4⁺/Foxp3⁺-Population bei den Welpen aus Wurf 2 festgestellt werden.

Die Anzahl der CD3⁺-T-Lymphozyten für den zweiten Wurf in der 21. Lebenswoche stehen leider nicht zur Verfügung, da bei der Bearbeitung der Proben des zweiten Wurfes der sonst verwendete sekundäre Antikörper für die Antigenmarkierung nicht zur Verfügung stand und der Ersatzantikörper (IgG1-PE) keine Reaktion mit dem verwendeten Primärantikörper einging. Aus diesem Grund konnte diese Subpopulation auch nicht auf den Wurfefekt getestet werden.

4.2.3. Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung unter Berücksichtigung des Alters der Welpen

Die CD3⁺-Lymphozyten, CD4⁺- und CD5⁺/MHCII⁺-Lymphozyten stiegen besonders zwischen der dritten und sechsten Lebenswoche an und verharrten bis zur 21. Lebenswoche auf diesem Niveau, während die Zahl der CD21⁺-Lymphozyten zwischen der dritten und 21. Lebenswoche kontinuierlich abnahm (Tab. 54).

Zwischen der dritten und sechsten Lebenswoche stieg der Anteil CD4⁺/Foxp3⁺-positiver Lymphozyten von $2,16 \pm 0,53$ auf $2,83 \pm 0,65$ % an, jedoch nicht signifikant ($p < 0,1$). Im Anschluss erfolgte ein Absinken auf durchschnittlich 2,38 % in der 13. LW bis auf 2,06 % in der 21. LW (Tab. 54).

Tab. 50: Prozentuale Anteile an CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-, CD21⁺-, CD5⁺/MHCII⁺, CD4⁺/Foxp3⁺-Lymphozyten und die CD4⁺/CD8⁺-Ratio im peripheren Blut der Welpen der Gruppen 1 und 2 zum Zeitpunkt 1

	Gruppe 1 (n=3)		Gruppe 2 (n=4)		p-Werte
	MW ¹	SD ²	MW	SD	
CD3 ⁺	89,9	7,54	89,6	5,62	0,961
CD4 ⁺	43,6	14,2	34,8	12,0	0,464
CD8 ⁺	16,0	10,3	13,2	4,66	0,644
CD21 ⁺	55,5	2,57	52,6	9,09	0,702
CD5 ⁺ /MHCII ⁺	36,4	4,83	36,9	7,13	1,000
CD4 ⁺ /Foxp3 ⁺	2,05	0,23	2,25	0,71	0,666
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	3,08	1,10	2,67	0,35	0,495

¹MW: Mittelwert, ²SD: Standardabweichung

Tab. 51: Prozentuale Anteile an CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-, CD21⁺-, CD5⁺/MHCII⁺, CD4⁺/Foxp3⁺-Lymphozyten und die CD4⁺/CD8⁺-Ratio im peripheren Blut der Welpen der Gruppen 1 und 2 und Würfe 1 und 2 zum Zeitpunkt 2 (n = 8)

	Gruppe 1 ¹		Gruppe 2 ²		Wurf 1 ³		Wurf 2 ⁴		Gruppe	p-Werte	
	MW ⁵	SD ⁶	MW	SD	MW	SD	MW	SD		Wurf	Gruppe*Wurf
CD3 ⁺	97,2	1,30	97,7	1,22	98,2	1,46	96,9	0,85	0,273	0,062	0,420
CD4 ⁺	63,3	16,8	63,2	17,1	44,0 ^a	3,08	75,3 ^b	3,65	0,124	< 0,001	0,769
CD8 ⁺	24,8	15,3	33,0	18,6	11,0 ^a	1,97	41,3 ^b	7,75	0,441	< 0,001	0,483
CD21 ⁺	36,5	3,22	37,8	8,16	37,6	2,64	36,8	7,28	0,617	0,748	0,546
CD5 ⁺ /MHCII ⁺	58,2	5,13	58,0	5,19	58,0	3,34	58,1	5,95	0,864	0,947	0,399
CD4 ⁺ /Foxp3 ⁺	2,82	0,87	2,83	0,34	2,49	0,45	3,12	0,68	0,973	0,068	0,086
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	3,11	1,54	2,41	1,10	4,27 ^a	0,94	1,87 ^b	0,27	0,145	< 0,001	0,450

¹Gruppe. 1: Einzelprotein, ²Gruppe 2: Mischprotein, ³Wurf 1: Nannis Welpen, ⁴Wurf 2: Cassys Welpen, ⁵MW: Mittelwert, ⁶SD: Standardabweichung

Die MW in einer Zeile mit verschiedenen Superskripten (^a, ^b) unterscheiden sich signifikant voneinander (p < 0,05)

Tab. 52: Prozentuale Anteile an CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-, CD21⁺-, CD5⁺/MHCII⁺, CD4⁺/Foxp3⁺-Lymphozyten und die CD4⁺/CD8⁺-Ratio im peripheren Blut der Welpen aus den Würfen 1 und 2 zum Zeitpunkt 3 (n = 8)

	Gruppe 1 ¹		Gruppe 2 ²		Wurf 1 ³		Wurf 2 ⁴		Gruppe	p-Werte	
	MW ⁵	SD ⁶	MW	SD	MW	SD	MW	SD		Wurf	Gruppe*Wurf
CD3 ⁺	96,6	1,91	97,1	1,58	98,3 ^a	0,95	95,4 ^b	0,88	0,358	< 0,001	0,398
CD4 ⁺	54,1	14,1	55,7	15,0	44,2 ^a	12,4	65,7 ^b	2,30	0,741	0,001	0,872
CD8 ⁺	24,2	12,3	23,8	11,5	13,4 ^a	2,99	34,6 ^b	4,17	0,843	< 0,001	0,927
CD21 ⁺	36,1	8,24	37,9	6,22	36,4	8,59	37,7	5,81	0,648	0,734	0,521
CD5 ⁺ /MHCII ⁺	60,1	6,77	60,8	5,17	59,4	6,80	61,6	4,88	0,830	0,486	0,363
CD4 ⁺ /Foxp3 ⁺	2,24	0,85	2,53	0,68	1,79 ^a	0,46	2,98 ^b	0,45	0,246	< 0,001	0,933
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	2,75	1,45	2,70	1,11	3,52 ^a	1,35	1,92 ^b	0,21	0,920	0,010	0,809

¹Gruppe. 1: Einzelprotein, ²Gruppe 2: Mischprotein, ³Wurf 1: Nannis Welpen, ⁴Wurf 2: Cassys Welpen, ⁵MW: Mittelwert, ⁶SD: Standardabweichung

Die MW in einer Zeile mit verschiedenen Superskripten (^a, ^b) unterscheiden sich signifikant voneinander (p < 0,05)

Tab. 53: Prozentuale Anteile an CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-, CD21⁺-, CD5⁺/MHCII⁺, CD4⁺/Foxp3⁺-Lymphozyten und die CD4⁺/CD8⁺-Ratio im peripheren Blut der Welpen aus den Würfen 1 und 2 zum Zeitpunkt 4 (n = 8)

	Gruppe 1 ¹		Gruppe 2 ²		Wurf 1 ³		Wurf 2 ⁴		Gruppe	p-Werte	
	MW ⁵	SD ⁶	MW	SD	MW	SD	MW	SD		Wurf	Gruppe*Wurf
CD3 ⁺	96,7	0,96	96,7	1,39	96,7	1,12	n.d.		0,984		
CD4 ⁺	53,0	10,3	47,7	7,21	44,2 ^a	4,00	56,5 ^b	8,51	0,081	0,001	0,067
CD8 ⁺	23,0	10,2	20,4	9,10	30,1 ^a	4,65	13,2 ^b	2,30	0,167	< 0,001	0,456
CD21 ⁺	33,7	6,01	36,3	4,37	34,5	4,70	35,6	6,03	0,367	0,692	0,746
CD5 ⁺ /MHCII ⁺	63,5	5,51	57,2	13,4	57,7	3,84	63,0	14,2	0,250	0,339	0,668
CD4 ⁺ /Foxp3 ⁺	2,12	0,46	2,01	0,27	1,93	0,28	2,20	0,41	0,553	0,158	0,553
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	3,01	1,87	2,89	1,60	1,51 ^a	0,33	4,39 ^b	1,11	0,786	< 0,001	0,431

¹Gruppe. 1: Mischprotein, ²Gruppe 2: Einzelprotein, ³Wurf 1: Nannis Welpen, ⁴Wurf 2: Cassys Welpen, ⁵MW: Mittelwert, ⁶SD: Standardabweichung, n.d.: nicht determiniert

Die MW in einer Zeile mit verschiedenen Superskripten (^a, ^b) unterscheiden sich signifikant voneinander (p < 0,05)

Tab. 54: Die Veränderung der Lymphozytensubpopulationen (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺, CD5⁺/MHCII⁺, CD4⁺/Foxp3⁺) und der CD4⁺/CD8⁺-Ratio im peripheren Blut unter Berücksichtigung des Alters der Welpen von der 3. bis zur 21. Lebenswoche (n = 16)

Alter in Wochen	CD3 ⁺		CD4 ⁺		CD8 ⁺		CD21 ⁺		CD5 ⁺ /MHCII ⁺		CD4 ⁺ /Foxp3 ⁺		CD4 ⁺ /CD8 ⁺	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
3	89,7 ^a	5,51	37,8 ^{ac}	12,1	14,1	6,04	53,6 ^a	7,29	36,7 ^a	5,94	2,16 ^α	0,53	2,80	0,60
6	97,4 ^b	1,24	63,3 ^b	16,2	28,3	16,6	37,1 ^b	5,78	58,1 ^b	4,94	2,83 ^{αβ}	0,65	2,79	1,35
13	96,9 ^b	1,71	54,9 ^{bc}	14,0	24,0	11,5	37,0 ^b	7,12	60,5 ^b	5,83	2,38	0,76	2,72	1,25
21	96,7 ^b	1,12	50,4 ^c	9,02	21,7	9,45	35,0 ^b	5,26	60,3 ^b	10,4	2,06 ^b	0,37	2,95	1,68

Die MW in einer Spalte mit verschiedenen Superskripten (^{a,b,c}) unterscheiden sich signifikant voneinander (p<0,05)

Die MW in einer Spalte mit verschiedenen Superskripten (^{αβ}) zeigen eine Tendenz an (p < 0,1)

4.3. Ergebnisse des mitogeninduzierten Lymphozytenproliferationstests

4.3.1. Ergebnisse des Lymphozytenproliferationstests in Abhängigkeit der Fütterung

Statistisch signifikante Veränderungen konnten zu keinem Zeitpunkt zwischen den beiden Versuchsgruppen nachgewiesen werden (Tab. 55 - 58).

4.3.2. Ergebnisse des Lymphozytenproliferationstests in Abhängigkeit der Wurfzugehörigkeit

Die Ergebnisse der zweiten Blutentnahme lassen Wurfunterschiede erkennen. Der Stimulationsindex von Con A im zweiten Wurf war signifikant höher als jener im ersten Wurf. Ebenso waren die Stimulationsindizes für PHA und PWM im zweiten Wurf erhöht, allerdings nicht signifikant ($p < 0,1$) (Tab. 56 - 58).

4.3.3. Ergebnisse des Lymphozytenproliferationstest unter Berücksichtigung des Alters der Welpen

Die Welpen wiesen im Alter von drei Wochen eine geringe Proliferationsfähigkeit der Lymphozyten auf. Diese Aktivität stieg signifikant zwischen der dritten und sechsten Lebenswoche an und fiel anschließend bis zur 13. Lebenswoche wieder signifikant ab, um in der 21. Lebenswoche unter dem Einfluss der Mitogene Con A und PHA ihr Maximum zu erreichen (Tab. 59).

Tab. 55: Ergebnisse nach Stimulation der Lymphozyten mit den Mitogenen Pokeweed Mitogen (PWM), Concanavalin A (Con A) und Phythämagglutinin (PHA) (Stimulationsindex), Zeitpunkt 1

	Gruppe 1 (n=3)		Gruppe 2 (n=4)		<i>p</i> -Werte
	MW ¹	SD ²	MW	SD	
PWM	16,8	0,56	24,7	11,2	0,396
Con A	16,9	6,40	27,6	10,7	0,276
PHA	17,7	5,95	28,0	12,9	0,362

¹MW: Mittelwert, ²SD: Standardabweichung

Tab. 56: Ergebnisse nach Stimulation der Lymphozyten mit den Mitogenen Pokeweed Mitogen (PWM), Concanavalin A (Con A) und Phythämagglutinin (PHA) (Stimulationsindex), Zeitpunkt 2 (n = 8)

	Gruppe 1 ¹		Gruppe 2 ²		Wurf 1 ³		Wurf 2 ⁴		<i>p</i> -Werte		
	MW ⁵	SD ⁶	MW	SD	MW	SD	MW	SD	Gruppe	Wurf	Gruppe*Wurf
PWM	136,6	64,1	132,9	115,0	81,4	25,6	175	93,7	0,673	0,055	0,957
Con A	150,4	72,6	139,9	121,4	94,3 ^a	19,0	196 ^b	117	0,820	0,044	0,818
PHA	149,2	73,2	135,6	93,1	99,9	20,0	180	95,3	0,662	0,066	0,568

¹Gruppe. 1: Einzelprotein, ²Gruppe 2: Mischprotein, ³Wurf 1: Nannis Welpen, ⁴Wurf 2: Cassys Welpen, ⁵MW: Mittelwert, ⁶SD: Standardabweichung

Die MW in einer Zeile mit verschiedenen Superskripten (^a, ^b) unterscheiden sich signifikant voneinander ($p < 0,05$)

Tab. 57: Ergebnisse nach Stimulation der Lymphozyten mit den Mitogenen Pokeweed Mitogen (PWM), Concanavalin A (Con A) und Phytohämagglutinin (PHA) (Stimulationsindex), Zeitpunkt 3 (n = 8)

	Gruppe 1 ¹		Gruppe 2 ²		Wurf 1 ³		Wurf 2 ⁴		p-Werte		
	MW ⁵	SD ⁶	MW	SD	MW	SD	MW	SD	Gruppe	Wurf	Gruppe*Wurf
PWM	51,8	30,3	37,2	16,6	51,8	30,4	37,3	16,4	0,262	0,263	0,639
Con A	78,4	33,2	71,0	33,5	80,3	38,3	69,3	27,7	0,624	0,503	0,515
PHA	63,8	36,6	54,5	26,4	74,4	34,5	43,9	19,0	0,536	0,058	0,523

¹Gruppe. 1: Einzelprotein, ²Gruppe 2: Mischprotein, ³Wurf 1: Nannis Welpen, ⁴Wurf 2: Cassys Welpen, ⁵MW: Mittelwert, ⁶SD: Standardabweichung

Tab. 58: Ergebnisse nach Stimulation der Blutlymphozyten der Welpen der beiden Gruppen und Würfe mit den Mitogenen Pokeweed Mitogen (PWM), Concanavalin A (Con A) und Phytohämagglutinin (PHA) (Stimulationsindex) zum Zeitpunkt 4 (n = 8)

	Gruppe 1 ¹		Gruppe 2 ²		Wurf 1 ³		Wurf 2 ⁴		p-Werte		
	MW ⁵	SD ⁶	MW	SD	MW	SD	MW	SD	Gruppe	Wurf	Gruppe*Wurf
PWM	85,6	16,7	92,0	44,3	80,9	18,7	96,8	42,0	0,720	0,379	0,711
Con A	187	41,3	200	77,4	207	19,4	180	83,8	0,690	0,426	0,526
PHA	149	40,7	169	82,9	169	28,2	148	87,9	0,564	0,552	0,532

¹Gruppe. 1: Mischprotein, ²Gruppe 2: Einzelprotein, ³Wurf 1: Nannis Welpen, ⁴Wurf 2: Cassys Welpen, ⁵MW: Mittelwert, ⁶SD: Standardabweichung

Tab. 59: Die Veränderung der Lymphozytenproliferationsfähigkeit (Stimulationsindex) gegenüber den Mitogenen Pokeweed Mitogen (PWM), Concanavalin A (Con A) und Phytohämagglutinin (PHA) im peripheren Blut unter Berücksichtigung des Alters der Welpen von der 3. bis zur 21. Lebenswoche (n = 16)

Alter in Wochen	PWM		Con A		PHA	
	MW ¹	SD ²	MW	SD	MW	SD
3	22,1 ^a	9,57	24,0 ^a	10,4	24,6 ^a	11,7
6	135 ^b	85,4	145 ^b	96,8	143 ^b	80,2
13	44,5 ^a	24,8	74,5 ^c	32,3	59,2 ^a	31,2
21	88,8	32,5	193 ^d	60,3	159 ^b	64,0

¹MW: Mittelwert, ²SD: Standardabweichung

Die MW in einer Spalte mit verschiedenen Superskripten (^{a,b,c,d}) unterscheiden sich signifikant voneinander ($p < 0,05$)

4.4. Ergebnisse des futtermittelantigeninduzierten Lymphozytenproliferationstests

Der futtermittelantigeninduzierte Lymphozytenproliferationstest ließ keine Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen in der Stimulierbarkeit der Lymphozyten gegenüber den eingesetzten Futtermittelantigenen erkennen (Tab. 60a und b).

Stellt man jedoch Vergleiche bzgl. der Stimulierbarkeit der Lymphozyten vor und nach dem Cross-over an, so sind teilweise signifikante Unterschiede nachweisbar (Tab. 60a und b). Die Lymphozyten waren bei den Hunden beider Fütterungsgruppen vor allem für die getesteten Futtermittelantigene Fischprotein, Hühnerprotein und Sojaprotein vor dem Cross-over signifikant weniger stimulierbar als nach dem Cross-over. Des Weiteren nahm die Proliferationsfähigkeit der Zellen mit zunehmender Antigenkonzentration ab.

Tab. 60a: Vergleich der Stimulierbarkeit der Blutlymphozyten (Stimulationsindex) der Welpen der Gruppen 1 und 2 mit Proteinextrakten (Hüttenkäse, Fisch-, Hühner-, Schweine- und Sojaprotein) der Futtermittel in verschiedenen Konzentrationen (30, 75, 125, 250 und 500 µg/ml) vor und nach dem Cross-over (CO)

		Gruppe 1		Gruppe 2		p-Werte
		MW ¹	SD ²	MW	SD	
Hüttenkäse 125	vor CO	0,81	0,44	0,63	0,30	0,773
	nach CO	1,31	0,46	1,04	0,36	0,248
	p-Werte	0,062		0,062		
Hüttenkäse 250	vor CO	0,70	0,40	0,47 ^a	0,31	0,386
	nach CO	1,09	0,41	1,03 ^b	0,44	0,834
	p-Werte	0,174		0,042		
Hüttenkäse 500	vor CO	0,35	0,13	0,24	0,92	0,965
	nach CO	0,83	0,40	0,74	0,33	0,963
	p-Werte	0,131		0,098		
Fischprotein 30	vor CO	0,14 ^a	0,07	0,11 ^a	0,04	0,991
	nach CO	0,77 ^b	0,26	0,71 ^b	0,07	0,942
	p-Werte	< 0,001		0,001		
Fischprotein 75	vor CO	0,03 ^a	0,01	0,03 ^a	0,01	0,564
	nach CO	1,44 ^b	0,44	1,38 ^b	0,26	0,773
	p-Werte	0,021		0,021		
Hühnerprotein 30	vor CO	0,18 ^a	0,11	0,10 ^a	0,06	0,962
	nach CO	0,80 ^b	0,29	0,81 ^b	0,23	1,000
	p-Werte	0,006		0,002		

¹MW: Mittelwert, ²SD: Standardabweichung

Die MW in einer Spalte mit verschiedenen Superskripten (^{a,b}) unterscheiden sich signifikant voneinander (p < 0,05)

Tab. 60b: Vergleich der Stimulierbarkeit der Blutlymphozyten (Stimulationsindex) der Welpen der Gruppen 1 und 2 mit Proteinextrakten (Hüttenkäse, Fisch-, Hühner-, Schweine- und Sojaprotein) der Futtermittel in verschiedenen Konzentrationen (30, 75, 125, 250 und 500 µg/ml) vor und nach dem Cross-over (CO)

		Gruppe 1		Gruppe 2		p-Werte
		MW ¹	SD ²	MW	SD	
Hühnerprotein 75	vor CO	0,04 ^a	0,02	0,03 ^a	0,00	1,000
	nach CO	1,03 ^b	0,27	0,92 ^b	0,85	0,910
	p-Werte	< 0,001		0,001		
Hühnerprotein 125	vor CO	0,03 ^a	0,01	0,02	0,01	0,149
	nach CO	0,59 ^b	0,37	0,55	0,52	0,599
	p-Werte	0,007		0,173		
Schweineprotein 125	vor CO	0,80	0,21	0,91	0,33	0,992
	nach CO	1,09	0,64	1,22	0,44	0,961
	p-Werte	0,814		0,774		
Schweineprotein 250	vor CO	0,65	0,29	0,66	0,19	1,000
	nach CO	0,88	0,44	1,09	0,38	0,734
	p-Werte	0,781		0,328		
Schweineprotein 500	vor CO	0,40	0,20	0,52	0,43	0,962
	nach CO	0,96	0,31	0,91	0,31	0,995
	p-Werte	0,070		0,279		
Sojaprotein 125	vor CO	0,30	0,12	0,32 ^a	0,13	1,000
	nach CO	0,66	0,28	0,84 ^b	0,31	0,615
	p-Werte	0,190		0,031		
Sojaprotein 250	vor CO	0,11 ^a	0,03	0,10 ^a	0,04	1,000
	nach CO	0,63 ^b	0,33	0,61 ^b	0,30	0,999
	p-Werte	0,038		0,042		
Sojaprotein 500	vor CO	0,07	0,04	0,05	0,02	1,000
	nach CO	0,68	0,69	0,55	0,47	0,962
	p-Werte	0,290		0,451		

¹MW: Mittelwert, ²SD: Standardabweichung

Die MW in einer Spalte mit verschiedenen Superskripten (^{a,b}) unterscheiden sich signifikant voneinander (p < 0,05)

4.5. Ergebnisse der Kotbeurteilung

Vor dem Cross-over wies die Mischproteingruppe eine signifikant festere Kotkonsistenz auf als die Einzelproteingruppe. Vergleicht man die Konsistenzen innerhalb einer Gruppe vor und nach dem Cross-over miteinander, lassen sich auch hier insbesondere für die Gruppe 1 signifikante Differenzen erkennen. So haben beide Gruppen jeweils nach dem Cross-over insgesamt eine festere Kotkonsistenz als vor dem Cross-over (Tab. 61).

Überprüft man die prozentuale Verteilung der Bewertungsgrade sowohl in den beiden Fütterungsphasen als auch zwischen den Versuchsgruppen, so lagen vor dem Cross-over in beiden Gruppen über 80 % aller beurteilten Fäzes im Bewertungsgrad zwischen 2 und 3 und wiesen eine unauffällige Konsistenz auf. Nach dem Cross-over lag der Anteil der unauffälligen Kotkonsistenzen bei über 95 % (Tab. 62). Ähnliches trifft auf die prozentuale Verteilung der Bewertungsgrade zwischen den beiden Würfeln zu (Tab. 63).

Tab. 61: Übersicht über die mittlere Kotkonsistenz der beiden Fütterungsgruppen bzw. der beiden Würfe jeweils vor und nach dem Cross-over (CO) (n = 8)

	Gruppe 1		Gruppe 2		<i>p</i> -Werte Gruppe	Wurf 1		Wurf 2		<i>p</i> -Werte Wurf	<i>p</i> -Werte Gruppe*Wurf
	MW ¹	SD ²	MW	SD		MW	SD	MW	SD		
vor CO	2,55 ^{a,α}	0,97	2,29 ^β	0,65	0,004	2,37 ^a	0,82	2,47 ^a	0,83	0,628	
nach CO	2,15 ^b	0,41	2,13	0,46	0,995	2,13 ^b	0,40	2,16 ^b	0,46	0,986	0,520
<i>p</i> -Werte	< 0,001		0,167			0,008		< 0,001			

¹MW: Mittelwert, ²SD: Standardabweichung

Die MW in einer Spalte mit verschiedenen Superskripten (^{a, b}) unterscheiden sich signifikant voneinander ($p < 0,05$)

Die MW in einer Zeile mit verschiedenen Superskripten (^{α,β}) unterscheiden sich signifikant voneinander ($p < 0,05$)

Tab. 62: Übersicht über die prozentuale Verteilung der Fäzeskonsistenz (Grad 1 - 5)¹ der Welpen der Gruppen 1 und 2 vor und nach dem Cross-over

		Fäzeskonsistenz (Grad)				
		1	2	3	4	5
		vor Cross-over				
Gruppe 1 (n = 167)	%	0,00	70,7	12,0	8,98	8,38
Gruppe 2 (n = 181)	%	0,00	79,6	13,3	5,52	1,66
		nach Cross-over				
Gruppe 1 (n = 163)	%	0,00	86,5	11,7	1,84	0,00
Gruppe 2 (n = 171)	%	0,00	90,1	7,60	1,17	1,17

¹Grad 1 = trocken, krümelig; Grad 2 = fest geformt; Grad 3= weich, noch geformt; Grad 4 = breiig;
Grad 5 = flüssig, wässrig

Tab. 63: Übersicht über die prozentuale Verteilung der Fäzeskonsistenz (Grad 1 - 5)¹ der Welpen der Würfe 1 und 2 vor und nach dem Cross-over

		Fäzeskonsistenz (Grad)				
		1	2	3	4	5
		vor Cross-over				
Wurf 1 (n = 185)	%	0,00	78,9	10,3	5,41	5,41
Wurf 2 (n = 163)	%	0,00	71,2	15,3	9,20	4,29
		nach Cross-over				
Wurf 1 (n = 162)	%	0,00	89,5	8,02	2,47	0,00
Wurf 2 (n = 172)	%	0,00	87,2	11,0	0,58	1,16

¹Grad 1 = trocken, krümelig; Grad 2 = fest geformt; Grad 3= weich, noch geformt; Grad 4 = breiig;
Grad 5 = flüssig, wässrig

4.7. Verdaulichkeitsversuch

4.7.1. Ergebnisse des Verdaulichkeitsversuchs in Abhängigkeit der Fütterung

In der vorliegenden Studie ließ sich kein Unterschied der scheinbaren Verdaulichkeit der unterschiedlichen Rohnährstoffe zwischen den beiden Fütterungsgruppen feststellen. Innerhalb der beiden Gruppen gab es jedoch jeweils nach dem Futterwechsel einen signifikanten Unterschied in der scheinbaren Rohasche-, Kalzium- und Phosphorverdaulichkeit gegenüber den Werten vor dem Cross-over (CO) (Tab. 64 a und b). Die Rohasche-, Kalzium- und Phosphorverdaulichkeit war für beide Gruppen jeweils nach dem CO deutlich niedriger als vor dem CO.

4.7.2. Ergebnisse des Verdaulichkeitsversuchs in Abhängigkeit der Wurfzugehörigkeit

Die Rohfettverdaulichkeit lag bei Wurf 2 nach dem CO signifikant niedriger als bei Wurf 1. Die Rohascheverdaulichkeit war vor dem CO bei Wurf 1 signifikant höher als bei Wurf 2, während nach dem CO der zweite Wurf eine signifikant erhöhte Verdaulichkeit der Rohasche aufwies. Die Kalzium- und Phosphorverdaulichkeit war bei Wurf 1 vor dem CO signifikant höher als bei Wurf 2.

Tab. 64a: Scheinbare Verdaulichkeit (%) von Rohprotein, Rohfett, Rohfaser und Rohasche in den beiden Fütterungsgruppen bzw. der beiden Würfe jeweils vor und nach dem Cross-over (CO) (n = 8)

		Gruppe 1		Gruppe 2		<i>p</i> -Werte Gruppe	Wurf 1 ³		Wurf 2 ⁴		Wurf	<i>p</i> -Werte Gruppe x Wurf
		MW ¹	SD ²	MW	SD		MW	SD	MW	SD		
Rohprotein	vor CO	80,5	5,71	78,2	2,14	0,237	82,4	3,85	76,4	2,19	< 0,001	0,016
	nach CO	80,2	2,27	81,0	1,92	0,913	81,6	1,09	79,7	2,45	0,418	
	<i>p</i> -Werte	0,995		0,111			0,913		0,047			
Rohfett	vor CO	97,6	0,80	98,4	0,39	0,155	98,1	0,91	97,8 ^a	0,50	0,830	0,505
	nach CO	97,5	0,97	97,5	1,24	1,000	98,3 ^a	0,39	96,6 ^{b,β}	0,80	< 0,001	
	<i>p</i> -Werte	0,992		0,089			0,936		0,011			
Rohfaser	vor CO	26,1	8,76	20,0	7,67	0,710	23,6	6,72	22,9	10,9	0,999	0,835
	nach CO	25,4	8,28	35,2	11,6	0,378	33,7	12,7	28,9	10,1	0,851	
	<i>p</i> -Werte	0,999		0,061			0,344		0,715			
Rohasche	vor CO	51,4 ^a	6,13	46,5 ^a	3,82	0,091	52,5 ^{a,α}	5,02	45,4 ^β	3,39	0,007	0,170
	nach CO	37,0 ^b	6,42	40,3 ^b	3,00	0,369	35,7 ^{b,α}	5,12	41,6 ^β	3,25	0,033	
	<i>p</i> -Werte	<0,001		0,024			<0,001		0,270			

¹MW: Mittelwert, ²SD: Standardabweichung, ³Wurf 1: Nannis Welpen, ⁴Wurf 2: Cassys Welpen, Gruppe 1: vor CO: EP, nach CO: MP, Gruppe 2: vor CO: MP, nach CO: EP

Die MW in einer Spalte mit verschiedenen Superskripten (^a, ^b) unterscheiden sich signifikant voneinander ($p < 0,05$)

Die MW in einer Zeile mit verschiedenen Superskripten (^{α,β}) unterscheiden sich signifikant voneinander ($p < 0,05$)

Tab. 64b: Scheinbare Verdaulichkeit (%) der Mineralstoffe Phosphor, Kalzium, Natrium und Kalium in den beiden Fütterungsgruppen bzw. der beiden Würfe jeweils vor und nach dem Cross-over (CO) (n = 8)

		Gruppe 1		Gruppe 2		<i>p</i> -Werte Gruppe	Wurf 1 ³		Wurf 2 ⁴		Wurf	<i>p</i> -Werte Gruppe x Wurf
		MW ¹	SD ²	MW	SD		MW	SD	MW	SD		
Kalzium	vor CO	61,9 ^{a,α}	6,71	55,7 ^{a,β}	5,25	0,049	63,0 ^{a,α}	5,81	54,6 ^{a,β}	4,60	0,005	0,079
	nach CO	40,8 ^b	5,39	42,1 ^b	3,77	0,938	40,3 ^b	5,02	42,6 ^b	3,99	0,738	
	<i>p</i> -Werte	<0,001		<0,001			< 0,001		< 0,001			
Phosphor	vor CO	66,4	6,25	62,8	5,81	0,682	69,0	5,15	60,1	2,98	0,049	0,032
	nach CO	51,2	9,83	51,7	6,30	0,998	50,0	9,56	53,0	6,33	0,797	
	<i>p</i> -Werte	<0,001		0,010			< 0,001		0,143			
Natrium	vor CO	91,5	3,04	91,1	3,32	0,995	93,3	1,97	89,2	2,63	0,112	0,799
	nach CO	90,0	4,00	89,3	3,40	0,978	90,8	2,24	88,4	4,43	0,539	
	<i>p</i> -Werte	0,827		0,738			0,488		0,970			
Kalium	vor CO	87,5	4,22	86,7	1,34	0,951	88,4	2,42	85,8	3,21	0,380	0,132
	nach CO	87,4	3,61	87,8	3,07	0,993	86,2	3,64	89,0	2,23	0,326	
	<i>p</i> -Werte	1,000		0,890			0,532		0,213			

¹MW: Mittelwert, ²SD: Standardabweichung, ³Wurf 1: Nannis Welpen, ⁴Wurf 2: Cassys Welpen, Gruppe 1: vor CO: EP, nach CO: MP, Gruppe 2: vor CO: MP, nach CO: EP

Die MW in einer Spalte mit verschiedenen Superskripten (^{a, b}) unterscheiden sich signifikant voneinander ($p < 0,05$)

Die MW in einer Zeile mit verschiedenen Superskripten (^{α, β}) unterscheiden sich signifikant voneinander ($p < 0,05$)

5. DISKUSSION

5.1. Versuchstiere

In Kooperation mit der Klinik für Fortpflanzung (Freie Universität Berlin) wurden zwei Beaglehündinnen für die vorliegende Untersuchung mit Sperma des gleichen Rüden künstlich besamt. Da eine Hündin nicht wie geplant in ihren Zyklus gekommen ist, wurde deren Läufigkeit mittels eines Prolaktinhemmers induziert (Galastop®, CEVA Tiergesundheit, Deutschland; Dosierung 5 µg/kg KM Cabergolin einmal täglich per os für 14 Tage). Beide Hündinnen brachten jeweils acht Welpen zur Welt, somit standen für die Studie sechzehn Beaglewelpen aus zwei Würfen zur Verfügung, wobei die Rüden deutlich in der Überzahl waren (zwölf Rüden, vier Hündinnen). Eine Beeinflussung des Immunsystems durch Geschlechtshormone ist bei den hier untersuchten Tieren weitgehend auszuschließen, da der Versuch vor Eintritt der Geschlechtsreife beendet wurde.

Ein signifikanter Wurfefekt ließ sich nahezu in allen Parametern nachweisen. Demzufolge wäre es für die vorliegende Fragestellung hilfreicher gewesen, wenn mehr als zwei Würfe verfügbar gewesen wären, um den Wurfefekt zu minimieren.

5.2. Futter

Die Welpen wurden mit einem im Institut für Tierernährung selbst hergestellten Futter ernährt. Dieses entsprach bezüglich der Gehalte an Nährstoffen, Mengen- und Spurenelementen als auch an Vitaminen weitgehend den Empfehlungen für die Ernährung im Wachstum befindlicher Hunde (Meyer und Zentek 2010). Die Analysenwerte entsprachen nicht vollständig der errechneten Zusammensetzung. Die Kalzium- und Proteingehalte waren niedriger als kalkuliert, da sowohl das eingesetzte Kalziumphosphat als auch die verwendeten Hühnerherzen weniger kalzium- bzw. proteinreich waren, als für die Berechnung vorausgesetzt wurde. Trotz dieser Abweichungen sind alle Nährstoffe bedarfsdeckend aufgenommen worden. Des Weiteren war der tatsächliche Rohfettgehalt der beiden Rationen mittels Petrolether-Extraktionsmethode nur schwer festzustellen, da sich zum Zeitpunkt der Analyse lagerungsbedingt schon erste Anzeichen des Fettverderbs zeigten (ranziger Geruch). Die erschwerte Extraktion verdorbenen Fettes ließ sich durch die von Luftsauerstoff und Wärme erfolgte Umwandlung der langkettigen lipophilen Fettsäuren im Futtermittel in kurzkettige und hydrophile Fettsäuren, wie Buttersäure, erklären, welche nicht mehr in lipophilem Petrolether in Lösung gehen.

5.3. Versuchsdesign

Bis zu einem Alter von sechs Wochen wurden die Welpen zusammen mit dem Muttertier gehalten und jeweils drei Mal täglich ab der dritten Lebenswoche mit dem jeweiligen Versuchsfutter kontrolliert beigefüttert. Ab der sechsten Lebenswoche wurden die Welpen entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit in separaten Ställen untergebracht, durchliefen nach der Hälfte der Versuchsdauer (13. Lebenswoche) einen Futterwechsel und erreichten das Ende des Versuchs in der 21. Lebenswoche. Die Art des Studiendesigns ermöglichte die Gegenüberstellung der Einzelproteinfütterung mit der Mischproteinfütterung zwischen den beiden Gruppen und die Evaluierung der Effekte innerhalb einer Gruppe nach dem Futterwechsel.

Die Studie musste mit Beginn der Beifütterung starten, um sicherzugehen, dass die Welpen neben der Muttermilch ausschließlich mit den Proteinquellen des Versuchsfutters in Kontakt kamen. Die Welpen wurden ab der sechsten Lebenswoche von der Mutter abgesetzt, hierbei traten keinerlei Probleme auf, weder vonseiten der Mutterhündinnen noch bei den Welpen.

Ursprünglich war vorgesehen, den Futterwechsel im Alter von elf Wochen durchzuführen, doch leider hatte der erste Wurf in diesem Zeitraum wässrig-blutigen Durchfall entwickelt, der sich zunächst auf eine Fütterungsgruppe bezog, doch innerhalb kürzester Zeit beide Versuchsgruppen in Mitleidenschaft zog, weswegen der erste Versuchsabschnitt bis zur 13. Lebenswoche verlängert werden musste. Eine Sammelkotprobe pro Fütterungsgruppe wurde zur parasitologischen Untersuchung (u.a. auf Giardien) an das Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der Freien Universität Berlin übergeben. Die Kotproben erbrachten jedoch keinen Hinweis auf eine parasitäre Ursache. Als Magen und Darm schonende Diät erhielten die Welpen während dieser Zeit entweder Hühnerbrust mit gekochtem Reis (Einzelproteingruppe) oder Hühnerbrust mit gekochtem Reis und Hüttenkäse (Mischproteingruppe), sodass der Versuch nicht gefährdet war.

5.4. Kritik der verwendeten Methoden

5.4.1. Immunologische Methoden

5.4.1.1. Durchflusszytometrische Untersuchung

Die Durchflusszytometrie stellt eine qualitative und quantitative Methode zur Identifizierung von Lymphozyten im peripheren Blut dar (Byrne et al., 2000). Die Blutproben wurden direkt nach der Entnahme weiter verarbeitet.

Regulatorische T-Zellen spielen bei der Toleranzentwicklung gegenüber Antigenen eine entscheidende Rolle. Bei Menschen (Arias et al., 2007), Katzen (Lankford et al., 2008) und Schweinen (Kaser et al., 2008) werden sie durch die Oberflächenantigene CD25⁺/CD4⁺/Foxp3⁺ gekennzeichnet. Für den Hund war zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Studie kein spezifischer CD25⁺-Antikörper auf dem Markt erhältlich, es wurde bis dahin nur vermutet, dass ein anti-human CD25⁺-spezifischer monoklonaler Antikörper (ACT-1) mit dem CD25⁺ Antigen von Hunden kreuzreagiert (Olivry et al., 2007; Masuda und Yasuda 2008). Ein Nachweis dieser Kreuzreaktivität blieb allerdings aus (Abrams et al., 2010). Daher wurden die T_{Reg} in dieser Studie nur anhand des intrazellulären CD4⁺Foxp3⁺-Antigens identifiziert, wie es zuvor auch schon bei Hunden durch einige Autoren praktiziert wurde (Biller et al., 2007; Horiuchi et al., 2009; O'Neill et al., 2009). Die Markierung des intrazellulären CD4⁺/Foxp3⁺-Antigens erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die Dauer von 18 h für den initialen Permeabilisierungsschritt wurde der Publikation von Biller et al. (2007) entnommen.

5.4.1.2. Mitogeninduzierter Lymphozytenproliferationstest

Die Stimulation der Lymphozyten mit Hilfe von Lektinen stellt eine gut etablierte Methode zur Einschätzung der Immunkompetenz des Wirtes dar (De Luna et al., 1999). Die Spezifität der verschiedenen Mitogene beim Hund wurde von Krakowka und Ringler (1986) untersucht. So stimuliert Con A ausschließlich canine T-Zellen, während PHA sowohl T-als auch B-Zellen stimuliert und PWM nur die B-Zellen aktiviert (Krakowka und Ringler (1986). Das Verfahren für die Proliferation von Hundelymphozyten ist im Institut für Tierernährung etabliert, weshalb in der Methodik keine Fehler zu erwarten gewesen sind.

5.4.1.3. Futtermittelantigeninduzierter Lymphozytenproliferationstest

5.4.1.3.1. Gewinnung des Proteinextraktes

Die Methode der Gewinnung eines Proteinextraktes aus Lebensmitteln wurde der Veröffentlichung von Han et al. (2000) entnommen. Nach der Durchführung der dort beschriebenen Methode befanden sich allerdings noch sehr viele Schwebepartikel im Überstand, weshalb noch einige Zentrifugations- und Filtrationsschritte zusätzlich durchgeführt werden mussten um die abschließende Sterilfiltration gewährleisten zu können. Ob diese zusätzlich durchgeführten Zentrifugations- und Filtrationsschritte die Qualität der gewonnenen Proteinextrakte nachteilig beeinflusste ist unklar.

5.4.1.3.2. Futtermittelantigeninduzierter Lymphozytenproliferationstest

Diese Methode findet vor allen Dingen in der Humanallergologie im Zusammenhang mit der Erforschung Nahrungsmittelantigen-induzierter Allergien bei Kindern mit der Fragestellung Anwendung, ob eine Allergie bei Kindern anhand der Stimulierbarkeit der Lymphozyten durch die Antigene nachweisbar und/oder sogar vorhersehbar ist (Kondo et al., 1992). Das Problem in der Durchführung dieses Verfahrens war die Tatsache, dass es kein standardisiertes Verfahren für Hunde gibt. In der Literatur gab es zahlreiche Abweichungen in den Angaben der verwendeten Zellkonzentration ($1,5 \times 10^5$ (Motrich et al., 2003); $2,0 \times 10^5$ (Kondo et al., 1992; Hoffman et al., 1997); $2,5 \times 10^5$ (Sopo et al., 1999; Ishida et al., 2004)), der Antigenkonzentration (0,25 - 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Kondo et al., 1992; Hoffman et al., 1997; Sopo et al., 1999; Motrich et al., 2003; Ishida et al., 2004)), der Art der verwendeten Stimuli (entweder selbst hergestellte Proteinextrakte (Hoffman et al., 1997) oder aufgereinigte Antigene (Kondo et al., 1992; Hoffman et al., 1997; Sopo et al., 1999; Motrich et al., 2003; Ishida et al., 2004)). Auch die Inkubationszeit variierte zwischen drei (Ishida et al., 2004), vier (Kondo et al., 1992), fünf (Hoffman et al., 1997; Motrich et al., 2003), sieben (Hoffman et al., 1997; Sopo et al., 1999) und neun Tagen (Hoffman et al., 1997).

Da avitale Zellen eine deutlich höhere Autofluoreszenz als vitale Zellen haben, war es im Scatter Dot Plot leider nicht mehr möglich den Anteil an Zellen die tatsächlich mit anti-BrdU-FITC angefärbt waren von denen zu separieren, die während der Durchführung des Proliferatonstests in Apoptose gegangen sind und nun eine erhöhte Autofluoreszenz aufwiesen. Um auszuschließen, dass eine erhöhte Autofluoreszenz apoptotischer Zellen die Ursache für das detektierte Fluoreszenzsignal war, wurde ein Kontrollversuch mit und ohne BrdU als indirekter Nachweis angesetzt und gegen anti-BrdU gefärbt. Unter dem Einfluss der höher konzentrierten Proteinextrakte stieg die Fluoreszenz auch bei den Ansätzen ohne BrdU an.

Da dem Anti-BrdU-Antikörper hierbei allerdings das Zielantigen (BrdU) fehlte, konnte die detektierte Fluoreszenz nicht als Hinweis auf proliferierende Zellen gewertet werden, sondern wurde als Artefakt avitaler Lymphozyten (eine erhöhte Autofluoreszenz oder unspezifische Bindung des anti-BrdU-Antikörpers) angesehen. Daher wurden die Ergebnisse der Futtermittelantigen-Lymphozytenproliferationstests unter dem Zusatz der Fisch- und Hühnerproteinextrakte in der Konzentration von 125 (nur Fischproteinextrakt) 250 und 500 µg/ml nicht mit in die Auswertung einbezogen und in nachfolgenden Versuchen ein Ansatz mit einer stärkeren Verdünnung dieser Proteinextrakte auf 30 und 75 µg/ml vorgenommen.

Die Durchführung einer direkten lebend/tot-Färbung mit Propidium-Jodid (PI) um den Anteil avitaler Zellen zu bestimmen war aufgrund des Versuchsaufbaus nicht möglich gewesen. Das Prinzip des direkten Nachweises beruht auf der Fähigkeit des Farbstoffs PI die perforierte Zellmembran von avitalen Zellen zu durchdringen, aber nicht die intakte Membran von vitalen Zellen. Sieht man im Scatter Bild eine Färbung ist PI in die DNA eingebaut und die Zelle gilt als „tot“. Dieser Nachweis wäre nur vor Zugabe des Permeabilisierungspuffers möglich gewesen, dies allerdings nur unter weiterem Verlust von wertvollem Zellmaterial, das es möglichst zu vermeiden galt. Dieser Test wurde nach Zugabe des Permeabilisierungspuffers für den Proliferationstest aufgrund dessen permeabilisierenden Eigenschaften nicht als sinnvoll erachtet.

5.4.2. Verdauungsphysiologische Methoden

5.4.2.1. Kotkonsistenz

Zur Reduzierung der subjektiven Einflüsse wurde die Beurteilung immer von derselben Person und auch stets zur gleichen Zeit nach einem festen Beurteilungsschema durchgeführt. Aufgrund von Koprophagie bei einigen Welpen ab einem Alter von ca. 3,5 Monaten konnten nicht alle abgesetzten Fäzes beurteilt werden.

5.4.2.2. Verdaulichkeitsversuch

Jeweils gegen Ende der beiden Fütterungsphasen wurde ein Verdaulichkeitsversuch durchgeführt. Hierzu wurden die Welpen zunächst drei Tage an ein mit 0,5 % Chromoxid versetztes Futter adaptiert. An Tag vier wurden die Welpen nach der morgendlichen Fütterung separiert, bis der Kotabsatz erfolgte, um eine individuelle Zuordnung der Fäzes gewährleisten zu können. Die Hunde hatten hierbei visuellen Kontakt zu mindestens einem Artgenossen in einem benachbarten Abteil. Erfolgte kein Kotabsatz innerhalb einer Stunde nach Fütterung, wurde der jeweilige Welpe nach der nachmittäglichen Fütterung nochmals separiert. Besonders zwei Welpen (Lennox und Ronja) reagierten auf die Trennung recht sensibel, welches sich mit dem Absetzen breiigen Kotes bemerkbar machte.

Da die komplette Ration aus ein bzw. zwei sehr feuchtigkeitshaltigen Komponenten bestand (Ration mit Hühnerherzen bzw. mit Hühnerherzen und Hüttenkäse) konnten die 0,5 % Chromoxid aus technischen Gründen nur in die trockene Komponente eingemischt und diese dann jeweils vor Verfütterung mit einem Pürierstab mit den restlichen Bestandteilen homogenisiert werden. Hieraus resultierte ein tatsächlicher Chromoxidanteil von 0,23 % (Diät A) und 0,25 % (Diät B) im verzehrfertigen Futter. Dieses wurde bei der Berechnung der scheinbaren Verdaulichkeit berücksichtigt.

5.5. Diskussion der Ergebnisse

5.5.1. Hämatologie

In der eigenen Untersuchung hatte die Fütterung von unterschiedlichen Proteinquellen keinen Einfluss auf die hämatologischen Parameter oder das Differentialblutbild. Eine Ausnahme stellt hierbei in der 21. Lebenswoche die Zahl der Thrombozyten dar, die für die Mischproteingruppe signifikant höher erschien als in der Einzelproteingruppe. Ein Einfluss der Proteinquellen auf diesen Parameter ist dennoch unwahrscheinlich, da an den übrigen Zeitpunkten kein Unterschied zwischen den Fütterungsgruppen feststellbar war. Vergleichbare Studien wurden bisher noch nicht veröffentlicht. In einer früheren Studie wurde jedoch der Einfluss unterschiedlicher Proteinquellen (tierisch vs. pflanzlich) auf die hämatologischen Parameter bei Hundewelpen untersucht und auch in dieser Arbeit konnten keine modulierenden Effekte dokumentiert werden (Swanson et al., 2004).

In der vorliegenden Untersuchung konnten im Hinblick auf die Veränderungen der Parameter in der postnatalen Phase bei Hundewelpen signifikante Veränderungen mit zunehmendem Alter festgestellt werden.

So stieg die Zahl der roten Blutkörperchen stetig von der dritten Lebenswoche ($4,01 \pm 0,14 \times 10^{12}/l$) bis zur 21. Lebenswoche auf $6,35 \pm 0,32 \times 10^{12}/l$ an. Der Hämoglobingehalt und der Hämatokrit unterlagen ebenfalls einem signifikanten Anstieg, jedoch begann dieser erst mit der sechsten Lebenswoche von $9,79 \pm 0,41$ g/dl bzw. $30,0 \pm 1,29$ % auf $14,0 \pm 0,8$ g/dl bzw. $42,0 \pm 2,04$ %. Ähnliches zur Dynamik des hämatologischen Blutbildes bei Hundewelpen in den ersten Lebenswochen wurde auch schon 1946 von Ederstrom und DeBoer nachgewiesen. Nach diesen Erhebungen sanken die Erythrozytenkonzentration (RBC), der Hämoglobingehalt (HGB) und der Hämatokrit (HKT) während der ersten zwei Lebenswochen kontinuierlich (Ederstrom und Deboer 1946). Dieses kehrte sich nach der dritten Lebenswoche, wie in der vorliegenden Studie, in einen stetigen Anstieg der drei Parameter bis zum Erreichen des sechsten Lebensmonats um ($6,08 \times 10^{12}/l$ (RBC), 12,5 g/dl (HGB), 43,4 % (HKT)) (Ederstrom und Deboer 1946).

Die hämatologischen Indizes (MCV, MCH) fielen zwischen den ersten drei Zeitpunkten signifikant ab (MCV: von $73,5 \pm 1,32$ auf $61,2 \pm 3,31$ fl; MCH: von $23,1 \pm 0,72$ auf $20,5 \pm 1,00$ pg), um anschließend in der 21. Lebenswoche wieder anzusteigen. In der Literatur wurde der Erythrozytenindex MCV besonders in der postnatalen Phase aufgrund der makrozytären roten Blutkörperchen als recht hoch beschrieben (Harper et al., 2003). Er nahm auch nach anderen Studien zusammen mit dem MCH bis zu einem Alter von vier (Ederstrom und Deboer 1946) bzw. acht Wochen (Shifrine et al., 1971; Lund et al., 2000) kontinuierlich ab, während beim MCHC wie in der vorliegenden Arbeit nur minimale Veränderungen anzutreffen waren (Ederstrom und Deboer 1946; Earl et al., 1973).

Die Zahl der Thrombozyten unterlag in der eigenen Untersuchung deutlichen Schwankungen mit Werten von $354 \pm 54 \times 10^9/l$ in der dritten Lebenswoche, gefolgt von einem Absinken auf $299 \pm 110 \times 10^9/l$ in der sechsten Lebenswoche. Schwankungen in der Zahl der Plättchen beobachteten auch Earl et al. (1973), allerdings lag im Gegensatz zu den hier gemessenen Konzentrationen die Menge der Thrombozyten in der dritten Lebenswoche (durchschnittlich $272 \times 10^9/l$) im Vergleich zur sechsten Lebenswoche (durchschnittlich $371 \times 10^9/l$) niedriger.

Die Zahl der Thrombozyten unterlag starken interindividuellen Schwankungen, welches sowohl die Auswertung in Bezug auf die Fütterung als auch im Verlauf des Versuchs erschwerte.

Die meisten Studien mit Fokus auf die altersbedingten Veränderungen der hämatologischen Parameter beschränken sich in der Datenerhebung entweder auf die ersten Lebenstage (Mulligan 1945) oder auf die ersten acht Lebenswochen postnatal (Rüsse 1971; Earl et al., 1973; Shifrine et al., 1973; Lund et al., 2000; Mischke et al., 2003). Dieses wirft einige Schwierigkeiten in der vergleichenden Beurteilung der hier gemessenen Daten auf.

5.5.2. Differentialblutbild

Die Leukozyten in dieser Studie unterlagen im Gegensatz zu den Berichten in der Literatur (Weiße et al., 1971; Earl et al., 1973) in den ersten Lebenswochen keiner altersabhängigen Veränderung. In der vorliegenden Studie blieb die Zahl der Leukozyten in den ersten dreizehn Lebenswochen mit ca. $13 - 13,6 \times 10^9/l$ konstant und sank erst zwischen dem dritten und vierten Blutentnahmezeitpunkt (13. bzw. 21. LW) auf ca. $10,7 \times 10^9/l$ ab. Im Gegensatz hierzu fanden Earl et al. (1973) zwischen der dritten und sechsten Lebenswoche einen Anstieg der Leukozyten von 11,2 auf $16,3 \times 10^9/l$. Mischke et al. (2003) konnten, wie in der vorliegenden Studie, zwischen der vierten und achten Lebenswoche keine Veränderungen feststellen. Die hier gemessenen Gesamtleukozytenzahlen in der dritten und dreizehnten Lebenswoche liegen in der Altersspanne der in der Literatur zu entnehmenden Leukozytenzahlen (Weiße et al., 1971; Earl et al., 1973; Shifrine et al., 1973). Für sechs Wochen alte Beaglewelpen ermittelten Shifrine et al. (1973) und Earl et al. (1973) mit $15,3 - 16,3 \times 10^9/l$ deutlich höhere Werte als in der vorliegenden Arbeit. Auch die Werte für fünf Monate alte Beaglewelpen in der Studie von Weiße et al. (1971) lagen über den hier gemessenen Werten. Abweichend sind auch die Ergebnisse von Rüsse (1971), die zwischen der dritten und achten Lebenswoche Werte unter $7,2 \times 10^9/l$ ermittelten. Da es nachgewiesene Rasseunterschiede (Lund et al. 2000) gibt, könnten die von Rüsse (1971) festgestellten vergleichsweise niedrigen Werte eine Ursache in der Verwendung von Mischlingshunden für die Datenerhebung haben.

Bei Betrachtung des Differentialblutbilds im Verlauf des eigenen Versuchs ist zu erkennen, dass sowohl die absolute als auch die relative Zahl der Lymphozyten zwischen der dritten und dreizehnten Lebenswoche signifikant sank (von $8,17 \pm 1,25$ auf $5,41 \pm 1,40 \times 10^9/l$ bzw. $59,8 \pm 4,03$ auf $41,6 \pm 9,65$ %). Gleichzeitig konnte ein signifikanter Anstieg des prozentualen Anteils der neutrophilen Granulozyten zwischen der dritten und dreizehnten Lebenswoche von $34,1 \pm 3,4$ auf $48,1 \pm 10,0$ %) verzeichnet werden. Waren zu Beginn des Versuchs die Anteile der Lymphozyten gegenüber den neutrophilen Granulozyten noch deutlich höher, kehrte sich das Verhältnis im Laufe des Versuchs um, so dass ab der dreizehnten Lebenswoche der Anteil der neutrophilen Granulozyten etwas höher als derjenige der Lymphozyten gemessen werden konnte.

In vorangegangenen Studien zur Dynamik des Differentialblutbildes bei Hundewelpen wurde ebenfalls berichtet, dass die Anteile der Lymphozyten und Granulozyten Veränderungen unterlagen. Hierbei dokumentierten Shifrine et al. (1973), dass von Geburt an ein Anstieg der absoluten Lymphozytenzahlen bis zur sechsten Lebenswoche ($6,1 \pm 1,9 \times 10^9/l$) zu verzeichnen war und sich im Anschluss wieder durch Absinken in der neunten Woche der

Ausgangswert von $4,0 \pm 1,3 \times 10^9/l$ einstellte. Gleichzeitig wurden starke Schwankungen bei den absoluten Zellzahlen der neutrophilen Granulozyten im gesamten Verlauf festgestellt (18. - 24. LT: $5,6 \pm 1,9$; 40. - 45. LT: $7,4 \pm 2,4 \times 10^9/l$). Weiße et al. (1971) berichteten, dass die absolute Zahl der Lymphozyten in den ersten sechs Lebensmonaten abnahm (von ca. $6,3 \pm 2,5$ auf $4,1 \pm 1,5 \times 10^9/l$). Dies ist konform mit den Ergebnissen der eigenen Arbeit. Earl et al. (1973) beschrieben, dass die prozentuale Zahl der Lymphozyten zwischen der dritten und sechsten Lebenswoche abnahm (von 45 auf 34,7 %), während die absolute Zahl von 5 auf $5,7 \times 10^9/l$ leicht zunahm. Mischke et al. (2003) konnten im Verlauf ihrer Studie von der vierten Lebenswoche ($46,0 \pm 9,8$ %) bis zur achten Lebenswoche nur eine leichte Reduktion der Lymphozyten auf $42,7 \pm 11,5$ % messen.

Insgesamt lässt sich aus den gemessenen Werten in der eigenen Arbeit feststellen, dass sowohl die prozentualen als auch die absoluten Werte der Lymphozyten in der dritten und sechsten Lebenswoche über dem in der Literatur angegebenen Referenzbereich für diese Altersspanne lagen. Der prozentuale Teil der Lymphozyten lag höher als in früheren Studien (Rüsse 1971; Earl et al., 1973; Shifrine et al., 1973), die absoluten Werte waren bis auf die ersten beiden Zeitpunkte vergleichbar mit den Ergebnissen in der Literatur (Weiße et al., 1971; Earl et al., 1973; Shifrine et al., 1973).

Von den wenigen Studien, die sich mit der Entwicklung des Differentialblutbildes bei Welpen beschäftigten, erhoben die Mehrzahl nur Werte innerhalb der ersten acht (Rüsse 1971; Earl et al., 1973; Shifrine et al., 1973; Mischke et al., 2003) bis zwölf Lebenswochen (Tagaki 1923). Lediglich drei ältere Studien verfolgten die Dynamik des Differentialblutbildes bei Hundewelpen in den ersten sechs (Weiße et al., 1971) bzw. zwölf Lebensmonaten (Anderson und Gee 1958; Deavers et al., 1971). Alle genannten Studien wurden bis auf zwei Ausnahmen ausschließlich mit reinrassigen Beaglewelpen durchgeführt, wie auch in der vorliegenden Arbeit, weshalb Rasseunterschiede als Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse so gut wie ausgeschlossen werden können. Allerdings können auch Unterschiede auf Differenzen in der Zahl der verwendeten Tiere, Herkunft, Gesundheit und Ernährung der Tiere, als auch den Zeitpunkt und die Technik der Blutentnahme und die verwendeten Messverfahren zurückgeführt werden (Jain 1986; Mischke et al., 2003).

5.5.3. Durchflusszytometrische Untersuchungen

Die Fütterung der unterschiedlichen Diäten beeinflusste den prozentualen Anteil der CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-, CD21⁺-, CD5⁺/MHCII⁺- und CD4⁺/Foxp3⁺-Lymphozyten im peripheren Blut nicht. Es liegen bisher keine Studien vor, in denen ein Einfluss auf die immunologischen Parameter im Blut durch die Art und Zusammensetzung des diätetischen Proteins untersucht wurde. Es gab einen Fütterungsversuch im Zusammenhang mit der Fragestellung der möglichen Rolle der Proteinversorgung im Rahmen der Auslösung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (IBD) (Edwards et al., 1995), bei dem sechzehn Schäferhunden zwei Diäten über vier Monate angeboten wurden, die sich ebenfalls nur in ihrer Proteinquelle unterschieden (Hühnermehl vs. Rinderherzmehl + Molkeprotein (laktosefrei) + Weizenkeimmehl), da die Ernährung als mögliche Ursache dieser Erkrankung diskutiert wird. Die Autoren konnten herausfinden, dass sich in jejunalen Biopaten von Hunden, die die Mischproteinquelle erhielten, nach vier Monaten signifikant weniger Plasmazellen nachweisen ließen als bei den Hunden der anderen Fütterungsgruppe (Edwards et al., 1995). Aus einer weiteren Untersuchungen ging hervor, dass die Fütterung eines aus der Kuhmilch isolierten Glykoproteins (bovines Laktoferrin) bei adulten Beaglen einen immunmodulatorischen Effekt im Blut hatte (Hellweg et al., 2008). Dieser Effekt stellte sich durch erhöhte Zahlen an CD5⁺-T-Zellen und CD8⁺-T-Zellen, sowie durch eine erhöhte Stimulation der Lymphozytenproliferation gegenüber Concanavalin A dar (Hellweg et al., 2008). Bei gesunden sportlich aktiven Männern wurde ein Vergleich zweier Diäten, die sich in der Art der Proteinquelle unterschieden, durchgeführt. Es wurde eine vegetarische Diät (bestehend aus Sojabohnen und Milchprodukten) und eine Diät mit tierischem Protein unbekannter Herkunft hinsichtlich der Effekte auf die Stimulierbarkeit der Lymphozyten und die Konzentrationen der Lymphozytensubpopulationen untersucht (Richter et al., 1991). Auch hier waren wie in der vorliegenden Studie keine Differenzen zwischen den beiden Versuchsgruppen nachzuweisen.

In der eigenen Untersuchung konnten über den gesamten Zeitraum durchschnittliche Werte der CD3⁺-Zellen von 89,7 bis 97,4 % ermittelt werden. Diese lagen somit deutlich höher als publizierte Vergleichswerte von gesunden Beaglewelpen mit Maximalwerten von 64,4 ± 9,2 % in der zwölften Lebenswoche (Faldyna und Toman 1998; Toman et al., 2002). Bei adulten Hunden lag der durchschnittliche Prozentsatz an CD3⁺-Zellen im Blut zwischen 78,6 ± 4,8 und 85,7 ± 3,6 % (Greeley et al., 1996). Watabe et al. (2011) konnten bei gesunden Hunden im Alter von über acht Jahren Werte von bis zu 97,6 % feststellen.

Die Ursache für die unterschiedlich hohen CD3⁺-Werte zwischen der eigenen Untersuchung und der von Faldyna und Toman (1998) ist unklar. Am verwendeten Antikörperklon kann es

allerdings nicht liegen, da sowohl Faldyna und Toman (1998) als auch Watabe et al. (2011) mit dem Klon CA17.2A12 exakt den gleichen Antikörper für die Markierung der CD3⁺-T-Lymphozyten verwendeten wie in der vorliegenden Studie. Ebenso ist die vorhandene Diskrepanz nicht auf Rasseunterschiede zurückzuführen, da Faldyna und Toman (1998) ebenfalls ausschließlich Beaglewelpen untersuchten.

Um den Einfluss des Alters auf die Lymphozytensubpopulationen in dieser Studie zu ermitteln wurde neben der fütterungsgruppenorientierten Auswertung eine zweite Variante verwendet, bei der die vier verschiedenen Blutentnahmezeitpunkte als Altersklassen festgelegt wurden und die Ergebnisse des jeweiligen Zeitpunktes miteinander verglichen wurden. Hierbei zeigte sich, dass der ermittelte prozentuale Anteil der CD4⁺-Zellen in der dritten Woche mit einem Wert von $37,8 \pm 12,1$ % ähnlich dem von Faldyna und Toman (1998) und Toman et al. (2002) definierten Bereich ($35,6 \pm 9,5$ %) war. Vergleicht man die Werte in den nachfolgenden Wochen mit den hier gemessenen Werten, zeigt sich ein ähnlicher Verlauf. Wie in der vorliegenden Studie stieg der Anteil der CD4⁺-Zellen bis zur achten Lebenswoche auf $42,2 \pm 8,9$ % an (Faldyna et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit stiegen sie sogar bis auf $63,3 \pm 16,2$ % in der sechsten Woche an. Anschließend wurde in mehreren Arbeiten ein Absinken der CD4⁺-Zellen ermittelt (Toman et al., 2002; Benyacoub et al., 2003; Faldyna et al., 2005). Der Anteil der CD8⁺-Zellen in dieser Untersuchung bei den drei Wochen alten Welpen war mit $14,1 \pm 6,04$ % ebenfalls vergleichbar mit den Angaben in der Literatur ($13,8 \pm 2,5$ %) (Faldyna und Toman 1998; Toman et al., 2002). Der weitere Verlauf unterscheidet sich jedoch von den bisherigen Studien. Während in der eigenen Untersuchung die Zahl der CD8⁺-Zellen bis zur sechsten Lebenswoche auf $28,3 \pm 16,6$ % anstieg, um dann im weiteren Verlauf bis zur 21. Lebenswoche stetig zu sinken, reduzierte sich der prozentuale Anteil der CD8⁺-Zellen in anderen Untersuchungen zwischen der dritten und achten Lebenswoche und stieg anschließend wieder an (Toman et al., 2002; Benyacoub et al., 2003; Faldyna et al., 2005).

Die CD4⁺/CD8⁺-Ratio verhielt sich in der vorliegenden Arbeit annähernd konstant mit Werten zwischen $2,72 \pm 1,25$ und $2,95 \pm 1,68$, dies entspricht den Ergebnissen einer Vergleichsarbeit von Faldyna und Toman (Faldyna und Toman 1998) mit Werten von $2,7 \pm 0,9$ in der dritten Lebenswoche, $2,5 \pm 0,7$ im dritten Lebensmonat und $3,5 \pm 1,2$ im sechsten Lebensmonat. In einer weiteren Studie konnte jedoch ein deutliches Absinken der Ratio zwischen der 8. und 24. Lebenswoche von $6,6 \pm 3,1$ auf $3,8 \pm 0,7$ ermittelt werden (Faldyna et al., 2001).

In der hier durchgeführten Studie nahm der prozentuale Anteil der CD21⁺-Zellen zwischen der dritten und sechsten Lebenswoche signifikant von $53,6 \pm 7,3$ % auf $37,1 \pm 5,8$ % ab und verblieb anschließend bis zur 21. Lebenswoche nahezu unverändert auf diesem Niveau. In der Literatur wurden bisher bei drei Wochen alten Hundewelpen CD21⁺-Werte von $41,2 \pm 9,8$ % verzeichnet (Faldyna und Toman 1998; Toman et al., 2002) und liegen damit etwas über den hier gemessenen Werten. Diese sanken anschließend bis zur achten bzw. zwölften Woche auf $32,6 \pm 6,3$ % (Faldyna et al., 2001; Faldyna et al., 2005) bzw. $34,5 \pm 9,2$ % (Toman et al., 2002) ab, das in etwa den eigenen Beobachtungen in der sechsten Woche entsprach. In der Literatur reduzierte sich der Anteil der CD21⁺-Lymphozyten stetig bis zur 24. Woche auf $18,1 \pm 4,2$ % (Benyacoub et al., 2003) oder $22,0 \pm 5,9$ % (Faldyna et al., 2001; Faldyna et al., 2005). Die Ursache für den unterschiedlichen Verlauf der CD21⁺-Werte zwischen der eigenen Untersuchung und der von Faldyna et al. (2001) ist unklar. Am verwendeten Antikörperklon kann es nicht liegen, da Faldyna et al. (2001; 2005) mit dem Klon CA2.1D6 den gleichen Antikörper für die Markierung der CD21⁺-B-Lymphozyten verwendeten wie in der vorliegenden Studie. Ebenso ist die vorhandene Diskrepanz nicht auf Rasseunterschiede zurückzuführen, da ebenfalls ausschließlich Beaglewelpen untersucht wurden (Faldyna et al., 2001; Faldyna et al., 2005).

Bisherige Untersuchungen zur Dynamik der Lymphozytensubpopulationen in den ersten 24 Lebenswochen bei Hundewelpen wurden nur von wenigen Autoren (Faldyna und Toman 1998; Toman et al., 2002; Benyacoub et al., 2003; Faldyna et al., 2005) durchgeführt und diese nahmen jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten Blutproben, sodass es für die hier erhobenen vier Altersstufen kaum direkte Vergleichsdaten gibt.

5.5.3.1. Regulatorische T-Zellen

In der vorliegenden Untersuchung gab es zu keinem Zeitpunkt einen Unterschied in der Zahl der regulatorischen T-Zellen zwischen den beiden Fütterungsgruppen. Es wurden $CD4^+$ / $Foxp3^+$ -Werte zwischen 2,06 und 2,83 % gemessen, die recht niedrig im Vergleich zu bereits bekannten Werten bei zehn adulten gesunden Hunden unbekannter Rassezugehörigkeit ($4,3 \pm 0,7$ %) waren (Biller et al., 2007). Auffällig ist jedoch, dass zwischen der dritten und sechsten Lebenswoche ein deutlicher wenn auch nicht signifikanter Anstieg der $CD4^+$ / $Foxp3^+$ T-Lymphozyten zu beobachten war. Zwischen den beiden Probennahmen fand die erste Beifütterung und somit der erste Kontakt mit den Futtermittelantigenen statt. Dies könnte eine Erhöhung der toleranzinduzierenden Zellen erklären. Im anschließenden Verlauf sanken jedoch wieder die Anteile der $CD4^+$ / $Foxp3^+$ -T-Lymphozyten. Signifikante Veränderungen sind besonders zwischen der 13. und 21. Lebenswoche zu erkennen, wobei nach dem dritten Zeitpunkt der Futterwechsel erfolgte. Inwieweit diese Unterschiede zwischen den Zeitpunkten jedoch durch den Futterwechsel bedingt sind, ist durch das Fehlen bisheriger Vergleichsstudien sehr schwer zu beurteilen. Unklar ist auch ob die Anteile der $CD4^+$ / $Foxp3^+$ -T-Zellen wie andere Lymphozytensubpopulationen altersbedingten Schwankungen unterliegen.

Unter den hier gewählten Versuchsbedingungen ergaben sich demnach keine signifikanten Verschiebungen in der Lymphozytenpopulation. Es bleibt offen, ob ein Einfluss auf die regulatorischen T-Zellen durch längere Fütterungsperioden oder ein anderes Verhältnis der Proteinquellen in der Mischproteingruppe nachzuweisen wäre.

5.5.4. Lymphozytenproliferationstest

Die Fütterung der unterschiedlichen Proteinquellen beeinflusste die Proliferationsfähigkeit der Lymphozyten gegenüber den Mitogenen Con A, PWM und PHA-M im peripheren Blut nicht. Bisher sind keine Vergleichsstudien zu dieser Fragestellung zu finden. Es ist nur bekannt, dass eine Veränderung des Verhältnisses von n-6/n-3-Fettsäuren im Futter bei jungen Hunden mit einer erhöhten Stimulierbarkeit der Lymphozyten gegenüber den Mitogenen (PWM, Con A, PHA) einherging (Kearns et al., 1999). In einer Untersuchung an Menschen, die unterschiedliche Proteinquellen (pflanzlich vs. tierisch) aufnahmen, konnten ebenfalls keine Unterschiede in der Proliferationsfähigkeit zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (Richter et al., 1991).

In der eigenen Untersuchung wiesen alle Welpen im Alter von drei Wochen mit einem Stimulationsindex (SI) zwischen $22,1 \pm 9,57$ und $24,6 \pm 11,7$ eine sehr geringe Proliferationsfähigkeit der Lymphozyten gegenüber den Mitogenen Con A, PWM und PHA-M auf. Ähnliche Ergebnisse zur proliferativen Aktivität von T-Lymphozyten (stimuliert mit PHA 1:400) bei neugeborenen Hundewelpen konnte auch 1974 von Gerber und Brown beobachtet werden. Hier zeigten die Welpen in der dritten Lebenswoche kaum proliferative Aktivität (SI von ca. 40), gefolgt von einem signifikanten Anstieg der T-Lymphozytenaktivität bei Welpen im Alter zwischen vier und sechs Wochen auf einen SI von bis zu ca. 800 (Gerber und Brown 1974). Diese Beobachtung ist in der Tendenz vergleichbar mit den Ergebnissen der eigenen Arbeit, in welcher der Stimulationsindex sogar signifikant für alle drei eingesetzten Mitogene zwischen der dritten und sechsten Lebenswoche auf einen SI bis zu $145 \pm 96,8$ (Con A) anstieg. Toman et al. (2002) dagegen dokumentierten keine erhöhte lymphoproliferative Aktivität bei Welpen im Alter zwischen drei und zwölf Wochen. Im Gegenteil, die Proliferationsfähigkeit der Lymphozyten, dargestellt als Stimulationsindex, gegenüber Con A blieb über einen Zeitraum von zwölf Wochen mit vergleichbar niedrigen Werten relativ stabil (3. LW $28,6 \pm 26,7$, 8. LW $43,4 \pm 34$, 12. LW $35,1 \pm 18,8$) (Toman et al., 2002). In der eigenen Arbeit sank der Stimulationsindex zwischen der sechsten und dreizehnten Lebenswoche für alle drei eingesetzten Mitogene signifikant von $135 \pm 85,4$ auf $44,5 \pm 24,8$ (PWM), von $145 \pm 96,8$ auf $74,5 \pm 32,3$ (Con A) und von $143 \pm 80,2$ auf $59,2 \pm 31,2$ (PHA) ab, wie es auch von Gerber und Brown (1974) in der zwölften Lebenswoche für PHA mit einem Absinken des SI von 800 auf ungefähr 500 berichtet wurde. In der vorliegenden Untersuchung erreichte die Stimulierbarkeit der Lymphozyten in der 21. Lebenswoche unter dem Einfluss der Mitogene Con A und PHA-M ihr Maximum ($193 \pm 60,3$ bzw. 159 ± 64). Dies entspricht auch in etwa den Beobachtungen von Gerber und Brown (1974), die ebenfalls eine maximale Stimulierbarkeit der Lymphozyten von Hunden im Alter

zwischen sechs Wochen und sechs Monaten feststellten, gefolgt von einem stetigen Absinken der Stimulierbarkeit im Alter bis zu neun Jahren. Hierbei vermuteten die Autoren als mögliche Ursache die Abnahme der T-Lymphozyten durch Involution des Thymus (Gerber und Brown 1974). Die Unterschiede in der Höhe des Stimulationsindex bei Gerber und Brown (1974) könnten auf einen anderen Verdünnungsfaktor des Mitogens PHA (1:400) im Vergleich zu dieser Studie (1:20) zurückzuführen sein. Die Autoren hatten selbst verschiedene Verdünnungsfaktoren (1:50 bis 1:1600) im Vorfeld getestet und festgestellt, dass die höchste Stimulierbarkeit der Lymphozyten mit einer Verdünnung von 1:400 erzielt wurde (Gerber und Brown 1974).

Die Schwankungen zwischen den einzelnen Individuen waren in dieser Untersuchung zu jedem Zeitpunkt sehr hoch und schränkten daher die Auswertung der Ergebnisse im Hinblick auf die Fütterung ein. Da in dieser Studie nur Welpen der Rasse Beagle teilnahmen, die zudem noch der gleichen Alterskategorie angehörten, konnten zumindest die Rasse und die Altersunterschiede als Grund für die abweichenden Ergebnisse ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurde der genetische Einfluss durch die Verwendung des gleichen Vatertieres für die beiden Würfe reduziert. Theoretisch könnte auch ein Einfluss des Geschlechts ausgeschlossen werden, da die Hunde während der gesamten Studie nicht die Geschlechtsreife erlangten. Es erscheint allerdings so, als ob der zweite Wurf, mit einem homogenen Geschlechterverhältnis meist wesentlich höhere Abweichungen aufwies, als der erste Wurf, der nur aus Rüden bestand. Ein Einfluss durch den Impfstoff auf die Parameter ist fraglich, da zwischen Impfung und Blutentnahme jeweils zwischen vier und sieben Wochen lagen. Einflüsse dieser Art konnten jeweils nur recht zeitnah nach der Impfung festgehalten werden. Zwei Wochen nach der Impfung mit Lebendimpfstoff erniedrigte sich die Proliferationsfähigkeit der Lymphozyten gegenüber PHA (Strasser et al., 2003) während eine Woche nach der Impfung eine Erhöhung der Proliferationsfähigkeit nachgewiesen werden konnte (Miyamoto et al., 1992).

5.5.5. Futtermittelantigeninduzierter Lymphozytenproliferationstest

In der eigenen Untersuchung waren keine Unterschiede zwischen den beiden Fütterungsgruppen ersichtlich. Es konnte allerdings festgestellt werden, dass die Stimulationsindizes sowohl für den mit Futtermittelantigen durchgeführten Test als auch bei dem mitogeninduzierten Lymphozytenproliferationstest (13. LW) vor dem Cross-over für jedes Antigen bzw. Mitogen signifikant niedriger (0,03 - 0,91 bzw. 44,5 - 75,5) waren als nach dem Cross-over (0,55 - 1,44 bzw. 88,8 - 193). Letztendlich bleibt es jedoch unklar, ob diese Unterschiede auf eine beginnende Sensibilisierung gegenüber den Antigenen oder auf einen Alterseffekt zurückzuführen sind. Des Weiteren konnte dokumentiert werden, dass die Proliferationsfähigkeit der Lymphozyten mit zunehmender Antigenkonzentration abnahm. Im vorliegenden Fall ist es wahrscheinlich, dass eine höhere Konzentration eine hemmende Wirkung auf die Zellen hatte. Der Kontrollversuch hatte ergeben, dass die Zellen unter dem Einfluss höherer Konzentrationen an Fisch- und Hühnerproteinextrakt ihre Vitalität verloren hatten. Die Schwierigkeit in der Interpretation dieser Ergebnisse lag unter anderem daran, dass keine Vergleichswerte von Hunden mit gesicherter Futtermittelallergie vorlagen. Nimmt man jedoch den Stimulationsindex von ≥ 2 (Ishida et al., 2004) als Orientierung, wären beide Fütterungsgruppen als tolerant gegenüber den getesteten Proteinen identifiziert worden. Dies stünde zum Zeitpunkt der Studie auch im Einklang mit dem Fehlen jeglicher klinischer Symptomatik. Es bleibt allerdings offen, ob nicht eventuell bei einer verlängerten Fütterungsperiode oder einer wiederholten Testung im zweiten Lebensjahr die Stimulationsindizes weiter angestiegen wären oder sogar eine klinisch nachweisbare Sensibilisierung gegenüber den getesteten Antigenen erfolgt wäre. Des Weiteren wäre anzumerken, dass für diesen Test peripheres Blut erst ab einem Alter von dreizehn Wochen verwendet wurde, im Gegensatz zu der Untersuchung von Kondo et al. (1992) die den nahrungsmittelantigeninduzierten Lymphozytenproliferationstest stattdessen mit Nabelschnurblut durchführten und anhand dieser Ergebnisse im Nachhinein auch bei 93,3% der getesteten Säuglinge eine Nahrungsmittelallergie gegenüber den getesteten Antigenen Ovalbumin und Bovines Serumalbumin vorhersagen konnten (Kondo et al., 1992).

Anhand verschiedener Studien konnte ermittelt werden, dass bestimmte Rassen (v.a. Golden und Labrador Retriever, Westhighland White Terrier, Boxer und Schäferhunde) ein erhöhtes Risiko gegenüber anderen Rassen haben, eine Futtermittelallergie zu entwickeln (Denis und Paradis 1994; Vroom 1994; White 1998; Chesney 2002). Daher wäre es, im Hinblick auf die Sensibilisierung gegenüber den Nahrungsproteinen interessant gewesen, anstatt der hier verwendeten Beaglehunde eine der oben aufgeführten Rassen für die Studie zu verwenden.

Da kommerziell erhältliche futtermittelallergenspezifische IgE-ELISA-Tests aus polyklonalen Antikörpern bestehen und diese nachweislich kreuzreaktiv mit IgG-Antikörpern im Serum sind und somit häufig zu falsch positiven Resultaten führen (Wassom und Grieve 1998) Mueller und Tsohalis (1998), wurde im Rahmen dieser Arbeit auf die Erhebung der IgE-Gehalte im Serum verzichtet. Hinzu kommt noch, dass die ELISA-Testkits nur eine Aussage zum qualitativen IgE-Gehalt erlauben.

5.5.6. Kotkonsistenz

Eine Beeinflussung der Fäzeskonsistenz durch die verwendeten Proteinquellen konnte nicht eindeutig festgestellt werden. Vor dem Cross-over wies die Mischproteingruppe zwar eine signifikant festere Kotkonsistenz auf als die Einzelproteingruppe, ob dieses jedoch ein durch das Futter hervorgerufener Effekt war, bleibt fraglich, da sich nach dem Cross-over keine Unterschiede zwischen den beiden Fütterungsgruppen mehr nachweisen ließen. Es wird davon berichtet, dass Sojaextraktionsschrot als Bestandteil der Hundenahrung oft zu höherer Fäzesproduktion führt und mit weicherem Stuhl einhergeht, im Vergleich zu Rationen deren Proteinquelle beispielsweise Geflügelmehl darstellt (Bednar et al., 2000). Weiterhin wird beschrieben, dass Welpen grundsätzlich feuchtere Fäzes im Vergleich zu adulten Hunden aufweisen (Weber et al., 2003; Zanatta et al., 2011). Dies begründeten Weber et al. (2003) aufgrund der höheren Transitrate der Digesta, resultierend in einer geringeren Wasserresorption im Kolon. Der Kot der Welpen wies jeweils nach dem Cross-over für beide Gruppen eine festere Konsistenz auf als vor dem Futterwechsel. Ein Futtereffekt ist hierbei jedoch weitestgehend auszuschließen, da vor dem Cross-over für fast alle Welpen besonders im Alter zwischen neun und zwölf Wochen ein Durchfallgeschehen (Grad 4 - 5) mit Erbrechen beider Gruppen und Würfe, obwohl diese zwei Monate versetzt geboren wurden, dokumentiert werden konnte. Parasitäre Darminfektionen konnten durch Untersuchung von Sammelkotproben ausgeschlossen werden. Als Ursache für akute selbstlimitierende Durchfälle einhergehend mit Erbrechen und Anorexie bei sechs bis zwölf Wochen alten Welpen sind insbesondere Infektionen sowohl mit Staupe- und Parvoviren als auch dem caninen enteralen Coronavirus oder Mischinfektionen zu nennen (Squires 2003; Yesilbag et al., 2007; Ntafis et al., 2011). Ursächlich wird hier zum einen die Infektion mit einem vom Impfstamm abweichenden Virenstamm diskutiert (Yesilbag et al., 2007). Zum anderen sind Welpen in diesem Alter aufgrund der schwindenden maternalen Antikörper und der Interferenz der maternalen Antikörper mit dem Impfstoff besonders anfällig gegenüber Infektionen (Yesilbag et al., 2007; Sahna et al., 2008). Was genau den Durchfall der Welpen letztlich ausgelöst hat bleibt offen.

5.5.7. Verdaulichkeitsversuch

Es wird davon berichtet, dass Sojaextraktionsschrot als Bestandteil der Hundenahrung oft mit einer geringeren scheinbaren Proteinverdaulichkeit einhergeht (Bednar et al., 2000). Gruppe 1 hat vor dem Cross-over die Einzelproteinquelle bekommen, diese wechselte nach dem Cross-over auf die Mischproteinquelle, während Gruppe 2 vor dem Cross-over die Mischproteinquelle erhielt und nach dem Cross-over auf die Einzelproteinquelle umgestellt wurde. Beides ging nicht mit einer veränderten scheinbaren Proteinverdaulichkeit einher. Dies könnte daran liegen, dass hier der Anteil an Sojaextraktionsschrot in der Ration nur bei 2,5 % in der Trockensubstanz lag, während in den Studien, die von einer veränderten scheinbaren Proteinverdaulichkeit nach Sojaverzehr berichteten, deutlich höhere Konzentrationen eingesetzt wurden (Swanson et al. (2004): 20 %, Bednar et al. (2000): 30 %, Clapper et al. (2001b): 34 - 44 %, Zuo et al. (1996): 19 und 37 %, Yamka et al. (2003): 15 - 46 %). Des Weiteren gab es auch Unterschiede bei den verwendeten Sojaproteinquellen, die von Sojaextraktionsschrot bis zum Sojaproteinisolat reichten.

In der Literatur zeichnen sich auch Unterschiede in der scheinbaren Verdaulichkeit in Abhängigkeit von der verfütterten Proteinquelle ab. So konnte bei Welpen nach Erhalt einer pflanzlichen Proteinquelle (Sojaschrot) mit 76,7 % eine höhere Proteinverdaulichkeit gemessen werden als bei Welpen, deren diätetische Proteinquelle tierischen Ursprungs (Geflügelmehl) war und bei denen die scheinbare Verdaulichkeit des Proteins bei 72,3 % lag (Swanson et al., 2004). Das gleiche galt ebenfalls für adulte Hunde (Zuo et al., 1996; Clapper et al., 2001a). In einer Studie, mit sechzehn Deutsche Schäferhunden im Alter von fünf bis zehn Monaten, in der eine Diät bestehend aus Hühnermehl als Einzelproteinquelle einer Diät mit einer gemischten Proteinquelle (Rinderherzmehl, Weizenkeimmehl und laktosefreies Molkeprotein) gegenübergestellt wurde, konnten wie in der vorliegenden Studie ebenfalls keine Unterschiede in der Verdaulichkeit der Nährstoffe festgestellt werden (Edwards et al., 1995).

Die in der Literatur gemessenen Werte zur Proteinverdaulichkeit im Alter von 11 - 12 Wochen (Gilham et al., 1993; Weber et al., 2003) und 20 - 21 Wochen (Gilham et al., 1993; Weber et al., 2003; Swanson et al., 2004; Zanatta et al., 2011) liegen zwischen 72,3 und 84,5 % und entsprechen somit den Werten der vorliegenden Arbeit mit 78,2 - 81,0 %. In einer der Studien, bei der verschiedene Rassen unterschiedlicher Größe teilnahmen, konnte zum einen festgestellt werden, dass die Rohproteinverdaulichkeit zwischen den beiden genannten Zeitpunkten signifikant anstieg und zum anderen, dass die Rohproteinverdaulichkeit von der Größe des Hundes abhing (Weber et al., 2003). Diesbezüglich wiesen z. B. Mittelschnauzer, lediglich eine Proteinverdaulichkeit von 74,3 -

77,3 % auf, während Deutsche Doggen mit Werten zwischen 80,8 - 84,5 % eine deutlich höhere Proteinverdaulichkeit aufweisen konnten (Weber et al., 2003). Dies konnte in der vorliegenden Studie nicht ganz bestätigt werden. Beagle zählen eher zu den mittelgroßen Hunden und würden demnach mit einer Rohproteinverdaulichkeit zwischen 78,2 und 81,0 % eher in das Spektrum der großwüchsigen Rassen ragen. Hierbei ist noch anzumerken, dass Weber et al. (2003) mit jeweils nur sechs Hunden pro Gruppe eine recht geringe Stichprobenzahl aufweist. Von Altersunterschieden in der Rohproteinverdaulichkeit im Vergleich zu adulten Hunden wurde ebenfalls berichtet (Zanatta et al., 2011), welches durch eine geringere Pepsinsekretion bei Hundewelpen erklärt werden könnte (Buddington et al., 2003).

In der eigenen Arbeit konnten keine fütterungsbedingten Unterschiede in der Rohproteinverdaulichkeit festgestellt werden. Dies könnte eventuell an den niedrigen Anteilen von Fischmehl, Sojaextraktionsschrot und Hüttenkäse in der Gesamtration (jeweils 2,5 %) liegen.

Die Fettverdaulichkeit in der vorliegenden Studie lag für beide Fütterungsgruppen unabhängig vom Futterwechsel zwischen 97,5 und 98,4 %. Dieses ist annähernd konform mit einer Studie von Gilham et al (1993), bei der die Fettverdaulichkeit sowohl bei beiden Fütterungsgruppen als auch in drei Altersstufen konstant zwischen 95 und 97 % lagen, obwohl die Fettgehalte in den beiden Diäten um ca. 10 % differierten.

In der Literatur wurde jedoch auch abweichend von den vorliegenden Ergebnissen beschrieben, dass elf Wochen alte Hunde eine signifikant geringere Fettverdaulichkeit als 21 Wochen alte Hunde aufwiesen (Weber et al., 2003). Andererseits wird postuliert, dass Welpen eine höhere Fettverdaulichkeit im Vergleich zu adulten Hunden aufweisen (Zanatta et al., 2011). Dies wird dadurch begründet, dass Welpen eine linguale Lipase sezernieren können, die zusammen mit der Lipase des Magens die Muttermilchlipide aufschließt (Iverson et al., 1991). Es ist aber nicht bekannt, bis zu welchem Alter die linguale Lipase sezerniert wird (Zanatta et al., 2011). Des Weiteren wurde ein Einfluss auf die Fettverdaulichkeit durch die Größe der Hunderasse festgestellt (Weber et al., 2003). Demnach hatten elf Wochen alte Minipudel und Mittelschnauzer eine signifikant geringere Fettverdaulichkeit (89,6 % und 88,7 %) als gleichaltrige Deutsche Doggen (94,2 %) (Weber et al., 2003).

Zusätzlich gibt es auch Hinweise darauf, dass die Art der im Futter verwendeten Proteinquelle einen signifikanten Einfluss auf die Fettverdaulichkeit hat. So konnte bei einem Vergleich einer tierischen (Hühnermehl) mit einer pflanzlichen Proteinquelle (Sojaextraktionsschrot) festgestellt werden, dass fünf Monate alte Hunde, welche die tierische Proteinquelle erhielten, eine signifikant höhere Fettverdaulichkeit aufwiesen, als Hunde, die die pflanzliche Komponente bekamen (94,8 bzw. 87,2 %) (Swanson et al., 2004).

Die nachgewiesenen Wurfunterschiede in der Verdaulichkeit von Rohfett könnten auch an dem für den zweiten Wurf neu gemischten Futter liegen. Des Weiteren war der tatsächliche Rohfettgehalt der beiden Rationen nur schwer festzustellen, da sich zum Zeitpunkt der Analyse lagerungsbedingt schon erste Anzeichen des Verderbs zeigten (ranziger Geruch) und somit nicht der tatsächlich ursprünglich verfütterte Fettgehalt für die Berechnung der scheinbaren Verdaulichkeit zur Verfügung stand.

Die Verdaulichkeit der Mineralstoffe ließ keine Rückschlüsse auf einen Futtereffekt zu. Die Rohascheverdaulichkeit verringerte sich zwischen der 13. und 21. LW von ca. 51,4 auf bis zu 37,0 %. Ähnliches berichten auch Dobenecker et al. (2010) für Beagles zwischen der 12. und 24. LW, jedoch mit insgesamt höheren Ausgangswerten (79,9 - 55,3 %). Die Kalzium- und Phosphorverdaulichkeit fiel für beide Fütterungsgruppen mit 13 Wochen signifikant höher aus, als nach dem Cross-over mit 21 Wochen. Zudem war die Phosphorverdaulichkeit in beiden Gruppen und zu beiden Zeitpunkten jeweils deutlich höher als die Kalziumverdaulichkeit, wie es auch schon von Sheffy et al. (1985) bei jungen Hunden publiziert wurde. Die Werte der scheinbaren Verdaulichkeit für die beiden Mineralstoffe nach dem CO in dieser Arbeit lagen innerhalb des der Literatur zu entnehmenden Messbereichs (Ca: $35,5 \pm 24,5$ %, P: $48,9 \pm 22,2$ %) (Sheffy et al., 1985).

5.6. Schlussfolgerung und Ausblick

Aus den hier gewonnenen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Zusammensetzung der diätetischen Proteinquelle keinerlei Einfluss auf die in dieser Arbeit analysierten immunologischen und verdauungsphysiologischen Parameter hat. Im futtermittelantigeninduzierten Lymphozytenproliferationstest wiesen die Hunde beider Fütterungsgruppen in der zweiten Fütterungsphase erhöhte Stimulationsindizes auf, bei leicht gesunkenen CD4⁺/Foxp3⁺-Werten. Es ist allerdings unklar ob dies eine beginnende Sensibilisierung gegenüber den jeweiligen Antigenen darstellt. Daher sollten in einer weiterführenden Untersuchung zur Beurteilung der Sensibilisierungs- bzw. Toleranzentwicklung die spezifischen IgE-Werte und eventuell das Zytokin Interleukin-10 im Serum gemessen werden.

In anschließenden Studien könnten für die bessere Beurteilung des futtermittelantigeninduzierten Lymphozytenproliferationstests Blutproben von Hunden als Positivkontrolle mitgeführt werden, bei denen eine, mittels Eliminationsdiät gesicherte, Futtermittelallergie vorliegt. Des Weiteren könnte getestet werden, ob eine höhere Verdünnung der Antigene (z.B. 2,5, 5 und 10 µg/ml) zu besseren Stimulationsergebnissen führt.

Die Auswertung unter Berücksichtigung des Alters der Welpen verdeutlichte in dieser Studie wie auch in vorangegangenen Studien signifikante Veränderungen der hämatologischen und durchflusszytometrischen Parameter als auch der Stimulationsfähigkeit gegenüber Mitogenen mit zunehmendem Alter. Weiter hatte die geringe Wurfzahl einen deutlichen Einfluss auf die statistische Auswertung der immunologischen und verdauungsphysiologischen Parameter. Daher wäre es dringend erforderlich in anschließenden Studien die Wurf- und auch die gesamte Tierzahl zu erhöhen, um die hohe Variabilität zu minimieren.

Die Erhöhung der jeweiligen Proteinanteile (Hüttenkäse, Soja, Fischmehl) in der Mischproteinquelle wäre eventuell noch eine Überlegung wert.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Bislang liegen keine Untersuchungen zur Toleranzentwicklung bei Junghunden gegenüber Nahrungsantigenen vor. Der bisherige Erkenntnisstand beruht im Wesentlichen auf Analogieschlüssen aus der Humanernährung und von anderen Spezies. In dieser Studie soll die Entwicklung der oralen Toleranz gegenüber Nahrungsproteinen bei Hundewelpen in einem Fütterungsversuch untersucht werden. Die Hypothese lautet, dass Welpen die von Geburt an nur mit einer einzigen Proteinquelle konfrontiert werden, bei der Einführung neuer Proteinquellen eine andere immunologische Reaktion aufweisen, als Welpen die von Anfang an mit Mischproteinen gefüttert werden.

Ziel der Studie war es, eine mögliche Beeinflussung der immunologischen Parameter bei Hundewelpen durch die Verfütterung zweier Diäten, die das gleiche Nährstoffprofil aufwiesen und sich lediglich in ihren Proteinquellen (Huhn vs. Huhn + Fisch + Soja + Hüttenkäse) unterschieden, nachzuweisen. Hierzu wurden sechzehn Beaglewelpen aus zwei Würfen entsprechend ihrer Herkunft und des Geschlechts zu je acht Welpen auf zwei Fütterungsgruppen aufgeteilt. Die Welpen wurden ab der dritten Lebenswoche mit dem jeweiligen Versuchsfutter beigefüttert, wobei nach zehn Wochen ein Cross-over der Diäten erfolgte, der sich eine weitere achtwöchige Fütterung anschloss. Sowohl für die Beurteilung der hämatologischen Parameter als auch für die durchflusszytometrische Messung der CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺, CD5⁺/MHCII⁺ und CD4⁺/Foxp3⁺-T-Lymphozyten und die mitogeninduzierten Lymphozytenproliferationstests (PWM, Con A und PHA) wurden Blutproben in der 3., 6., 13. und 21. Lebenswoche gewonnen. Die Verdaulichkeitsversuche zur Bestimmung der scheinbaren Verdaulichkeit von Rohnährstoffen und Mineralstoffen, als auch die futtermittelantigeninduzierten Lymphozytenproliferationstests (Hühner-, Fisch, Soja-, Schweineprotein und Hüttenkäse) wurden am Ende der jeweiligen Fütterungsphase (13. und 21. LW) durchgeführt.

Weder immunologisch noch verdauungsphysiologisch ließen sich Unterschiede zwischen den beiden Fütterungsgruppen nachweisen. Lediglich nach dem Cross-over lagen die Stimulationindizes beider Fütterungsgruppen für den futtermittelantigeninduzierten Proliferationstest für die Parameter Fisch-, Hühner- und Sojaprotein signifikant höher als vor dem Cross-over, bei insgesamt leicht gesunkenen CD4⁺/Foxp3⁺-T-Lymphozyten. Die Stimulationsfähigkeit gegenüber Hüttenkäse erhöhte sich nur tendenziell ($p < 0,1$). Ob diese Resultate allerdings erste Anzeichen einer Sensibilisierung darstellen oder auf altersbedingte Veränderungen zurückzuführen sind bedarf einer weiteren Abklärung. Da der SI-Anstieg nach dem Cross-over bei beiden Fütterungsgruppen beobachtet wurde, kann angenommen werden, dass dem eher ein altersbedingter Effekt zugrunde liegt.

Als Nebeneffekt konnte der Wurfeffekt identifiziert werden.

Die statistische Auswertung der hämatologischen und immunologischen Parameter erfolgte für normalverteilte Werte (Shapiro-Wilk-Test) zum einen durch ANOVA oder Mann-Whitney-U-Test und zum anderen durch das Allgemeine Lineare Modell (Univariat) mit dem Futter als Einflussfaktor. Die Auswertung der Kotkonsistenzen und des Verdaulichkeitsversuchs erfolgte für die Faktoren „Gruppe“ und „Wurf“ mittels dem Allgemeinen Linearen Modell (Univariat, Scheffé-Test). Das Signifikanzlevel wurde mit $p < 0,05$ angegeben.

Um mögliche Effekte der Fütterung zu verdeutlichen sollten weiterführende Untersuchungen z.B. die Konzentration der spezifischen IgE oder des Zytokins Interleukin-10 vorgenommen werden. Für eventuelle Folgeversuche wäre es außerdem sinnvoll die Wurfzahl zu erhöhen um die hohe Variabilität einzuschränken.

7. SUMMARY

The effect of different dietary protein sources on immunological and digestive parameters during the postnatal development of beagle puppies

To date, studies which examine the development of tolerance towards feed antigens in young dogs have not yet been conducted. Current knowledge regarding this issue is based primarily on conclusions by analogy drawn from nutrition studies with humans as well as other species. In the present study, the development of an oral tolerance towards feed proteins was investigated in a feeding trial using beagle puppies.

The hypothesis was that puppies receiving only one protein source from birth onwards may have different immune responses subsequent to the introduction of new protein sources compared to puppies receiving mixed protein sources.

The aim of this study was to confirm a possible influence on the immune system and digestibility by feeding two diets to the puppies, which differed principally in their protein sources (chicken vs. chicken + fish + soybean + cottage cheese). Therefore 16 beagle puppies from two different litters were divided equally in two feeding groups by sex and origin. At the third week of life, the puppies were fed with the respective food, which was followed by a cross-over of the two diets after ten weeks and another eight-week feeding period. Blood samples were taken for the evaluation of the hematologic and differential blood counts, flow cytometric analysis for the characterisation of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺, CD5⁺/MHCII⁺ und CD4⁺/Foxp3⁺-T-lymphocytes and mitogen induced lymphocyte proliferation assay with PWM, Con A und PHA at the 3rd, 6th, 13th and 21st weeks of life. The digestive trials for the analysis of nutrients and minerals and the food associated lymphocyte proliferation assays (chicken-, fish-, soy-, pork protein and cottage cheese) were conducted at the end of each feeding period (13th and 21st week of life).

Differences between both feeding groups were neither verifiable immunologically nor in regard to digestibility. Merely after the cross-over, the stimulation indices for the food associated proliferation assay for the fish, chicken and soyprotein were significantly higher compared to before the cross-over, and accompanied by slightly decreased amounts of CD4⁺/Foxp3⁺-T-lymphocytes. The proliferation response towards cottage cheese increased only numerically ($p < 0,1$). Whether these results represent the first indications of beginning sensitization necessitates further investigation. As the results were observed for both groups however, it can be assumed that the increases in SI after the cross-over more likely reflect age-dependent effects than feed-dependent effects.

However as an side effect the litter-effect could be detected.

Statistical analysis of hematological and immunological parameters was performed using ANOVA and Mann-Whitney-U-Test by using general linear model procedures (univariate) with each feeding group as a factor. The analysis of the fecal scoring and the digestion trial for the two factors „group“ and „litter“ was performed using general linear model procedures (univariate, Scheffé). The level of significance was set at $p < 0.05$.

To obtain more information about the influence of different protein sources on the immune response, further investigations such as the measurement of feed antigen specific IgE antibodies and the cytokine IL-10 should be conducted. Furthermore, the number of puppy litters examined should be increased to avoid high variability.

8. LITERATURVERZEICHNIS

Abrams, V. K.; Hwang, B.; Lesnikova, M.; Gass, M. J.; Wayner, E.; Castilla-Llorente, C.; Georges, G. E.; Nash, R. A. (2010):

A novel monoclonal antibody specific for canine CD25 (P4A10): Selection and evaluation of canine Tregs.

Veterinary Immunology and Immunopathology, **135** (3 - 4), S. 257 - 265

Akdis, C. A.; Blesken, T.; Akdis, M.; Wuthrich, B.; Blaser, K. (1998):

Role of interleukin 10 in specific immunotherapy.

Journal of Clinical Investigation, **102** (1), S. 98 - 106

Akdis, M. (2006):

Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more.

Current Opinion in Immunology, **18** (6), S. 738 - 744

Anderson, A. C.; Gee, W. (1958):

Normal blood values in the beagle.

Veterinary medicine, **53**, S. 135 - 140

Andre, F.; Pene, J.; Andre, C. (1996):

Interleukin-4 and interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from food-allergic patients.

Allergy, **51** (5), S. 350 - 355

Arias, R. S.; Flanagan, M. L.; Miller, K. D.; Nien, Y. C.; Hu, P. S.; Gray, D.; Khawli, L. A.; Epstein, A. L. (2007):

RA8, a human anti-CD25 antibody against human Treg cells.

Hybridoma, **26** (3), S. 119 - 130

Asseman, C.; Mauze, S.; Leach, M. W.; Coffman, R. L.; Powrie, F. (1999):

An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation.

Journal of Experimental Medicine, **190** (7), S. 995 - 1003

Balkwill, F. R.; Burke, F. (1989):

The cytokine network.

Immunology Today, **10** (9), S. 299 - 303

Bednar, G. E.; Murray, S. M.; Patil, A. R.; Flickinger, E. A.; Merchen, N. R.; Fahey, G. C. (2000):

Selected animal and plant protein sources affect nutrient digestibility and fecal characteristics of ileally cannulated dogs.

Archives of Animal Nutrition, **53** (2), S. 127 - 140

Benyacoub, J.; Czarnecki- Maulden, G. L.; Cavadini, C.; Sauthier, T.; Anderson, R. E.; Schiffrin, E. J.; von der Weid, T. (2003):

Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs.

Journal of Nutrition, **133** (4), S. 1158 - 1162

Berthiaume, F.; Aparicio, C. L.; Eungdamrong, J.; Yarmush, M. L. (1999):

Age- and disease-related decline in immune function: An opportunity for "thymus-boosting" therapies.

Tissue Engineering, **5** (6), S. 499 - 514

Biller, B. J.; Elmslie, R. E.; Burnett, R. C.; Avery, A. C.; Dow, S. W. (2007):

Use of FoxP3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer.

Veterinary Immunology and Immunopathology, **116** (1 - 2), S. 69 - 78

Bryant, B. J.; Shifrine, M. (1972):

Histogenesis of lymph-nodes during development of dog.

Journal of the Reticuloendothelial Society, **12** (1), S. 96 - 107

Buddington, R. K.; Elnif, J.; Malo, C.; Donahoo, J. B. (2003):

Activities of gastric, pancreatic, and intestinal brush-border membrane enzymes during postnatal development of dogs.

American Journal of Veterinary Research, **64** (5), S. 627 - 634

Byrne, K. M.; Kim, H. W.; Chew, B. P.; Reinhart, G. A.; Hayek, M. G. (2000):

A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes.

Veterinary Immunology and Immunopathology, **73** (2), S. 167 - 182

Campbell, D. E.; Hill, D. J.; Kemp, A. S. (1998):

Enhanced IL-4 but normal interferon-gamma production in children with isolated IgE mediated food hypersensitivity.

Pediatric Allergy and Immunology, **9** (2), S. 68 - 72

Chesney, C. J. (2002):

Food sensitivity in the dog: a quantitative study.

Journal of Small Animal Practice, **43** (5), S. 203 - 207

Chien, Y.-H.; Konigshofer, Y. (2007):

Antigen recognition by gamma delta T cells.

Immunological Reviews, **215**, S. 46 - 58

Clapper, G. M.; Grieshop, C. M.; Merchen, N. R.; Russett, J. C.; Brent, J. L.; Fahey, G. C. (2001a):

Ileal and total tract nutrient digestibilities and fecal characteristics of dogs as affected by soybean protein inclusion in dry, extruded diets.

Journal of Animal Science, **79** (6), S. 1523 - 1532

Clapper, G. M.; Grieshop, C. M.; Merchen, N. R.; Russett, J. C.; Brent, J. L.; Fahey, G. C. (2001b):

Ileal and total tract nutrient digestibilities and fecal characteristics of dogs as affected by soybean protein inclusion in dry, extruded diets.

Journal of Animal Science, **79** (6), S. 1523 - 1532

Clough, N. C.; Roth, J. A. (1998):

Understanding immunology.

Mosby Verlag. St. Louis

Cobbold, S.; Metcalfe, S. (1994):

Monoclonal-Antibodies that define canine homologs of human CD antigens - Summary of the first international Canine Leucozyte Antigen Workshop (CLAW).

Tissue Antigens, **43** (3), S. 137 - 154

Coffman, R. L.; Mosmann, T. R. (1991):

35th forum in immunology - CD4+ T-cell subsets - regulation of differentiation and function - introduction.

Research in Immunology, **142** (1), S. 7 - 9

Corthay, A. (2009):

How do Regulatory T Cells Work?

Scandinavian Journal of Immunology, **70** (4), S. 326 - 336

Crepaldi, T.; Crump, A.; Newman, M.; Ferrone, S.; Antczak, D. F. (1986):

Equine T lymphocytes express MHC class II antigens.

Journal of Immunogenetics, **13** (4), S. 349 - 360

Dall'Ara, P. (2003):

Immune System and Ageing in the Dog: Possible Consequences and Control Strategies.

Veterinary Research Communications, **27** (0), S. 535 - 542

De Luna, R.; Vuotto, M. L.; Ielpo, M. T. L.; Ambrosio, R.; Piantedosi, D.; Moscatiello, V.; Ciaramella, P.; Scalone, A.; Gradoni, L.; Mancino, D. (1999):

Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*.

Veterinary Immunology and Immunopathology, **70** (1 - 2), S. 95 - 103

Dearman, R. J.; Kimber, I. (2009):

Animal models of protein allergenicity: potential benefits, pitfalls and challenges.

Clinical and Experimental Allergy, **39** (4), S. 458 - 468

Deavers, S.; Smith, E. L.; Huggins, R. A. (1971):

Changes in Red Cell Volume, Venous Hematocrit, and Hemoglobin Concentration in Growing Beagles.

Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, **137** (1), S. 299 - 303

Denis, S.; Paradis, M. (1994):

L'allergie alimentaire chez le chien et le chat. Etude rétrospective.

Le Médecin Vétérinaire du Québec, **24** (1), S. 15 - 20

Dial, S. M. (1992):

Hematology, chemistry profile and urinalysis for pediatric-patients.

Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, **14** (3), S. 305 - 309

Dobenecker, B.; Frank, V.; Kienzle, E. (2010):

High calcium intake differentially inhibits nutrient and energy digestibility in two different breeds of growing dogs.

Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, **94** (5), S. 109 - 114

Doveren, R. F. C.; Vanderlinden, C. J.; Spronken, E. E. M.; Groenewegen, G.; Buurman, W. A. (1986):

Canine MHC-class-II antigens on B-lymphocytes and T-lymphocytes.

Tissue Antigens, **27** (2), S. 87 - 98

Earl, F. L.; Melveger, B. E.; Wilson, R. L. (1973):

Hemogram and Bone-Marrow Profile of Normal Neonatal and Weanling Beagle Dogs.

Laboratory Animal Science, **23** (5), S. 690 - 695

Ederstrom, H. E.; Deboer, B. (1946):

Changes in the blood of the dog with age.

Anatomical Record, **94** (4), S. 663 - 670

Edwards, J. F.; Fossum, T. W.; Willard, M. D.; Cohen, N. D.; Patterson, W. B.; Carey, D. P. (1995):

Changes in the Intestinal Mucosal Cell-Populations of German-Shepherd Dogs Fed Diets Containing Different Protein-Sources.

American Journal of Veterinary Research, **56** (3), S. 340 - 348

Faldyna, M.; Levá, L.; Knötigová, P.; Toman, M. (2001):

Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs - a flow cytometric study.

Veterinary Immunology and Immunopathology, **82** (1 - 2), S. 23 - 37

Faldyna, M.; Sinkora, J.; Knotigova, P.; Leva, L.; Toman, M. (2005):

Lymphatic organ development in dogs: major lymphocyte subsets and activity.

Veterinary Immunology and Immunopathology, **104** (3 - 4), S. 239 - 247

Faldyna, M.; Toman, M. (1998):

The effect of age on the distribution of lymphocyte and neutrophil granulocyte subsets in the peripheral blood of dog.

Veterinarni Medicina, **43** (6), S. 193 - 199

Felsburg, P. J. (2002):

Overview of immune system development in the dog: comparison with humans.

Human and Experimental Toxicology, **21** (9 - 10), S. 487 - 492

Foster, A. P.; Knowles, T. G.; Moore, A. H.; Cousins, P. D. G.; Day, M. J.; Hall, E. J. (2003a):

Serum IgE and IgG responses to food antigens in normal and atopic dogs, and dogs with gastrointestinal disease.

Veterinary Immunology and Immunopathology, **92** (3 - 4), S. 113 - 124

Foster, A. P.; Littlewood, J. D.; Webb, P.; Wood, J. L. N.; Rogers, K.; Shaw, S. E. (2003b):

Comparison of intradermal and serum testing for allergen-specific IgE using a Fc[ϵ 1]RI[α]-based assay in atopic dogs in the UK.

Veterinary Immunology and Immunopathology, **93** (1 - 2), S. 51 - 60

Gerber, J. D.; Brown, A. L. (1974):

Effect of development and aging on the response of canine lymphocytes to phytohemagglutinin.

Infection and Immunity, **10** (4), S. 695 - 699

Gilham, M. S.; Booles, D.; Johnson, J. V.; Legrand-Defretin, V. (1993):

Digestibility in Labrador Retrievers during growth.

Proceedings of the Nutrition Society (Abstract), **52**, S. 294

Gomes, M. D. S.; Beraldo, M. C.; Putarov, T. C.; Brunetto, M. A.; Zaine, L.; Gloria, M. B. A.; Carciofi, A. C. (2011):

Old beagle dogs have lower faecal concentrations of some fermentation products and lower peripheral lymphocyte counts than young adult beagles.

British Journal of Nutrition, **106**, S. 187 - 190

Greeley, E. H.; Ballam, J. M.; Harrison, J. M.; Kealy, R. D.; Lawler, D. F.; Segre, M. (2001):
The influence of age and gender on the immune system: a longitudinal study in Labrador
Retriever dogs.

Veterinary Immunology and Immunopathology, **82** (1 - 2), S. 57 - 71

Greeley, E. H.; Kealy, R. D.; Ballam, J. M.; Lawler, D. F.; Segre, M. (1996):
The influence of age on the canine immune system.

Veterinary Immunology and Immunopathology, **55** (1 - 3), S. 1 - 10

Guilford, W. G.; Matz, M. E. (2003):

The nutritional management of gastrointestinal tract disorders in companion animals.

New Zealand Veterinary Journal, **51** (6), S. 284 - 291

Guilford, W. G.; Strombeck, D. R.; Center, S. A.; Williams, D. A.; Meyer, D. J. (1996):

Strombeck's Small Animal Gastroenterology.

Elsevier LTD Verlag. Oxford

Halliwel, R. E. W. (1993):

The serological diagnosis of IgE-mediated allergic diseases in domestic-animals.

Journal of Clinical Immunoassay, **16** (2), S. 103 - 108

Halliwel, R. E. W.; Kunkle, G. A. (1978):

The radioallergosorbent test in the diagnosis of canine atopic disease.

Journal of Allergy and Clinical Immunology, **62** (4), S. 236 - 242

Han, G. D.; Matsuno, M.; Ito, G.; Ikeuchi, Y.; Suzuki, A. (2000):

Meat allergy: Investigation of potential allergenic proteins in beef.

Bioscience Biotechnology and Biochemistry, **64** (9), S. 1887 - 1895

Harper, E. J.; Hackett, R. M.; Wilkinson, J.; Heaton, P. R. (2003):

Age-related variations in hematologic and plasma biochemical test results in Beagles and
Labrador Retrievers.

Journal of the American Veterinary Medical Association, **223** (10), S. 1436 - 1442

Harvey, R. G. (1993):

Food Allergy and Dietary Intolerance in Dogs - a Report of 25 Cases.

Journal of Small Animal Practice, **34** (4), S. 175 - 179

Hellweg, P.; Krammer-Lukas, S.; Strasser, A.; Zentek, J. (2008):

Effects of bovine lactoferrin on the immune system and the intestinal microflora of adult dogs.

Archives of Animal Nutrition, **62** (2), S. 152 - 161

Hill, P. B.; Moriello, K. A.; DeBoer, D. J. (1995):

Concentrations of total serum IgE, IgA, and IgG in atopic and parasitized dogs.

Veterinary Immunology and Immunopathology, **44** (2), S. 105 - 113

Hodgkin, P. D.; Yamashita, L. C.; Seymour, B.; Coffman, R. L.; Kehry, M. R. (1991):

Membranes from both TH1 and TH2 T-cell clones stimulate B-cell proliferation and prepare B-cells for lymphokine-induced differentiation to secrete IG.

Journal of Immunology, **147** (11), S. 3696 - 3702

Hoffman, K. M.; Ho, D. G.; Sampson, H. A. (1997):

Evaluation of the usefulness of lymphocyte proliferation assays in the diagnosis of allergy to cow's milk.

Journal of Allergy and Clinical Immunology, **99** (3), S. 360 - 366

HogenEsch, H.; Dunham, A. D.; Scott-Moncrieff, C.; Glickman, L. T.; DeBoer, D. J. (2002):

Effect of vaccination on serum concentrations of total and antigen-specific immunoglobulin E in dogs.

American Journal of Veterinary Research, **63** (4), S. 611 - 616

HogenEsch, H.; Thompson, S.; Dunham, A.; Ceddia, M.; Hayek, M. (2004):

Effect of age on immune parameters and the immune response of dogs to vaccines: a cross-sectional study.

Veterinary Immunology and Immunopathology, **97** (1 - 2), S. 77 - 85

Holmes, M. A.; Lunn, D. P. (1994):

Variation of MHC II Expression on Canine Lymphocytes with Age.

Tissue Antigens, **43** (3), S. 179 - 183

Horiuchi, Y.; Nakajima, Y.; Nariai, Y.; Asanuma, H.; Kuwabara, M.; Yukawa, M. (2007):
Th1/Th2 balance in canine peripheral blood lymphocytes - A flow cytometric study.
Veterinary Immunology and Immunopathology, **118** (3 - 4), S. 179 - 185

Horiuchi, Y.; Tominaga, M.; Ichikawa, M.; Yamashita, M.; Jikumaru, Y.; Nariai, Y.; Nakajima, Y.; Kuwabara, M.; Yukawa, M. (2009):
Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of dogs with metastatic tumors.
Microbiology and Immunology, **53** (8), S. 468 - 474

Ishida, R.; Masuda, K.; Kurata, K.; Ohno, K.; Tsujimoto, H. (2004):
Lymphocyte blastogenic responses to inciting food allergens in dogs with food hypersensitivity.
Journal of Veterinary Internal Medicine, **18** (1), S. 25 - 30

Iverson, S. J.; Kirk, C. L.; Hamosh, M.; Newsome, J. (1991):
Milk lipid digestion in the neonatal dog-The combined actions of gastric and bile-salt stimulated lipases.
Biochimica Et Biophysica Acta, **1083** (1), S. 109 - 119

Jain, N. C. (1986):
Schalm's Veterinary Hematology.
Lea & Febiger Verlag. Philadelphia

Jeffers, J. G.; Meyer, E. K.; Sosis, E. J. (1996):
Responses of dogs with food allergies to single ingredient dietary provocation.
Journal of the American Veterinary Medical Association, **209** (3), S. 608 - 611

Jeffers, J. G.; Shanley, K. J.; Meyer, E. K. (1991):
Diagnostic testing of dogs for food hypersensitivity.
Journal of the American Veterinary Medical Association, **198** (2), S. 245 - 250

Kararli, T. T. (1995):
Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology and biochemistry of humans and commonly used laboratory-animals.
Biopharmaceutics & Drug Disposition, **16** (5), S. 351 - 380

- Kaser, T.; Gerner, W.; Hammer, S. E.; Patzl, M.; Saalmuller, A. (2008):
Phenotypic and functional characterisation of porcine CD4(+)CD25(high) regulatory T cells.
Veterinary Immunology and Immunopathology, **122** (1 - 2), S. 153 - 158
- Kearns, R. J.; Hayek, M. G.; Turek, J. J.; Meydani, M.; Burr, J. R.; Greene, R. J.; Marshall, C. A.; Adams, S. M.; Borgert, R. C.; Reinhart, G. A. (1999):
Effect of age, breed and dietary omega-6 (n-6) : omega-3 (n-3) fatty acid ratio on immune function, eicosanoid production, and lipid peroxidation in young and aged dogs.
Veterinary Immunology and Immunopathology, **69** (2 - 4), S. 165 - 183
- Kelly, W. D. (1963):
Thymus and Lymphoid Morphogenesis in Dog.
Federation Proceedings, **22** (2), S. 600 - 608
- Keppel, K. E.; Campbell, K. L.; Zuckermann, F. A.; Greeley, E. A.; Schaeffer, D. J.; Husmann, R. J. (2008):
Quantitation of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy.
Veterinary Immunology and Immunopathology, **123** (3 - 4), S. 337 - 344
- Kienzle, E.; Opitz, B.; Earle, K. E.; Smith, P. M.; Maskell, I. E.; Iben, C. (1998):
The development of an improved method of predicting the energy content in prepared dog and cat food.
Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, **79** (2), S. 69 - 79
- Kjelgaard-Hansen, M.; Luntang-Jensen, M.; Willesen, J.; Jensen, A. L. (2007):
Measurement of serum interleukin-10 in the dog.
The Veterinary Journal, **173** (2), S. 361 - 365
- Kleinbeck, M. L.; Hites, M. J.; Loker, J. L.; Halliwell, R. E.; Lee, K. W. (1989):
Enzyme-linked immunosorbent-assay for measurement of allergen-specific IgE antibodies in canine serum.
American Journal of Veterinary Research, **50** (11), S. 1831 - 1839

Kondo, N.; Kobayashi, Y.; Shinoda, S.; Kasahara, K.; Kameyama, T.; Iwasa, S.; Orii, T. (1992):

Cord blood lymphocyte-responses to food antigens for the prediction of allergic disorders. *Archives of Disease in Childhood*, **67** (8), S. 1003 - 1007

Krakovka, S.; Ringler, S. S. (1986):

Activation specificity of commonly employed mitogens for canine B- and T-lymphocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **11** (3), S. 281 - 289

Lankford, S.; Petty, C.; La Voy, A.; Reckling, S.; Tompkins, W.; Dean, G. A. (2008):

Cloning of feline FOXP3 and detection of expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **122** (1 - 2), S. 159 - 166

Lehrer, S. B.; Horner, W. E.; Reese, G. (1996):

Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **36** (6), S. 553 - 564

Lund, C.; Kuhl, S.; Mischke, R.; Gunzel-Apel, A. R. (2000):

Reference values of red blood picture in Beagle, German Shepherd dog and Golden Retriever puppies.

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, **113** (11 - 12), S. 447 - 453

Massimino, S.; Kearns, R. J.; Loos, K. M.; Burr, J.; Park, J. S.; Chew, B.; Adams, S.; Hayek, M. G. (2003):

Effects of age and dietary beta-carotene on immunological variables in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **17** (6), S. 835 - 842

Masuda, K.; Yasuda, N. (2008):

The Antibody against Human CD25, ACT-1, Recognizes Canine T-lymphocytes in the G2/M and G0/G1 Phases of the Cell Cycle during Proliferation.

Journal of Veterinary Medical Science, **70** (11), S. 1285 - 1287

Matsumoto, T.; Miike, T.; Yamaguchi, K.; Murakami, M.; Kawabe, T.; Yodoi, J. (1991):

Serum levels of soluble IL-2 receptors, IL-4 and IgE-binding factors in childhood allergic diseases.

Clinical and Experimental Immunology, **85** (2), S. 288 - 292

Meyer, H.; Zentek, J. (2010):

Ernährung des Hundes

Grundlagen, Fütterung, Diätetik.

Enke Verlag. Stuttgart

Miller, B. G.; Newby, T. J.; Stokes, C. R.; Bourne, F. J. (1984):

Influence of Diet on Postweaning Malabsorption and Diarrhea in the Pig.

Research in Veterinary Science, **36** (2), S. 187 - 193

Mischke, R.; Lund, C.; Kuhl, S.; Beyerbach, M.; Günzel-Apel, A. R. (2003):

Reference values of white blood cell counts and differential blood picture in suckling puppies of different breeds.

Praktischer Tierarzt, **84** (1), S. 14 - 20

Miyamoto, T.; Taura, Y.; Une, S.; Yoshitake, M.; Nakama, S.; Watanabe, S. (1992):

Changes in blastogenic responses of lymphocytes and delayed type hypersensitivity responses after vaccination in dogs.

The Journal of Veterinary Medical Science, **54** (5), S. 945 - 950

Motrich, R. D.; Gottero, C.; Rezzonico, C.; Riera, C. M.; Rivero, V. (2003):

Cow's milk stimulated lymphocyte proliferation and TNF alpha secretion in hypersensitivity to cow's milk protein.

Clinical Immunology, **109** (2), S. 203 - 211

Moxham, G. (2001):

The WALTHAM faeces scoring system-a tool for veterinarians and pet owners: How does your pet rate?

Waltham Focus, **11**, S. 24 - 25

Mueller; Tsohalis (1998):

Evaluation of serum allergen-specific IgE for the diagnosis of food adverse reactions in the dog.

Veterinary Dermatology, **9** (3), S. 167 - 171

Müller, U. (1967):

Blutuntersuchungen an Hundewelpen im Zeitraum vom 1. bis 75. Lebenstag.

Dissertation, Universität Leipzig

Mulligan, R. M. (1945):

Quantitative studies on the blood and bone marrow of newborn mongrel puppies.

Anatomical Record, **91** (2), S. 161 - 167

Nemazee, D. (2006):

Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance.

Nature Reviews Immunology, **6** (10), S. 728 - 740

Nickel, R.; Schummer, A.; Seiferle, E.; Habermehl, K.-H. (2004):

Lehrbuch der Anatomie der Haustiere: Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane.

Parey Verlag. Hamburg

Ntafis, V.; Mari, V.; Decaro, N.; Papanastassopoulou, M.; Papaioannou, N.; Mpatziou, R.; Buonavoglia, C.; Xylouri, E. (2011):

Isolation, tissue distribution and molecular characterization of two recombinant canine coronavirus strains.

Veterinary Microbiology, **151** (3 - 4), S. 238 - 244

O'Neill, K.; Guth, A.; Biller, B.; Elmslie, R.; Dow, S. (2009):

Changes in Regulatory T Cells in Dogs with Cancer and Associations with Tumor Type.

Journal of Veterinary Internal Medicine, **23** (4), S. 875 - 881

Olivry, T.; Kurata, K.; Paps, J. S.; Masuda, K. (2007):

A blinded randomized controlled trial evaluating the usefulness of a novel diet (Aminoprotect Care) in dogs with spontaneous food allergy.

Journal of Veterinary Medical Science, **69** (10), S. 1025 - 1031

Opitz, B. (1996):

Untersuchungen zur Energiebewertung von Futtermitteln für Hund und Katze.

Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München

Paterson, S. (1995):

Food hypersensitivity in 20 dogs with skin and gastrointestinal signs.

Journal of Small Animal Practice, **36** (12), S. 529 - 534

Ploemen, J.-P. H. T. M.; Ravesloot, W. T. M.; van Esch, E. (2003):

The Incidence of Thymic B Lymphoid Follicles in Healthy Beagle Dogs.

Toxicologic Pathology, **31** (2), S. 214 - 219

Restani, P.; Ballabio, C.; Tripodi, S.; Fiocchi, A. (2009):

Meat allergy.

Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, **9** (3), S. 265 - 269

Richter, E. A.; Kiens, B.; Raben, A.; Tvede, N.; Pedersen, B. K. (1991):

Immune parameters in male-athletes after a lacto-ovo vegetarian diet and a mixed western diet.

Medicine and Science in Sports and Exercise, **23** (5), S. 517 - 521

Rideout, B. A.; Moore, P. F.; Pedersen, N. C. (1992):

Persistent up-regulation of MHC class-II antigen expression on lymphocytes-T from cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus.

Veterinary Immunology and Immunopathology, **35** (1 - 2), S. 71 - 81

Rink, L.; Kruse, A.; Haase, H. (2011):

Immunologie für Einsteiger.

Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg

Rosser, E. J. (1993):

Diagnosis of Food Allergy in Dogs.

Journal of the American Veterinary Medical Association, **203** (2), S. 259 - 262

Rüsse, I. (1971):

Veränderungen der Blutzusammensetzung bei neugeborenen Hundewelpen.

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, **84** (13), S. 249 - 252

Sahna, K. C.; Gencay, A.; Atalay, O. (2008):

Viral aetiology of diarrhoea in puppies from a same shelter in Turkey: presence of mixed infections.

Revue de Médecine Vétérinaire, **159** (6), S. 345 - 347

Schade, R. P.; Van Ieperen-Van Dijk, A. G.; Van Reijssen, F. C.; Versluis, C.; Kimpen, J. L. L.; Knol, E. F.; Bruijnzeel-Koomen, C. A. F. M.; Van Hoffen, E. (2000):

Differences in antigen-specific T-cell responses between infants with atopic dermatitis with and without cow's milk allergy: Relevance of TH2 cytokines.

Journal of Allergy and Clinical Immunology, **106** (6), S. 1155 - 1162

Schiessl, B.; Zemmann, B.; Hodgkin-Pickart, L. A.; de Weck, A. L.; Griot-Wenk, M.; Mayer, P.; Nefzger, M.; Schneider, H.; Liehl, E. (2003):

Importance of early allergen contact for the development of a sustained immunoglobulin E response in a dog model.

International Archives of Allergy and Immunology, **130** (2), S. 125 - 134

Sheffy, B. E.; Williams, A. J.; Zimmer, J. F.; Ryan, G. D. (1985):

Nutrition and metabolism of the geriatric dog.

Cornell Veterinarian, **75** (2), S. 324 - 347

Shifrine, M.; Munn, S. L.; Rosenblat, S.; Bulgin, M. S.; Wilson, F. D. (1973):

Hematologic Changes to 60 Days of Age in Clinically Normal Beagles.

Laboratory Animal Science, **23** (6), S. 894 - 898

Shifrine, M.; Smith, J. B.; Bulgin, M. S.; Bryant, B. J.; Zee, Y. C.; Osburn, B. I. (1971):

Response of canine fetuses and neonates to antigenic stimulation.

Journal of Immunology, **107** (4), S. 965 - 970

Somberg, R.; Tipold, A.; Hartnett, B.; Moore, P.; Henthorn, P.; Felsburg, P. (1996):

Postnatal development of T cells in dogs with X-linked severe combined immunodeficiency.

Journal of Immunology, **156** (4), S. 1431 - 1435

Somberg, R. L.; Robinson, J. P.; Felsburg, P. J. (1994):

T lymphocyte development and function in dogs with X-linked severe combined immunodeficiency.

Journal of Immunology, **153** (9), S. 4006 - 4015

Sopo, S. M.; Pesaresi, M. A.; Guerrini, B.; Federico, G.; Stabile, A. (1999):

Mononuclear cell reactivity to food allergens in neonates, children and adults.

Pediatric Allergy and Immunology, **10** (4), S. 249 - 252

Squires, R. A. (2003):

An update on aspects of viral gastrointestinal diseases of dogs and cats.

New Zealand Veterinary Journal, **51** (6), S. 252 - 261

Stedman, K.; Lee, K.; Hunter, S.; Rivoire, B.; McCall, C.; Wassom, D. (2001):

Measurement of canine IgE using the alpha chain of the human high affinity IgE receptor.

Veterinary Immunology and Immunopathology, **78** (3 - 4), S. 349 - 355

Strasser, A.; May, B.; Teltscher, A.; Wistrela, E.; Niedermuller, H. (2003):

Immune modulation following immunization with polyvalent vaccines in dogs.

Veterinary Immunology and Immunopathology, **94** (3 - 4), S. 113 - 121

Strobel, S. (2001):

Immunity induced after a feed of antigen during early life: oral tolerance v. sensitisation.

Proceedings of the Nutrition Society, **60**, S. 437 - 442

Strobel, S.; Ferguson, A. (1984):

Immune-Responses to Fed Protein Antigens in Mice .3. Systemic Tolerance or Priming Is Related to Age at Which Antigen Is 1st Encountered.

Pediatric Research, **18** (7), S. 588 - 594

Sun, J. B.; Czerkinsky, C.; Holmgren, J. (2009):

Mucosally induced Immunological Tolerance, Regulatory T Cells and the Adjuvant Effect by Cholera Toxin B Subunit.

Scandinavian Journal of Immunology, **71** (1), S. 1 - 11

Swanson, K. S.; Kuzmuk, K. N.; Schook, L. B.; Fahey, G. C. (2004):

Diet affects nutrient digestibility, hematology, and serum chemistry of senior and weanling dogs.

Journal of Animal Science, **82** (6), S. 1713 - 1724

Tagaki, T. (1923):

Die normale Beschaffenheit des Blutes und der Milz beim neugeborenen Hunde.

Folia Haematologica, **28** (2), S. 95 - 152

Tizard, I. R. (2008):

Veterinary Immunology: An Introduction.

Saunders Verlag. St. Louis

Toman, M.; Faldyna, M.; Knotigova, P.; Pokorova, D.; Sinkora, J. (2002):

Postnatal development of leukocyte subset composition and activity in dogs.

Veterinary Immunology and Immunopathology, **87** (3 - 4), S. 321 - 326

Untersmayr, E.; Jensen-Jarolim, E. (2006):

Mechanisms of type I food allergy.

Pharmacology & Therapeutics, **112** (3), S. 787 - 798

Verlinden, A.; Hesta, M.; Millet, S.; Janssens, G. P. J. (2006):

Food Allergy in Dogs and Cats: A Review.

Critical Reviews in Food Science and Nutrition, **46** (3), S. 259 - 273

von Hertzen, L. C.; Savolainen, J.; Hannuksela, M.; Klaukka, T.; Lauerma, A.; Makela, M. J.; Pekkanen, J.; Pietinalho, A.; Vaarala, O.; Valovirta, E.; Vartiainen, E.; Haahtela, T. (2009):
Scientific rationale for the Finnish Allergy Programme 2008-2018: emphasis on prevention and endorsing tolerance.

Allergy, **64** (5), S. 678 - 701

Vroom, M. W. (1994):

Prospective-Study of a Commercial Hypoallergenic Diet Given to 18 Dogs with Food Allergy.

Tijdschrift Voor Diergeneeskunde, **119** (20), S. 602 - 604

Walport, M.; Travers, P.; Murphy, K. M. (2009):

Janeway Immunologie.

Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg

Walton, G. S. (1967):

Skin responses in dog and cat to ingested allergens-Observations on 100 confirmed cases.

Veterinary Record, **81** (27), S. 709 - 713

Wassom, D. L.; Grieve, R. B. (1998):

In vitro measurement of canine and feline IgE: a review of Fc epsilon R1 alpha-based assays for detection of allergen-reactive IgE.

Veterinary Dermatology, **9** (3), S. 173 - 178

Watabe, A.; Fukumoto, S.; Komatsu, T.; Endo, Y.; Kadosawa, T. (2011):

Alterations of lymphocyte subpopulations in healthy dogs with aging and in dogs with cancer.

Veterinary Immunology and Immunopathology, **142** (3 - 4), S. 189 - 200

Weber, M.; Martin, L.; Biourge, V.; Nguyen, P.; Dumon, H. (2003):

Influence of age and body size on the digestibility of a dry expanded diet in dogs.

Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, **87** (1 - 2), S. 21 - 31

Weißer, I.; Knappen, F.; Schrank, H.; Klupp, H. (1971):

Das Blutbild der englischen Beagle-Hunde in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht.

Arzneimittel-Forschung, **21** (11), S. 1703 - 1706

White, S. D. (1998):

Food allergy in dogs.

Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, **20** (3), S. 261 - 268

Williams, D. L. (1997):

Studies of canine leucocyte antigens: a significant advance in canine immunology.

Veterinary Journal, **153** (1), S. 31 - 39

Yamka, R. M.; Jamikorn, U.; True, A. D.; Harmon, D. L. (2003):

Evaluation of soyabean meal as a protein source in canine foods.

Animal Feed Science and Technology, **109** (1 - 4), S. 121 - 132

Yang, T. J.; Gawlak, S. L. (1989):

Lymphoid organ weights and organ: body weight ratios of growing beagles.

Laboratory animals, **23** (2), S. 143 - 146

Yesilbag, K.; Yilmaz, Z.; Özkul, A.; Pratelli, A. (2007):

Aetiological role of viruses in puppies with diarrhoea.

Veterinary Record, **161** (5), S. 169 - 170

Zanatta, C. P.; Felix, A. P.; Brito, C. B. M.; Murakami, F.; Sabchuk, T. T.; Oliveira, S. G.; Maiorka, A. (2011):

Digestibility of dry extruded food in adult dogs and puppies.

Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia, **63** (3), S. 784 - 787

Zemann, B.; Schwaerzler, C.; Griot-Wenk, M.; Nefzger, M.; Mayer, P.; Schneider, H.; Weck, A. d.; Carballido, J. M.; Liehl, E. (2003):

Oral administration of specific antigens to allergy-prone infant dogs induces IL-10 and TGF- β expression and prevents allergy in adult life.

Journal of Allergy and Clinical Immunology, **111** (5), S. 1069 - 1075

Zhang, J. S.; Shi, J.; Ilic, S.; Xue, S. J.; Kakuda, Y. (2009):

Biological Properties and Characterization of Lectin from Red Kidney Bean (*Phaseolus Vulgaris*).

Food Reviews International, **25** (1), S. 12 - 27

Zuo, Y.; Fahey, G. C.; Merchen, N. R.; Bajjalieh, N. L. (1996):

Digestion responses to low oligosaccharide soybean meal by ileally-cannulated dogs.

Journal of Animal Science, **74** (10), S. 2441 - 2449

9. ANHANG

9.1. Publikationsverzeichnis

Kröger, S.; Philipp, P.; Zentek, J.

Effects of different protein sources (single vs. mixed protein) on the immune response in newborn and weaned puppies.

Proceedings of the 16th ESVCN-Congress; Bydgoszcz, Poland, 13.-15.09.2012; S. 62

ISBN: 978-83-921732-2-9

9.2. Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jürgen Zentek danke ich herzlich für die Vergabe dieses interessanten Promotionsthemas und die stete freundliche und hilfsbereite Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Susan Kröger die für Fragen stets ein offenes Ohr hatte und mir auch mit Rat und Tat zur Seite stand.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Tierernährung, insbesondere Petra Huck, möchte ich meinen Dank für die Einführung in die Durchflusszytometrie und die hervorragende Zusammenarbeit im Labor aussprechen. Auch Anett Kriesten, Katharina Topp und Luisa Rode möchte ich für die Einführung in die Analytik danken.

Desweiteren gilt den Tierpflegern Corinna Schmidt, Ines Bebert und Sandra Fischer meine Dankbarkeit für die liebevolle Betreuung der Hundewelpen.

Thomas Brenten danke ich für die Bereitstellung der zahlreichen Hühnerherzen.

Der Klinik für Reproduktion der Tierärztlichen Hochschule Hannover, insbesondere Frau Prof. Dr. Anne-Rose Günzel-Apel, möchte ich für die Bereitstellung des caninen Spermas zur künstlichen Besamung der Hündinnen danken.

Der Tierklinik für Fortpflanzung (FU-Berlin), insbesondere Dr. Sebastian Arlt, Peggy Haimerl und Britta Maeder danke ich für die Durchführung der Deckterminbestimmungen, der künstlichen Besamung und der Geburtsüberwachung.

Der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere (FU-Berlin) danke ich für die Messung des hämatologischen und differentialdiagnostischen Blutbildes.

Meiner Büronachbarin Karin Herzog möchte ich für die unterhaltsame Zeit, die Aufmunterungen und die tatkräftige Unterstützung danken.

Nicht zuletzt danke ich meinem Freund für den Rückhalt in schwierigen Zeiten und meinen Eltern und Großeltern für die unermüdliche und immerwährende Unterstützung während der gesamten Studienzzeit und bei der Durchführung dieser Arbeit.

9.3. Selbständigkeitserklärung

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

Berlin, den 07.02.2013

Patricia Philipp