

Aus dem Klinisches Department für Nutztiere und Sicherheit von Lebensmittelsystemen  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Zentrum für Tierernährung und Tierschutzwissenschaften  
Leitung Prof. Dr. Quendrim Zebeli  
(Leitung Assoziierte Professorin Dr.<sup>in</sup> rer. agr. Susanne Kreuzer-Redmer)

## Effekte von "OMNI BIOTIC® PANDA" auf die Proliferation von regulatorischen T-Zellen im Schwein

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Hanna Marlene Schneeweiß

Wien, im Februar 2024

Wissenschaftliche Betreuerin: Assoziierte Professorin Drin. rer. agr. Susanne Kreuzer-Redmer, Klinisches Department für Nutztiere und Sicherheit von Lebensmittelsystemen, Zentrum für Tierernährung und Tierschutzwissenschaften, Arbeitsgruppe Nutrigenomik

2. Gutachter: Dr. rer. nat. Torben Redmer, Department für Biologische Wissenschaften und Pathobiologie, Zentrum für Pathobiologie, Abteilung für Labortierpathologie, Veterinärmedizinische Universität Wien

## Inhaltsverzeichnis

Abstract .....	5
1. Literaturübersicht und Fragestellung.....	6
1.1 Schweineproduktion in Österreich .....	6
1.2 Antibiotika in der Schweineproduktion.....	8
1.3 Probiotika .....	11
1.4 Omni Biotic® PandA.....	13
1.5 Der Mensch als Modell für porcine Ernährungsphysiologie.....	18
1.6 Fragestellung .....	19
2. Methoden.....	20
2.1 Zellisolation und Behandlung .....	20
2.2 Versetzung der Zellen mit Antikörper für die Fluoreszenzmikroskopie .....	21
2.3 EVOS Cell Imaging.....	22
2.4 qPCR .....	225
2.5 Statistik .....	27
3. Ergebnisse .....	28
3.1 Expression von CD4 und CD25.....	28
3.2 Genexpression von CD25 und Forkhead-Box-Protein P3 (FOX P3) .....	33
4. Diskussion.....	37
4.1 CD4+CD25+FOX P3+-T-Zellen .....	37
4.2 OBP® führt zu einer Immunmodulation .....	40
4.3 Praktische Implikationen .....	41
5. Conclusio .....	41
6. Anhang .....	42
6.1 Abkürzungsverzeichnis .....	43
6.2 Abbildungsverzeichnis.....	44
6.3 Tabellenverzeichnis .....	44
Literatur.....	45

## **Danksagung**

Ich möchte an Dr. med. vet. Lukas Schwarz, Univ.-Prof<sup>in</sup>. Dr<sup>in</sup>. med. vet. Andrea Ladinig Dipl. ECPHM, Andrea Müllbner MSc. sowie Veronika Strasser BSc für die Unterstützung dieses Projektes meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr<sup>in</sup> rer. agr. Susanne Kreuzer-Redmer, Ass.-Prof<sup>in</sup>, deren außerordentliche Geduld, Motivation und Hilfsbereitschaft die Umsetzung dieser Arbeit möglich gemacht hat.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Studienkollegin, Projektpartnerin und Freundin Mag. Anna Fremuth bedanken, die mir bis zum Ende meiner Diplomarbeit stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

## Abstract

**Hintergrund:** Antibiotikaresistenzen sind eine wachsende Bedrohung für unser Gesundheitssystem, gleichzeitig war bzw. ist die Anwendung von antibakteriellen Substanzen für die Nutztierwirtschaft unumgänglich. Alternativen wie Probiotika sind deshalb notwendiger denn je. OMNI BIOTIC® PANDA (OBP) ist ein Probiotikum aus der Humanmedizin, was unter anderem zu einer vermehrten Proliferation von regulatorischen T-Zellen führen soll.

**Methoden:** Es wurden isolierte Zellen aus peripher entnommenen Schweineblut (n=4) in mit OBP inkubiert. Insgesamt gab es drei Ansätze: (1) PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells), entspricht 500 µl PBMC + 500 µl Medium; (2) Leerwert, entspricht 100 µl Standard + 50 µl Standardlösung; (3) 1:2, entspricht 500 µl PBMC + 500 µl OBP. Die Zellen wurden für die Fluoreszenzmikroskopie mit Antikörpern für die Erkennung T-Zell-spezifischer Oberflächenproteine CD4 und CD25 versetzt und per Programm ImageJ® ausgezählt. Die Genexpression für CD25 und FOX P3 wurde mittels qPCR gemessen.

### Ergebnisse:

**Fluoreszenzmikroskopie:** Im Durchschnitt aller Schweine lässt sich ein deutlicher prozentueller Anstieg von CD4+-Zellen sehen und ein geringer prozentueller Abstieg von CD25+-Zellen der behandelten Zellen im Vergleich zum Kontrolldurchgang. Es gibt individuelle Unterschiede. Bei Schwein 1 gibt es einen geringeren Anteil von CD4+- und CD25+-Zellen, bei Schwein 2 und 4 steigen die Anteile beider Zellkategorien der behandelten Zellen. Bei Schwein 3 steigt der Anteil der CD4+- Zellen, aber der Anteil der CD25+-Zellen sinkt. Die Unterteilung der CD25 Oberflächenproteine in CD25 high und dim lässt keine Regel erkennen.

**qPCR:** Die behandelten Zellen zeigen im Durchschnitt im Vergleich mit den unbehandelten eine höhere Genexpression für FOX P3 und CD25. Auffällig ist, dass die behandelten Zellen von Schwein 1 in der Fluoreszenzmikroskopie und in der qPCR einer Verringerung in allen Markern zeigt.

**Conclusio:** Die erhobenen Ergebnisse deuten auf eine geänderte Antwort des T-Zell basierenden Immunsystems durch eine OBP-Behandlung hin. Vollendes kann jedoch nicht behauptet werden, dass OBP® zu einer vermehrten Proliferation von porzinen regulativen T-Zellen führt. Dafür bedarf es Folgeversuche mit einer größeren Stichprobenanzahl und optimiertem Versuchsdesign. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern dafür eine wichtige Basis.

## 1. Literaturübersicht und Fragestellung

### 1.1 Schweineproduktion in Österreich

#### Übersicht zur Schweineproduktion

Nach dem 2. Weltkrieg erlebten die Schweinebestände in Österreich bis 1995 eine starke Zunahme, seither ist eine abnehmende Tendenz zu erkennen (Abb. 1 und Abb. 2) (1).

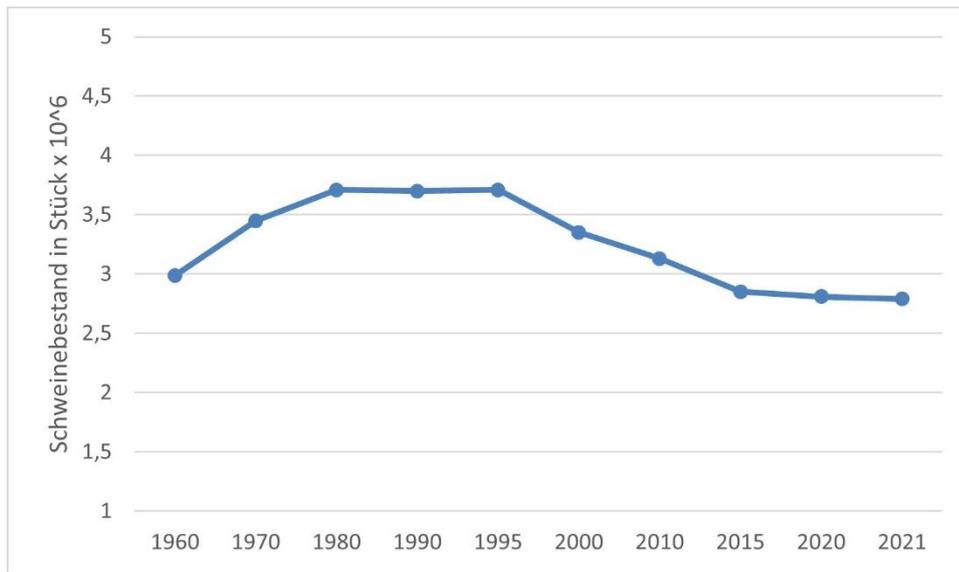


ABBILDUNG 1: ENTWICKLUNG DES SCHWEINEBESTANDS IN ÖSTERREICH (1)

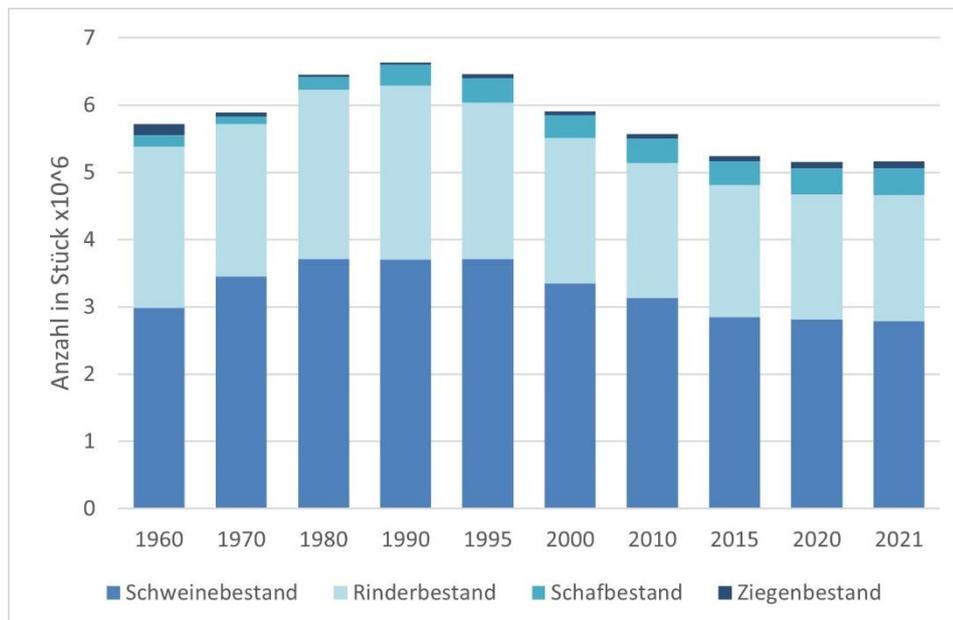


ABBILDUNG 2: ENTWICKLUNG DER VIEHBESTÄNDE IM VERGLEICH (1)

Der abfallende Trend lässt sich auch im Fleischanfall beobachten (Tabelle 1). Die weltweit am meisten konsumierte Fleischart ist Schweinefleisch. Für das Jahr 2023 prognostizierte die USDA (Landwirtschaftsministerium der Vereinigten Staaten) einen weltweiten Verbrauch von Schweinefleisch in der Höhe von 110 Millionen Tonnen (Abb. 3).

Tiergattungen	2016	2017	2018	2019	2020
Pferdefleisch <sup>7</sup>	116	110	134	120	90
Rindfleisch	228.335	226.859	233.723	229.907	216.183
darunter Kalbfleisch	6.073	5.729	5.643	5.569	5.606
Schweinefleisch	514.892	508.494	509.573	503.971	504.439
Schaffleisch	6.267	6.011	6.672	6.961	6.464
Ziegenfleisch	712	552	657	573	639

TABELLE 1: FLEISCHANFALL IN TONNEN 2016 BIS 2020 (98)



ABBILDUNG 3: KONSUM VON FLEISCH WELTWEIT NACH FLEISCHART IN DEN JAHREN 2012 BIS 2023 (102)

### Problematik in der Schweineindustrie

Um die Effektivität und Profitabilität eines Schweinebetriebs zu steigern, werden Saugferkel teilweise bereits mit 3 Wochen von der Muttersau getrennt und abgesetzt obwohl das durchschnittliche Absatzalter unter natürlichen Umständen erst mit 17 Wochen stattfindet (2, 3). In dieser Phase sind die Tiere durch diverse Stressfaktoren und verschiedene Belastungen des Immunsystems prädisponiert für Krankheiten und Leistungsdepression. Diverse Faktoren, wie die frühe Trennung von der Muttersau, die Bildung neuer sozialer Gruppen und damit einhergehende Rankämpfe, sowie die plötzliche Umstellung von leicht verdaulicher flüssiger Saumilch auf solides, rein pflanzliches Futter schwächen das Immunsystem und führen neben einer Dysbiose auch oft zu Anorexie. Zusätzlich verlieren

die Ferkel zunehmend den Schutz der maternalen Antikörper. Um dem Problem entgegenzuwirken haben sich in der Praxis einige optimierte Managementmaßnahmen etabliert. Dazu zählen fließende Übergänge zwischen den Phasen, ausgewogene und altersentsprechende Inhaltsstoffe, sowie eine frühzeitige Anfütterung der Ferkel ab dem 5.-10. Lebenstag (4). Nichtsdestotrotz gilt das Absetzen als die kritischste Lebensphase bei Schweinen welche besonders hohe Mortalitätsraten und stark geschwächte Tiere zeichnet .

### **Durchfall bei Absatzferkeln**

Durchfallerkrankungen zählen zu den ökonomisch bedeutendsten Faktoren in Schweinebetrieben und sind bei Absatzferkeln häufig auftretende Darmerkrankungen. Neben den physiologischen und gastrointestinalen Faktoren zählt die Veränderung bzw. Dysbalance des Mikrobioms zu den Hauptursachen von Absatzdurchfall (post weaning diarrhoea, PWD). Die gastrointestinalen Mikroorganismen bilden ein komplexes Ökosystem und eine dynamische Zusammensetzung, welche sich im Laufe des Absetzens und der Futterumstellung verändert. Es wird angenommen, dass durch die Dysbiose die schützende Schleimschicht des Darmepithels gestört wird und sie so anfälliger für Pathogene macht (3). Es konnte bestätigt werden, dass *Enterotoxische E. coli* (ETEC) die Hauptursache für PWD ist; allerdings gab es auch häufige Fälle von PWD in denen ETEC nicht in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden konnte (5). Rotavirale Enteritis wird ebenfalls mit PWD in Verbindung gebracht (6), konnte jedoch, gemeinsam mit *Escherichia coli* (E.coli), auch in den Fäkalien von durchfallfreien Ferkeln isoliert werden. Dadurch wird der multifaktorielle Hintergrund und das Zusammenspiel infektiöser und nicht infektiöser Komponenten zur Entwicklung von PWD verdeutlicht (7). Klassische morphologische Veränderungen für PWD sind Zottenatrophie und Hyperplasie der Krypten im Dünndarm (8), welche die Nährstoffaufnahme des Darms deutlich vermindern. Zusätzlich wird durch die Entzündung das Darmepithel durchlässiger und folglich Flüssigkeitsverlust verursacht (3, 9). Durch verbessertes Management, wie Gesundheitsmanagementsysteme und Hygieneprogramme konnte der Gesundheitsstatus der Schweine in modernen Schweinebetrieben verbessert werden. Dennoch führt PWD weiterhin zu hohen wirtschaftlichen Verlusten, welche sich aus Mortalität, Morbidität und Kosten der Therapie zusammensetzen und stellt auch aus Tierschutzaspekten ein massives Problem dar (10, 11).

### **1.2 Antibiotika in der Schweineproduktion**

Die Nutzung von Antibiotika ist essenziell für die Prävention, Kontrolle und Therapie von bakteriellen Krankheiten in der Human- und Veterinärmedizin. Um die Entwicklung eines Bestandsproblems einzudämmen wurde bzw. wird Antibiotikum, meist schon vor einer

Diagnosestellung, prophylaktisch und/oder metaphylaktisch angewendet (12, 13). Bereits der Zusatz von sub-therapeutischen Mengen, also Dosen unter der Minimum inhibitory concentration (MIC), führt zu schnelleren Gewichtszunahmen der Tiere und war lange Zeit eine Standardmethode, um einen wirtschaftlichen Vorteil zu generieren (14, 15). Es wurden verschiedene mögliche Mechanismen diskutiert, die erklären sollen, wie Antibiotikafutterzusatz (antibiotic growth promoter, AGPs) das Wachstum von Tieren fördert. Verschiedene Hypothesen beinhalten eine direkte und indirekte Interaktion und Modulation des Darmmikrobioms (16), den Schutz vor Pathogenen und deren Virulenzfaktoren (17, 18). Dazu zählen eine Verringerung der Gesamtzahl der Mikroorganismen im Verdauungstrakt, eine Unterstützung eines günstigeren mikrobiellen Gleichgewichts, eine reduzierte Produktion toxischer Stoffwechselprodukte und eine verbesserte Nährstoffaufnahme durch eine dünnere Darmschleimhaut (17). Infolgedessen kommt es zu einer effizienteren Verwertung des Futters und wiederum zu einem vermehrten Wachstum der Nutztiere (16, 17). Zusätzlich sollen AGPs die negativen Auswirkungen entzündeter Zellen im Darm abschwächen und die Immunantwort beeinflussen können (17, 19). Einige Studien kamen zu widersprüchlichen Ergebnissen über die Leistung von AGPs (20) und so sind die genauen Mechanismen wie Antibiotikum zur Leistungsförderung kommt noch nicht vollends geklärt.

### **Antibiotikaresistenzen im Zusammenhang mit AGPs**

Früher wurden dieselben Wirkstoffgruppen von antimikrobiellen Agenden sowohl in der Landwirtschaft zur Wachstumsförderung von lebensmittelliefernden Tieren als auch in der Humanmedizin als therapeutisches Mittel verwendet. Fluorchinolone und Sulfonamide waren aufgrund ihres breiten Spektrums sowohl gegen grampositive als auch gramnegative Mikroorganismen die am häufigsten verwendeten antimikrobiellen Wirkstoffe zur Wachstumsförderung und zur Behandlung von Infektionen (21). Avoparcin, ein Glycopeptid, wurde in großem Umfang als Leistungspromotor für Nutztiere verwendet. Als Avoparcin-resistente Entereococci nachgewiesen werden konnten (22), wurde Avoparcin zunächst in Dänemark, dann EU weit als AGP verboten (16, 23). Weitere Studien mit resistenten Enterokokken, welche aus Tierfäkalien und aus tierischen Lebensmitteln isoliert wurden, zeigten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Verwendung von AGPs und einer hohen Resistenz gegen medizinisch wichtige Antibiotika (24–26). Antibiotikaresistente Bakterien können direkt und indirekt, wie über Fleisch, Wasser, Luft, Boden etc. vom Tier auf den Menschen übertragen werden. Darüber hinaus kommt es auch zu einer Verunreinigung der Umwelt, da Antibiotika von den Tieren im Darm nur schlecht aufgenommen werden können und teilweise unverändert mit Kot und Urin ausgeschieden werden (27). Weitere

Einschränkungen und Verbote von AGPs folgten, bis 2006 schließlich ein komplettes Verbot von Antibiotika als Wachstumsförderer veranlasst wurde (28).

### Entwicklung nach dem Antibiotikaverbot als Wachstumsförderer

Nach dem EU-weiten Verbot, von gewissen AGPs (Avoparcin, Bacitracin, Spiramycin, Tylosin, Virginiamycin) im Jahr 1999, scheint es so, dass sich der Pool von antibiotikaresistenten Genen von fäkalen Enterokokken in Tieren insgesamt verringert (23, 29), jedoch auf Kosten des Wohlergehens der Tiere. Nicht nur seien die Morbiditäts- und Mortalitätsraten aufgrund von bakteriellen Infektionen v.a. bei Absatzferkeln tendenziell wieder gestiegen (30), zusätzlich würde nun auch mehr Antibiotikum zu therapeutischem Zweck verwendet werden müssen. Hier werden die gleichen Wirkstoffgruppen in der Humanmedizin verwendet, was wiederum ein Gesundheitsrisiko in Bezug auf Resistenzentwicklung darstellen könnte. Tetrazykline stehen mit 19,30 Tonnen (49,4%) an erster Stelle der vertriebenen Antibiotika, gefolgt von Penicillinen mit erweitertem Spektrum. Die vorwiegende Anwendungsform (81%) sind oral gegebene Präparate. Die wichtigsten Wirkstoffgruppen in der Humanmedizin („Antibiotika von allerhöchster Bedeutung“) sind laut WHO Makrolide, Fluorchinolone, 3. und 4. Generation von Cephalosporinen (Abb. 4). Laut

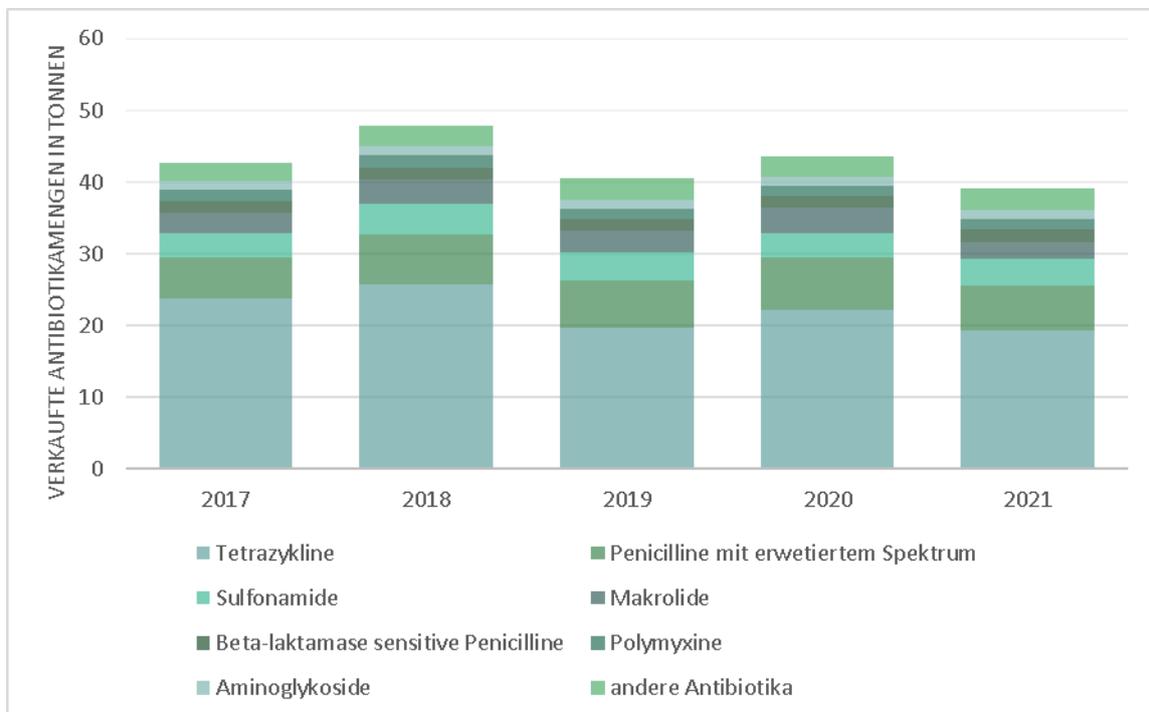


ABBILDUNG 4: VERKAUFTE ANTIBIOTIKA-MENGEN IN DER VETERINÄRMEDIZIN NACH WIRKSTOFFGRUPPEN FÜR DIE JAHRE 2017-2021 IN TONNEN (103)

einigen Studien lässt sich bereits ein Trend von ansteigenden Resistenzen für diverse Antibiotikaklassen, welche therapeutisch genutzt werden, beobachten (29, 31, 32). Bis jetzt konnte noch keine Alternative mit einer vergleichbaren potenten Wirkungsweise zu Antibiotikum gefunden werden. Aber es gibt vielversprechende Produkte, um das Ausmaß von PWD unter Kontrolle zu halten. Umso wichtiger ist es die genauen Mechanismen von Antibiotikum als Leistungsförderer zu analysieren, um gleichrangige Alternativlösungen zu finden.

### 1.3 Probiotika

Probiotische Produkte generieren systemische Vorteile für den Wirt und werden bei der Therapie verschiedener Beschwerden und Krankheiten genutzt. Die positiven Eigenschaften konnten zur Behandlung von Allergien, Durchfall, entzündliche Darmerkrankungen (inflammatory bowel disease, IBD), Reizdarm (irritable bowel syndrome, IBS), Infektionen, Säuglingsskoliken (33), sowie bestimmten Krebsformen (34) nachgewiesen werden. Auch Patienten, welche mit Breitbandantibiotika behandelt werden, können von der Aufnahme von Multispezies-Probiotika profitieren, indem die Wiederherstellung einer gesunden Darmflora unterstützt wird (35).

#### Definitionen

**Probiotika** werden von der FAO/WHO wie folgt definiert: „lebende Mikroorganismen, die, wenn sie in ausreichender Menge verabreicht werden, einen gesundheitlichen Nutzen für den Menschen haben“ (36). Probiotische Produkte kommen sowohl in der Veterinär-, als auch Humanmedizin regelmäßig zum Einsatz. Gegenwärtig werden sowohl Hefe wie z.B. *Saccharomyces boulardii*, als auch Bakterien als Probiotika verwendet. Zu den häufigsten verwendeten Bakterien zählen vor allem *Lactobacillus* und *Bifidobacterium*, aber auch *Propionibacterium*, *Bacillus* und *Escherichia coli* (37). Bei diesen Produkten kann es sich um vorkommende oder genetisch veränderte Mikroben handeln. In Lebensmitteln kommen ausschließlich natürlich gewonnen Mikroben vor (37). Dabei sollen Bakterienstämme dem physiologischen Mikrobiom entsprechen und dem Wirtsorganismus möglichst angepasst sein. Dafür werden die meisten heute verwendeten probiotischen Futtermittelkeime aus den Därmen gesunder Jungtiere isoliert (38).

**Prebiotika** sind „spezifische unverdauliche Stoffe, die selektiv Bifidobakterien und möglicherweise auch andere Mikroorganismen in ihrem Wachstum im Darm fördern“ (39). In der Regel handelt es sich um nicht verdauliche Kohlenhydrate, die, wenn sie zusammen mit Probiotika verwendet werden, als **Synbiotika** bezeichnet werden und die Lebensfähigkeit der Probiotika verbessern können (40).

### **Vor- und Nachteile von Probiotika-Einsatz in Schweinebetrieben**

In Hinblick auf PWD gibt es zahlreiche Studien, welche die Effekte von Antibiotika und Probiotika auf die erkrankten Ferkel vergleichen. Viele Studien kommen zum Ergebnis, dass Antibiotika zwar eindeutig die effektiveren Ergebnisse erzielen, Probiotika aber ebenfalls einen positiven Einfluss auf Durchfallreduktion, Futteraufnahme und Gewichtszunahmen haben (41, 42). Probiotika können die Wachstumsleistung steigern, indem sie die Nährstoffverdaulichkeit und die Struktur des Mikrobioms verbessern, das osmotische Gleichgewicht fördern und pathogene Bakterien reduzieren. So tragen sie zu Remission von Durchfallerkrankungen bei (42). In einigen Studien wird auch eine Förderung des Immunsystems behauptet (43), das konnte in einer Metaanalyse von Xu (42) aber nicht bestätigt werden.

Die meisten Studien berichten von positiven Effekten bei Untersuchungen des Einflusses von Probiotika auf den Organismus oder zur Schwächung von Pathogenen. Es ist jedoch zu bedenken, dass es zu einer Verzerrung der positiven Ergebnisse kommen kann, da oft kein industrielles Interesse an der Veröffentlichung neutraler oder negativer Ergebnisse besteht (44). Speziell bei der Anwendung bei Lebewesen mit einer bereits gestörten Darmbarriere, verringerter Darmgesundheit sowie erhöhtem Erregerdruck müssen potenzielle Risiken bedacht werden. Durch eine erhöhte Darmpermeabilität, wie sie vermehrt bei Absatzferkeln vorkommt, kann es zu einer leichteren Translokation von Darmbakterien in die Blutbahn und in weiterer Folge zur Sepsis kommen. Die Verwendung von Probiotika kann die Permeabilität des Darms sogar weiter erhöhen (45). Folglich könnte ein noch höheres Sepsis-Risiko bei Tieren nach dem Absetzen prognostiziert werden, wenn Probiotika verwendet werden (46). Des Weiteren wurde berichtet, dass Probiotikum eine immunsupprimierende Wirkung haben kann (47). Das mag bei gesunden Tieren vernachlässigbar sein, bei bereits geschwächten Tieren hingegen ist eine schnelle Immunantwort erforderlich und kann so Nachteile haben (48). Zusätzlich konkurriert die gastrointestinale Mikroflora mit dem Wirt um Nährstoffe, stimuliert einen schnelleren Zellaustausch von Epithelzellen, erfordert eine erhöhte Schleimsekretion und kann, durch die Stimulation der Immunsystems-Entwicklung, eine Entzündungsreaktion hervorrufen. All diese Vorgänge können zu Leistungseinbußen des Tieres führen (16).

#### 1.4 Omni Biotic® PandA

Omni Biotic PandA ist ein Multispezies-Probiotikum, welches sich speziell an schwangere Personen aus Hochrisikofamilien für Allergien richtet. Bei Gabe von einem Beutel täglich (=  $4 \times 10^9$  CFU) in den letzten Schwangerschaftsmonaten und im ersten Lebensjahr soll die Entwicklung atopischer Erkrankungen signifikant reduziert werden.

Das Probiotikum setzt sich aus 4 Bakterienstämmen des menschlichen Darms zusammen:

- *Lactococcus lactis* W58 (*L. lactis*)
- *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (*B. lactis*) W52
- *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* W51
- *Bifidobacterium bifidum* W23 (*B. lactis*)

Pro Beutel befindet sich eine Konzentration von  $4 \times 10^9$  Bakterien.

=  $1 \times 10^9$  *L. lactis* W58

=  $1 \times 10^9$  *B. lactis* W52

=  $1 \times 10^9$  *B. lactis* W51

=  $1 \times 10^9$  *B. bifidum* W23

Das Produkt soll eine immunologische Dysbalance zwischen T-Zellen (Th1- und Th2-Zellen) ausgleichen, um zu verhindern, dass diese an das Kind weitergegeben wird und so signifikant Allergien vorbeugen. Dabei wird von einer Reduktion von 80% bei allergischen Erkrankungen berichtet, welche auch nach Einnahme des Probiotikums bei einem 2-Jahre-Follow-up erhalten blieb (49). Bei den Schwangeren verringerte die Einnahme gastrointestinale Beschwerden und Juckreiz (50, 51).

#### **Dysbalance zwischen Th1 und Th2-Zellen und regulatorische T-Zellen**

In den vergangenen Jahrzehnten stieg die Prävalenz von allergischen Erkrankungen konsequent an, sodass laut Schätzungen im Jahr 2040 jede zweite Person in Europa an einer Allergie leiden wird. Laut der Hygiene-Hypothese lässt sich diese Entwicklung auf übermäßige Hygiene und „Convenience Food“, also vorgefertigte Nahrungsmittel, zurückführen. Damit verbunden ist eine zu geringe Exposition zu mikrobiellen Antigenen. Das darmassoziierte Immunsystem („gut-associated lymphoid tissue“, GALT) beheimatet, wegen seiner großen Oberfläche, 80% aller antikörperproduzierender Zellen und hat damit eine besondere Bedeutung für die Steuerung des Immunsystems. T-Lymphozyten (T-Helferzellen) produzieren kleine Peptidmoleküle, Zytokine, welche für die Regulierung

zuständig sind. Dabei bilden **Th1-Zellen** Interleukin-2 (IL-2) und Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) für intrazelluläre Infektionen und **Th2-Zellen** IL-4, IL-5 und IL-13 für extrazelluläre Vorgänge. Während Th1- und Th2-Zellen ihre eigene Vermehrung stimulieren, hemmen sie die gegenseitige Entwicklung, wodurch schließlich ein Gleichgewicht entsteht (49).

Wenn es an einem kritischen Punkt in der Entwicklung eines Säuglings keine bzw. zu wenig infektiöse Exposition gibt, wird angenommen, dass keine Verschiebung von einem ungünstigen Th2-dominierten Gleichgewicht zu einem günstigeren Th1-dominierten Gleichgewicht stattfindet. Infolgedessen besteht ein größeres Risiko für die spätere Entwicklung einer allergischen Erkrankung (52, 52). Der Zusammenhang zwischen einer Th2-Dominanz und dem Auftreten von Atopien ist schon lange bekannt. Durch das verschobene Verhältnis kommt es zur übermäßigen Zytokinproduktion, Bildung von Immunglobuline E (IgE) und zur Aktivierung eosinophiler Granulozyten (53).

**T-regulatorische Zellen** (Tregs, früher T-Suppressor-Zellen) können derartige Vorgänge durch die Sekretion von IL-10 unterdrücken. Tregs exprimieren die Biomarker CD4, CD25 und Forkhead Box P3 (FOX P3) und spielen bei der Beendigung von Immunreaktionen und Suppression bzw. Prävention von potenziell schädlichen Aktivitäten (Allergien, Asthma, pathogenbedingten Immunpathologien, feto-maternale Toleranz und orale Toleranz) eine zentrale Rolle (49). Die Aktivierung von Tregs ist antigenspezifisch und somit ist die unterdrückende Wirkung dieser Zellen antigenabhängig. Das produzierte Zytokin IL-10 wirkt antiinflammatorisch. Durch dessen Sekretion wird der Organismus von einer selbstzerstörerischen übermäßigen Immunantwort geschützt und ist für die Entwicklung einer Immuntoleranz essenziell (54). Der Zusammenhang zwischen Autoimmunerkrankungen bei Menschen bzw. Tieren und ein Mangel an CD4<sup>+</sup> - CD25<sup>+</sup> -FOX P3<sup>+</sup> - Tregs oder ein Defekt der Suppressionsfunktion ist bereits bekannt. Experimentell konnten des Weiteren schwere Autoimmunerkrankungen (Thyreoiditis, Diabetes, IBD) bei Mäusen durch einen induzierten Tregs Mangel ausgelöst werden. In vitro konnte außerdem die Suppression der T-Zell Proliferation beobachtet werden. Diese Wirkung hat ebenfalls eine tragende Bedeutung in Bezug auf Krankheiten, die durch eine fehlerhafte T-Zell-Regulation ausgelöst werden. Zu diesen Autoimmunerkrankungen zählen die Entwicklung von Autoantikörpern, insulinabhängiger Diabetes, Thyreoiditis, Ekzemen, hämolytischer Anämie und IBD (55). Aktuell ist die zuverlässige Datenerhebung zu Tregs noch beschwerlich, da es keine klaren Richtlinien für die Identifizierung und Analyse von Tregs gibt. Bewährte Möglichkeiten sind

die Identifizierung des Oberflächenantigenmusters (CD4 - und CD25 - Oberflächenproteine) und der Nachweis des intrazellulären Transkriptionsfaktor FOX P3 (56).

### **Bakterienstämme in Omni Biotic Panda**

Milchsäurebakterien (*Lactic acid bacteria*, LAB) zählen zu den Hauptbakteriengruppen im Gastrointestinaltrakt (16) und sind gram-positive, unbewegliche, nicht sporenbildende, säuretolerante, anaerobe, stäbchenförmige oder kugelförmige Bakterien, die Milchsäure als wichtigstes Stoffwechselendprodukt der Kohlenhydratgärung produzieren (57). Hauptgattungen von LAB sind *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*, *Lactococcus spp*, *Lactosphaera spp*, *Leuconostoc spp*, *Melissococcus spp*, *Oenococcus spp*, *Pediococcus spp*, *Streptococcus spp*, and *Enterococcus spp*(43). LAB stellen durch ihre Eigenschaften eine vielversprechende Alternative zu Antibiotika dar. Sie sind bereits zu einem Großteil im vorhandenen Mikrobiom der Säugferkel vorhanden und in Hinblick auf die Linderung von PWD sind Milchsäure produzierende Bakterien gut geeignet, da diese durch die Fermentation und Senkung des pH-Werts das Wachstum der pathogenen Darmbakterien hemmen und die Immunität und Darmbarriere unterstützen (41, 58, 59). Sie unterstützen somit das mikrobielle Gleichgewicht im Darm. Des Weiteren produzieren LAB mikrobizide Substanzen, die ebenfalls gegen gastrointestinale Krankheitserreger und andere schädliche Mikroben wirken. Andere Wirkmechanismen sind die Konkurrenz mit Krankheitserregern um Bindungsstellen auf der Oberfläche der Darmepithelzellen und um Muzin (43).

### **Bakterienstämme von OMNI Biotic Panda in der Humanmedizin**

#### **BIFIDOBACTERIA**

*Bifidobakterien* kolonialisieren sich in den ersten Wochen postnatal rasant und stellen bei Säuglingen die am häufigsten vorkommenden Gruppe dar (60). Im Seniorenalter nimmt der Anteil wieder ab. Diese und andere Veränderungen des Mikrobioms werden als Ursache für eine erhöhte Infektionsanfälligkeit im hohen Alter gesehen (49). Bifidobakterien zählen mit *Lactobazillen* zu den wichtigsten probiotischen Bakterienstämmen, welche verschiedene gesundheitsfördernde Eigenschaften haben. Bei kommerzieller Verwendung wurden diverse therapeutische Eigenschaften beobachtet. Dazu zählen infektions-, entzündungs- und krebshemmende (z.B. Kolorektales Karzinom (61)) Wirkungen, Vorteile für die psychische und physische Gesundheit sowie immunmodulierende Effekte. Speziell bei gastrointestinalen Störungen wie nekrotisierender Enterokolitis, *Helicobacter pylori*-Infektionen und anderen chronischen Darmerkrankungen zeigt die Behandlung mit ***B. bifidum***- Stämmen gute Resultate. Eine weitere bemerkenswerte Eigenschaft ist ihre Fähigkeit, Enteropathogene zu verdrängen und mit ihnen zu konkurrieren. Die *B. bifidum* Kolonien können vertikal an den

Säugling weitergegeben werden, wenn die Besiedelung und Modulierung des mütterlichen Darms vor der Geburt gewährleistet ist (62). *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* ist eines der am meisten verbreiteten milchsäurebildenden Probiotika weltweit. Der Konsum von *B. lactis* zeigte sowohl bei Personen ohne Beschwerden, älteren Personen mit Verdauungsstörungen, als auch bei Personen mit IBS positive Auswirkungen auf die Stuhlfrequenz und -konsistenz. Es zeigte sich eine Verbesserung bei gastrointestinalen Symptomen und eine Beschleunigung der Magen-Darm-Passage. In Kombination mit anderen Probiotika konnte weicherer Stuhlgang beobachtet werden und könnte somit bei Verstopfung helfen. Die Wirkmechanismen dahinter werden bislang noch nicht vollends nachvollzogen. Da zwischen den Unterarten von *B. lactis* nur geringe genetische Unterschiede vorliegen und diese ähnlichen Effekte auf den Stuhlgang haben, wird eine genetische Komponente vermutet (63). Abgesehen von der Linderung der Symptome bei Darmerkrankungen helfen *Bifidobakterien*, sowie *Laktobazillen* ebenfalls bei Vaginalinfektionen und haben durch die Produktion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen einen positiven Einfluss bei Typ-1 Diabetes (64). Auch bei PatientInnen mit polyzystischen Ovarialsyndrom (PCOS) konnte eine Korrelation mit dem Darmmikrobiom und der hormonellen Dysbalance festgestellt werden. Zhang et al. (65) dokumentierte, dass *Bifidobacterium lactis* durch die Produktion von kurzkettigen Fettsäuren nicht nur einen positiven Einfluss auf den Gastrointestinaltrakt hat, sondern auch Sexualhormone über die Darm-Hirn-Achse modulieren kann und somit einen vielversprechenden Gegenstand für zukünftige Untersuchungen darstellt. Des Weiteren gibt es Studien, welche den Einfluss von *B. lactis* auf AlzheimerpatientInnen untersuchen. Es wurde bereits nachgewiesen, dass Alzheimer mit einer Veränderung des Mikrobioms einhergeht. In der Studie von Cao et al. (66) konnte bestätigt werden, dass *Bifidobacterium lactis* die Pathophysiologie von Alzheimer bei Mäusen lindern konnte.

### LACTOCOCCUS

*Lactococcus*-Arten werden in der Lebensmittelindustrie als Starterbakterien zur Herstellung von Sauerkraut und Milchprodukten wie Käse oder Joghurt genutzt, indem sie bei der Fermentation von Kohlenhydraten Lactat produzieren. *Lactococcus* zählen zu den homofermentativen Arten und wandeln Glucose fast ausschließlich in Milchsäure um, während heterofermentative Milchsäurebakterien, z. B. *Carnobacterium* oder *Leuconostoc*, auch andere Endprodukte, wie Ethanol, Essigsäure und Ameisensäure erzeugen (67). Abgesehen davon wird vermutet, dass *Lactococcus*-Stämme im humanen und tierischen

Mikrobiom vorhanden sind und positive Einflüsse in verschiedenen Bereichen haben kann. Die Effekte von *Lactococcus lactis* wurde vor allem als Multi-Stamm-Probiotika, gemeinsam mit diversen *Bifidobakterien*- und *Lactobacillus*-Unterarten getestet, jedoch ist bekannt, dass *L. lactis* in der Lage ist antimikrobielle Stoffe, wie Nisin, zu produzieren (68). Nisin ist ein Peptid aus der Gruppe der Lantibiotika, welches auf grampositive Bakterien bakteriostatisch bis bakterizid wirken kann (69). Als Multi-Stamm Probiotikum wurde vor allem von metabolischen und Herz-Kreislauf unterstützenden Einflüssen berichtet. Berichtet wurde von der Reduktion von arterieller Steifheit bei postmenopausalen übergewichtigen Frauen (70), der Senkung des Cortisolspiegels (64) und dem potentiellen positiven Einfluss auf Fettleibigkeit (68). Zudem ist *Lactococcus lactis* Teil intensiver Forschung in Bezug auf Krebs. Durch die Verfütterung von Katalase produzierenden *L. lactis* konnte bei Mäusen verhindert werden chemisch induzierten Dickdarmkrebs auszulösen. Der Wirkmechanismus dahinter soll die erhöhte Katalase-Produktion und damit verbundene gesteigerte antioxidative Aktivität sein, welche somit die Konzentration von freien Sauerstoffradikalen, welche Krebsfördernd wirken, senkt (71).

#### **Vergleich der Bakterienstämme von OMNI Biotic Panda zum Schwein** **BIFIDOBACTERIA**

Grundsätzlich zeigt sich bei einer Zugabe von Probiotika, vorrangig *Laktobazillen* und *Bifidobakterien*, bei PWD ein positiver Einfluss auf das gastrointestinale System. Eine wachstumsfördernde und durchfalllindernde Wirkung bei Absatzferkeln wurde in diversen Studien beschrieben (8). Durch ihre antioxidative Wirkung, wodurch *Laktobazillen* und *Bifidobakterien* auch bei IBD-erkrankten Menschen erfolgreich zum Einsatz kommen, können die Schäden durch oxidativen Stress bei PWD gelindert werden. Es wird davon ausgegangen, dass freie Sauerstoff Radikale unter anderem die Ursache für die PWD-typischen morphologischen Veränderungen und die gestörte Darmbarriere sind (72). Pang et al. (73) berichtete, neben einer verringerten Anzahl von *Helicobacter* und *Escherichia-Shigella*, von einer signifikant erhöhten Zottenhöhe im Duodenum bei mit *B. lactis* behandelten Absatzferkeln. In Bezug auf den Einfluss von *Bifidobakterium* auf das Immunsystem findet man widersprüchliche Ergebnisse. Während Pang et al. (73) zur Kontrollgruppe keine Unterschiede in der Zytokinproduktion feststellen konnte, berichtet Yao et al. (74) bei IBD-Erkrankten von einer Hemmung des Nekrosefaktor (NF)- $\kappa$ B – Signalwegs und so von einer Modulation des Immunsystems.

## LACTOCOCCUS

Durch die Produktion von antimikrobiellen Substanzen, wie Milchsäure, Bakteriozine und Wasserstoffperoxid, schützt *Lactococcus lactis* gegen die Besiedelung mit diversen Krankheitserregern, allen voran *E. coli*, welcher bei PWD eine wichtige Rolle spielt und so den Durchfall vermindert. Die Wachstumsfördernde Wirkung von *L. lactis* ist immer noch nicht vollends geklärt, da teilweise widersprüchliche Ergebnisse berichtet wurden. Yu et al. (75) berichtet von einer gesteigerten Wachstumsrate bei Absatzferkeln wenn *L. lactis* zugefüttert wurde. Eine Begründung dafür soll die, durch *L. lactis*, gesteigerte Produktion von *Gamma-Aminobuttersäure* (GABA) sein, was die Sekretion von wachstumsfördernden Hormonen induziert. In einigen Studien (76–78) wurde Wachstumsfaktoren-induzierendes- *L. lactis* (EGF-LL) getestet. Die Theorie hinter der wachstumsfördernden Wirkung ist, dass durch das frühe Absetzen Wachstumsfaktoren (*epidermale* Wachstumsfaktoren (EGF), Insulin, insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 und 2), welche über die Saumilch an die Ferkel weitergegeben würden, den Ferkeln vorenthalten werden (76). Bei der Zugabe von EGF-LL konnten höhere tägliche Gewichtszunahmen und sogar nach Absetzen des Probiotikums eine gesteigerte Wachstumsleistung beobachtet werden. Begründet wird diese Wirkung durch die geförderte Entwicklung des Dünndarms und die gesteigerte Proliferation von Epithelzellen. Dadurch ist eine bessere Nährstoffaufnahme und -verwertung gegeben (77). Hingegen wurde in einem Versuch mit Mäusen festgestellt, dass es zu einer verminderten Körpergewichtszunahme bei Zufütterung von *L. lactis* kam (79). Ein weiteres Ergebnis von Yu (75) ist ein, durch *L. lactis* induzierter, erhöhter *Serum-Aminosäurespiegel* (z. B. Tryptophan, Cystein). Dieser reguliert die Wachstumsleistung, intestinale Immunität und das Darmmikrobiom, was zusätzlich die wachstumsfördernde Wirkung von *L. lactis* unterstreicht. Tryptophan spielt außerdem eine wichtige Rolle in der Proliferation und Aktivierung von T-Zellen (80). Somit könnte die Zugabe von *L. lactis* die Immunzellen zur Abwehr pathogener Infektionen aktivieren und die intestinale Immunität unterstützen (75)

### 1.5 Der Mensch als Modell für porcine Ernährungsphysiologie

In der klinischen Forschung stehen der direkten Erforschung menschlicher Krankheiten oft Schwierigkeiten bei der Probenahme, umweltbedingte Einschränkungen und ethische Bedenken entgegen. Seit langem sind kleine Nagetiere wichtige Modelltiere für die medizinische Grundlagenforschung, die wesentlich zum Verständnis der Entstehung und Behandlung menschlicher Krankheiten beigetragen haben. Da Schweine jedoch eine größere anatomische und physiologische Ähnlichkeit zum Menschen zeigen, stellen diese ein attraktiveres Modell für Studien dar, welches sich weitgehend durchsetzt. So wurden

Schweine schon unter anderem in Untersuchungen für Stoffwechselsyndrome, Fettleibigkeit, Neurowissenschaften, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Nahrungsmittelallergien verwendet (60, 72, 81). Sowohl Menschen als auch Schweine werden als allesfressende Säugetiere eingestuft und haben Gemeinsamkeiten in Bezug auf den anatomischen und physiologischen Merkmalen des Magen-Darm-Trakts. Durch das ähnliche Verhältnis von Geschmacksknospen, die Größe der Kompartimente, die Wichtigkeit des Dickdarms als Hauptfermentationsort, sowie ein vergleichbarer Protein- und Fettstoffwechsel bietet sich das Schwein als gutes Modell an, um verschiedene ernährungswissenschaftlich relevante Bereiche zu untersuchen. Auch das vorherrschende Mikrobiom entlang des Gastrointestinaltrakts weist viele Gemeinsamkeiten bei Schwein und Mensch auf. Neben individuellen Unterschieden sind *Firmicutes* und *Bacteroidetes* in beiden Spezies als dominante Bakterienstämme vorherrschend, welche auch phylogenetische Ähnlichkeiten aufweisen. Zusätzlich gibt es Ähnlichkeiten in Bezug auf die Dynamik der postnatalen Reifung, der Vielfalt und Struktur des Mikrobioms. Dennoch unterscheiden sich die Hauptuntergruppen der Stämme, sowie die Anteile der verschiedenen Gattungen (zB. bei *Bifidobacterium*). Diverse anderen Faktoren wie Alter, Ernährung und Umwelt haben maßgeblichen Einfluss auf die Mikrobiom-Komposition und führen auch innerhalb einer Spezies zu erheblichen Unterschieden. Ungeachtet dieser Differenzen hat sich das Schwein als Modell für Ernährungsinterventionen etabliert und als erfolgreich gezeigt. So ist es möglich Forschungserkenntnisse von Schweinen auf den Menschen zu übertragen und umgekehrt (60).

### 1.6 Fragestellung

Um wirtschaftliche Verluste von Schweinebetrieben zu vermindern und das tierische Wohl zu steigern ist eine intakte Darmflora zur Verhinderung von Krankheitsausbrüchen erstrebenswert. Laut eigenen Angaben führt OBP zu einer Vermehrung von Tregs und gleicht so den Mangel regulatorischer T-Zellen und eine Th2- Zellen- Dominanz aus.

Die aufgestellte Hypothese lautet:

**OMNi-BiOTiC® PANDA ist in der Lage die Proliferation von T-regulatorischen Zellen im Schwein zu induzieren.**

Die formulierte Annahme betrifft einen in-vitro-Versuch. Es ist nicht möglich, unmittelbar den Schluss zu ziehen, dass ein Einsatz in der Schweinehaltung angebracht ist, ohne zusätzliche Forschungsarbeiten. Die durchgeführte Testreihe kann als eine explorative Untersuchung betrachtet werden.

## 2. Methoden

### 2.1 Zellisolation und Behandlung

Tag 1

#### **Blutentnahme**

Die Blutentnahme erfolgte an Übungsschweinen, die sich an der Schweineklinik der Veterinärmedizinischen Universität Wien befanden. In beiden Durchgängen handelte es sich um Tiere, die dem Forschungsgut Medau angehörten. Konkret handelte es sich um F1-Tiere, die aus der Kreuzung von Landrasse und Edelschwein stammten und ein Alter zwischen zwei und sechs Monaten hatten. In jedem Durchgang wurden Blutproben von jeweils vier Tieren genommen. Bei den Schweinen mit den Bezeichnungen S1 bis S4 wurden in Gruppe A 20 ml EDTA-Blut und in Gruppe B 30 ml EDTA-Blut entnommen. Die Blutentnahme erfolgte über die Vena jugularis, und die Proben wurden sofort auf Eis gelagert. Innerhalb von spätestens 30 Minuten nach der Entnahme wurde mit der Zellisolation begonnen.

#### **Zellisolation**

Das verwendete Medium zur Zellkultivierung (Cell cultivation medium, 500 mL RPMI Medium 1640 (1X) with L-Glutamine; Thermo Scientific) wurde mit 10 % Schweineserum (Gibco, USA) sowie 1 % Antibiotikum mit RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium mit L-Glutamin ohne Glucose) gemischt. Die Isolierung der PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Das Blut wurde im Verhältnis 1:2 mit PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) vermischt und dann in das mit Histopaque vorbereitete Falcon-Röhrchen gegeben. Das Verhältnis von Histopaque zur Blut-PBS-Mischung betrug 2:1. Anschließend wurde das Röhrchen ohne Bremsung für 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die mittlere Phase, die die PBMC enthielt, wurde behutsam abgetrennt und der Rest verworfen. Die Proben wurden mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 14 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet einmalig mit 1 ml Erylyse (Red Blood Cell Lysing Buffer Hybri-Max™, Sigma Cat. No R7757-100ML) behandelt. Die Behandlung wurde nach 5 Minuten gestoppt, indem die Proben erneut mit PBS aufgefüllt wurden. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand abgekippt und die Proben in 10 ml Medium suspendiert.

#### **Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahl wurde mittels eines bildbasierten Zellzählers (EVOS FL) aus einer 10 ml Zellsuspension ermittelt. Hierfür wurden 10 µl Trypanblau mit 10 µl gemischter Zellsuspension kombiniert. Von dieser Mischung wurden 10 µl in die Kammer eines Zellzählkammer-Slides pipettiert, um die Messung durchzuführen. Im Anhang sind

ausführliche Messwerte verfügbar. Um das Ziel von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml in 50 ml Zellkultivierungsmedium (500 mL RPMI Medium 1640 (1X) mit L-Glutamin; Thermo Scientific) zu erreichen, wurde die Zellsuspension verdünnt und entsprechend vorbereitet. Die Zellen wurden im Inkubator bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37°C für mindestens 18 Stunden gelagert.

### Tag 2

Die Zellzahlbestimmung wurde wiederholt.

#### Ansätze mit OMNi-BiOTiC® PANDA

Jeder Beutel enthält eine Bakterienkonzentration von  $3 \times 10^9$  Bakterien. Die Beutel wurden mit PBS für 10 Minuten aktiviert. Anschließend wurde die Lösung auf eine Zellkonzentration von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml verdünnt. Alle Proben wurden doppelt angesetzt.

#### 3 Ansätze

- PBMC (500 µl PBMC =  $5 \times 10^5$  Zellen + 500 µl Medium)
- 1:2; das entspricht: 1 Teil PBMC + 1 Teil OBP (500 µl PBMC =  $5 \times 10^5$  Zellen + 500 µl OBP =  $1 \times 10^6$  Zellen)
- Negativkontrolle (chromogen blanks bzw. Leerwert; dies entspricht 100 µl Standard + 50 µl Standardlösung)

### Tag 3

Am dritten Tag wurden die Wells geerntet und die Pellets für die qPCR tiefgefroren (-18°C).

#### 2.2 Versetzung der Zellen mit Antikörper für die Fluoreszenzmikroskopie

Es wurde mit 8 Blutpellets weitergearbeitet, welche 5 Minuten mit 1ml PBS/BSA (bovine serum albumin) inkubiert wurde.

➔ S1-S4; jeweils 1x Kontrolle (Co) und 1x mit OBP behandelt (OBP)

Die Proben wurden mit den **Primärantikörpern** für CD4 (Mouse Anti Pig CD4, PE; Clone 74-12-4) und CD25 (Mouse-Anti-Pig CD25) versetzt, welche zuvor in einem Verhältnis von 1:25 verdünnt wurden. Jeweils 25 µl der Antikörper – Verdünnung wurde auf die Proben pipettiert, resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde mit 1ml PBS/BSA gestoppt und schließlich zentrifugiert und der Überstand abpipettiert und verworfen. Für die CD25-Färbung wurde ein **Sekundärantikörper** (Goat-Anti-Mouse APC) in Verdünnung 1:1000 hergestellt und die Proben mit je 25 µl vermischt. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wird mit jeweils 1 ml PBS (ohne BSA) abgelöscht, zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Für die DAPI (=4',6-Diamidin-2-phenylindol) - Färbung wird DAPI in einem Verhältnis von 1:500 verdünnt und mit den Proben vermischt. Schließlich wird die Mischung in eine 24-Well-Platte pipettiert und 5 Minuten inkubiert.

### 2.3 EVOS Cell Imaging

Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird das Bild ausschließlich durch das abgestrahlte Licht (Emission) des untersuchten Objekts erzeugt. Um bestimmte Strukturen der Zellen anzufärben und sie damit sichtbar zu machen, wurden in dieser Arbeit die Fluoreszenzfarbstoffe APC (*Allophycocyanin*), PE (*Phycoerythrin*) und DAPI verwendet. Zur Messung durch das EVOS-Imaging-System wurden Kanäle mit ähnlicher Längswelle verwendet (APC → Cy5; PE → RFP)

- **Cy5-Kanal:** Die Emissionslänge von Cy 5 beträgt 650 nm (Nanometer) und liegt somit im roten Bereich (82). In diesem Versuch wurde APC zur Färbung von CD25-Membranproteinen verwendet.
- **RFP-Kanal:** Red fluorescent Protein hat ein Emissionsmaximum von 584nm, wodurch es bei Anregung rot-orange fluoresziert (83). CD4-Proteine wurden in diesem Versuch mit PE angefärbt, welches ein Emissionsmaximum von 578nm hat (84).
- **DAPI - Kanal:** 4',6-Diamidino-2-phenylindo wird vor allem zur Färbung und Darstellung von DNA verwendet. Mit einem Emissionsmaximum von 470 nm befindet es sich im Bereich von blauer bis cyaner Farbe und wurde in diesem Versuch zur Markierung beschädigter bzw. toter Zellen verwendet (85).

Von jeder Probe wurden 3 Gesichtsfelder in einer 20-fachen Vergrößerung festgehalten, welche mit 4 Licht-Cubes (transmitted, Cy5, RFP, DAPI) beleuchtet wurden. Zusätzlich wurden pro Probe ein Übersichtsbild in einer 4-fachen Vergrößerung aufgenommen. In der Auswertung wurden Lymphozyten in allen 4 Belichtungen gezählt und die Kombination der fluoreszierenden Eigenschaften der individuellen Zellen eines Gesichtsfeldes analysiert.

#### Datenauswertung

Die durch Fotos festgehaltenen Gesichtsfelder wurden mithilfe von ImageJ® analysiert (Abb. 5-10). Das Programm ermöglicht es verschiedene Belichtungen zu überlagern und so zu eruieren, welche Zellen wie fluoreszieren. Die erhobenen Daten wurden mit Excel Version 2301 festgehalten und ausgewertet.

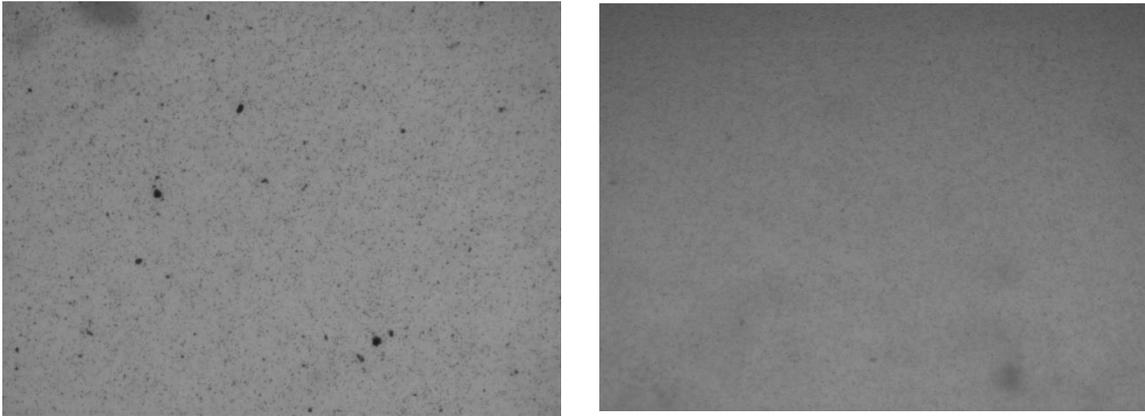


ABBILDUNG 5: VERGLEICH VON GESICHTSFELDERN IN VERGRÖßERUNG X4; TRANSMITTED; BEHANDLUNG 1:1 (LINKS), KONTROLLE (RECHTS)

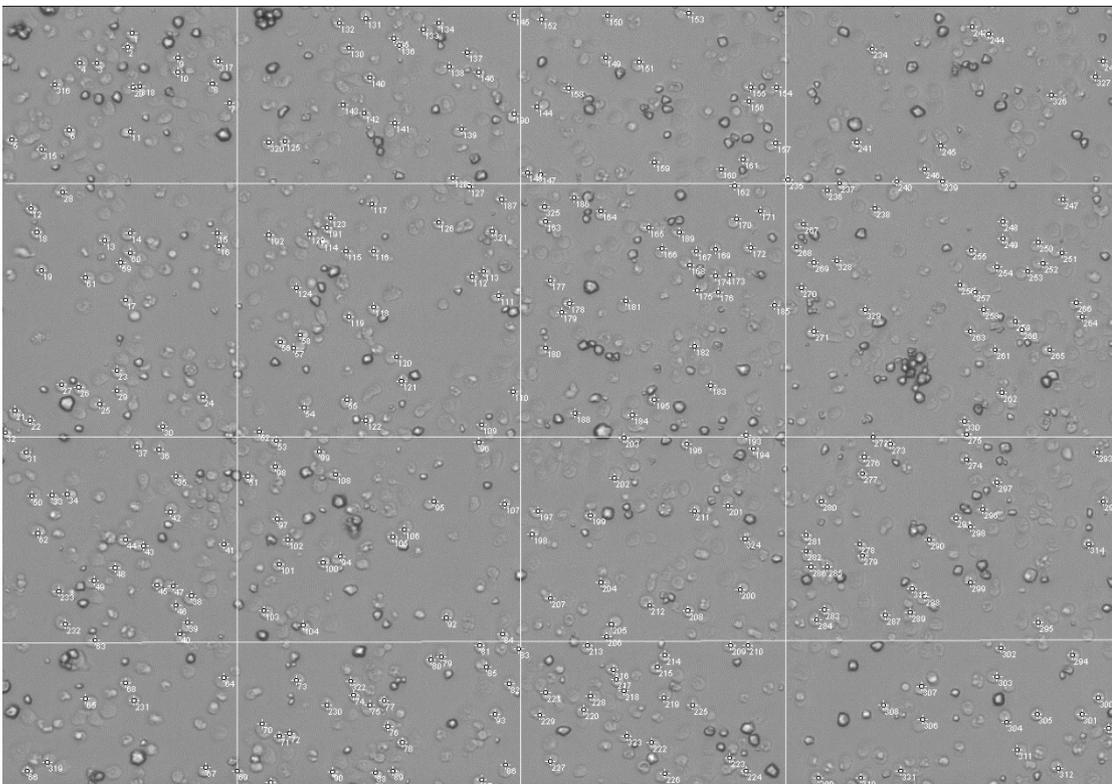


ABBILDUNG 6: ZELLZÄHLUNG MIT IMAGEJ<sup>®</sup> ANHAND DES BEISPIELS EINER BEHANDELTEN PROBE (1:1) IN 20X VERGRÖßERUNG

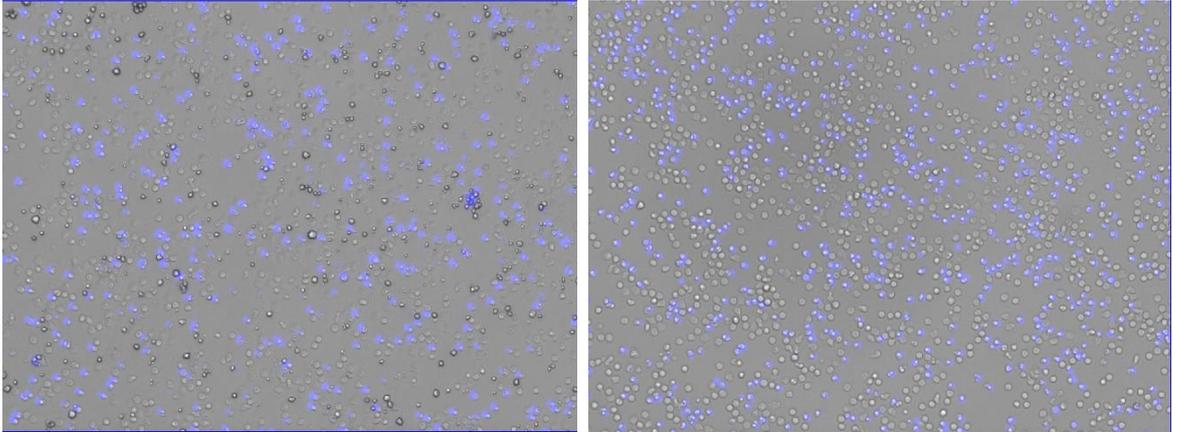


ABBILDUNG 7: BEISPIEL DAPI-FÄRBUNG; BEHANDLUNG 1:1 (LI), KONTROLLE (RE)

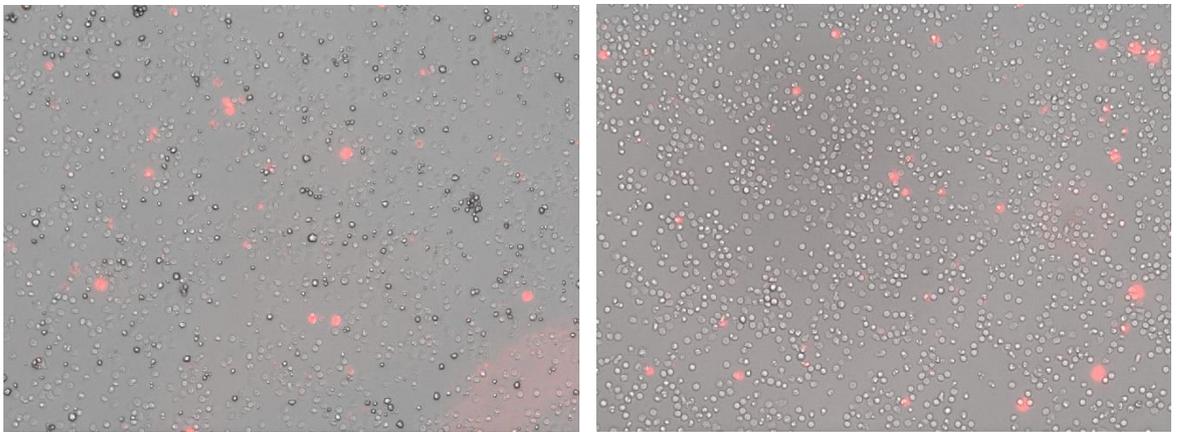


ABBILDUNG 8: BEISPIEL CD25-FÄRBUNG; BEHANDLUNG 1:1 (LI), KONTROLLE (RE)

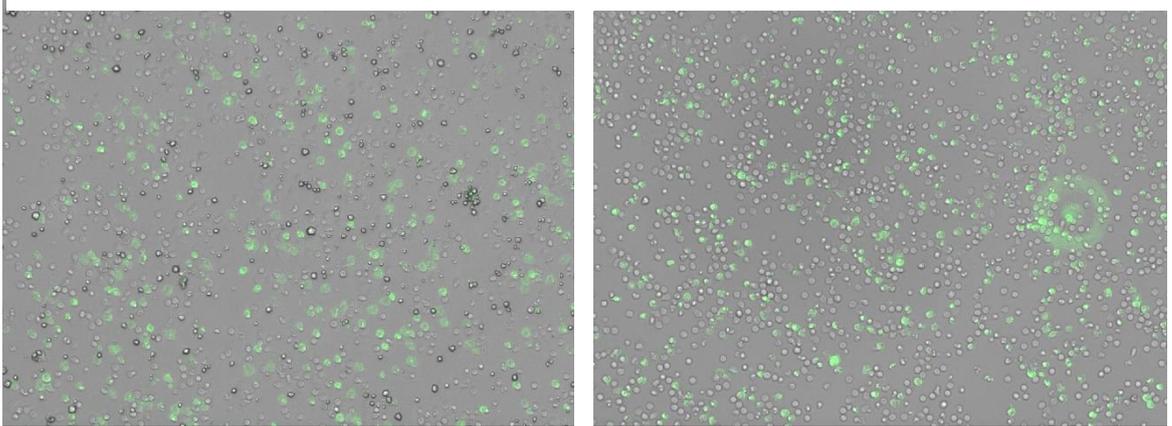


ABBILDUNG 9: BEISPIEL CD4-FÄRBUNG; BEHANDLUNG 1:1 (LI), KONTROLLE (RE)

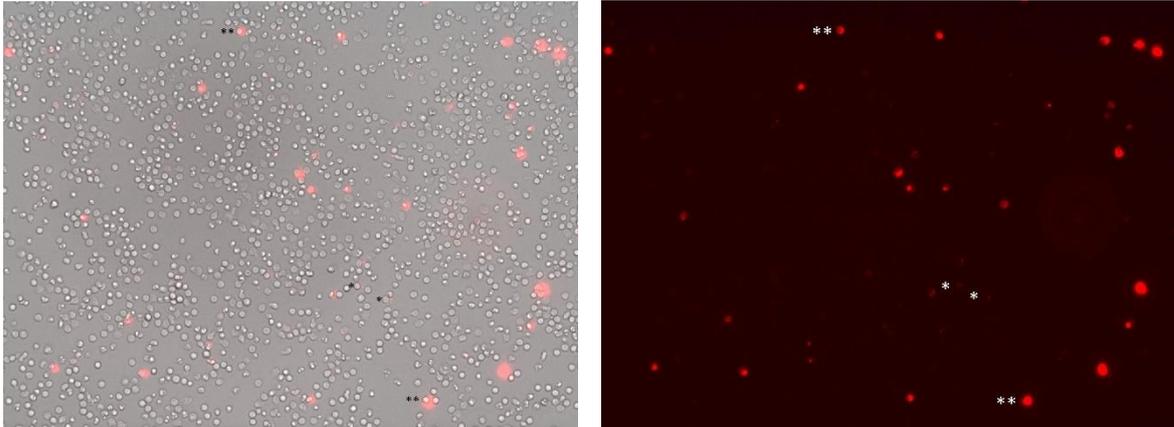


ABBILDUNG 10 BEISPIEL DER AUSWERTUNG CD25 POSITIVEN ZELLEN IN CD25<sup>HIGH</sup> UND CD25<sup>DIM</sup>

ZUERST WURDE MITTELS IMAGEJ® DIE LYMPHOZYTEN ALS SOLCHE IDENTIFIZIERT UND DIE CD25-FÄRBUNG ÜBER DAS TRANSMITTED-BILD GELEGT (LI). ZUR ANALYSE WURDE MIT DEM ORIGINALBILD (RE) VERGLEICHEN. DIE MARKIERUNGEN (\*, \*\*) AUF DEN BILDERN MARKIEREN DIE ZELLEN ZUR RECHTEN DER MARKIERUNG. \* ZEIGT CD25<sup>DIM</sup> POSITIVE ZELLEN UND \*\* ZEIGT CD25<sup>HIGH</sup> POSITIVE ZELLEN

## 2.4 qPCR

Die qPCR-Analyse für diesen Versuch wurde am Institut für Medizinische Biochemie der Vetmeduni Vienna durchgeführt. Für die Durchführung dieser Messungen und Bereitstellung der Daten möchte ich mich bei Andrea Müllechner MSc. herzlichst bedanken.

### RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Die zuvor eingefrorene PBMC-Zellsuspension wurde in ein 15-ml-Röhrchen übertragen und bei 300xg für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgegossen. Anschließend wurden 1 ml PBS hinzugefügt, gevortext und die gesamte Suspension in Eppendorf-Röhrchen überführt. Diese wurden dann bei 300xg für 3 Minuten zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Überstands wurde alles vortexiert, um die Zellen zu suspendieren. Danach wurden 1 ml TriReagent hinzugefügt, und die Suspension wurde durch mehrmaliges kräftiges Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Die Proben sollten mindestens 5 Minuten bei Raumtemperatur gestanden haben, bevor 200 µl Chloroform pro ml TriReagent zugesetzt wurden. Die Röhrchen wurden gut verschlossen und für 20 Sekunden geschüttelt, danach für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurden die Röhrchen bei 13.000xg, 30 Minuten, 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Phase (max. 450-500 µl pro ml TriReagent) wurde in neue Eppendorf-Röhrchen gegeben und 0,5 ml Isopropanol pro ml TriReagent versetzt und nach Vermischung bei -20 °C über Nacht inkubiert.

Nachdem der Überstand in Aufbewahrungsröhrchen gegeben wurden, wurde das Pellet mit mindestens 1 ml 75 % Ethanol gewaschen und gevortext. Die Röhrchen wurden bei 12.000xg, 5 Minuten und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen. Diese wurden bei 55 °C unter strenger Kontrolle getrocknet, eine zu starke Austrocknung ist zu vermeiden. Anschließend wurden 10-50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O dazu pipettiert, das Pellet bei 55 °C für 10 Minuten aufgelöst und nach guter Vermischung und kurzer Zentrifugation auf Eis gelegt (86).

#### Oligonucleotide primers for PCR

Die Primer und Sonden wurden mit dem Beacon Designer Software Programm (Biosoft International, Strategene, La Jolla, CA, USA) entworfen (Duvigneau et al. 2005).

Die verwendeten Primer, welche für die Messung der Genexpression verwendet wurden, sind in Tab. 2 aufgelistet.

**TABELLE 2 VERWENDETE PRIMERSEQUENZEN**

<b>Gen-Name</b>	<b>Primer Sequenz</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Produktlänge</b>
FOX P3	ACCCTCATCCGCTGGGCCAT	60°C	391
	GCCAGCCAGCGCACACCTTA		
CD25	AGGTACCACAGATTCCCAAACC	60°C	92
	AGCCGGCCACTGCTAGCT		
OAZ1	CAATAGCTGCCTCTACATCGAGATC	60°C	134
	GGTTCTTGTGGAAGCAAATGAAG		

#### PCR

Für diese Diplomarbeit wurden die Ergebnisse für FOX P3 und CD25 genutzt. Zur RNA-Gehalt-Normalisierung wurde die Referenz OAZ1 herangezogen. CD25 und FOX P3 wurden mit SYBR Green 1 markiert. Für die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde eine 1:10 Verdünnung der isolierten RNAs erstellt und mittels Biophotometer bei 260nm gemessen. Die Analyse basierte auf dem Verhältnis von 260/280, einem Quotienten größer als 1,7, und den üblichen RNA-Ausbeuten von 1-3 µg RNA/10<sup>6</sup> Lymphozyten.

Bereits im TRI-Reagent wurde ersichtlich, dass nur eine geringe Menge an isolierter RNA vorlag, und so wurde Glykogen hinzugefügt. Dadurch präzipitiert die RNA besser. Infolgedessen wurde die RNA in je 13 µl H<sub>2</sub>O gelöst (wobei 2 µl für die Messung verwendet wurden), und für die cDNA-Synthese wurde jeweils 1 µg eingesetzt, wobei die Menge auf maximal 10,6 µl begrenzt wurde (86).

### Datenauswertung

Mittels Excel Version 2301 wurde nach der Delta delta Cycle thresholds-Methode (ddCT) (87) die relative Expressionsrate für das Gene of interest (Goi), also FOX P3 und CD25, berechnet. Als interne Referenz für die Normalisierung des RNA-Gehaltes wurden die Cycle thresholds (Ct) für das Haushaltsgen Ornithine decarboxylase antizyme (OAZ1) genutzt. Die Delta-Delta-CT-Methode vergleicht die Differenz der Expression zwischen dem Goi und dem Referenzgen (OAZ1). Zunächst wurde  $\Delta CT$  berechnet:

$$\Delta CT = CT (Goi) - CT (OAZ1)$$

Um die Werte in Relation zu bringen, wurde pro Schwein ein externer Kalibrator berechnet und dieser von den jeweiligen  $\Delta CT$ -Werten abgezogen und so  $\Delta\Delta CT$  berechnet:

$$\Delta\Delta CT = \Delta Cq (Goi) Probe X - \text{mittlerer } \Delta Cq (OAZ1) Probe X$$

Als nächstes wird die relative Expressionsrate berechnet:

$$\text{relatives Expressionsverhältnis} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

### 2.5 Statistik

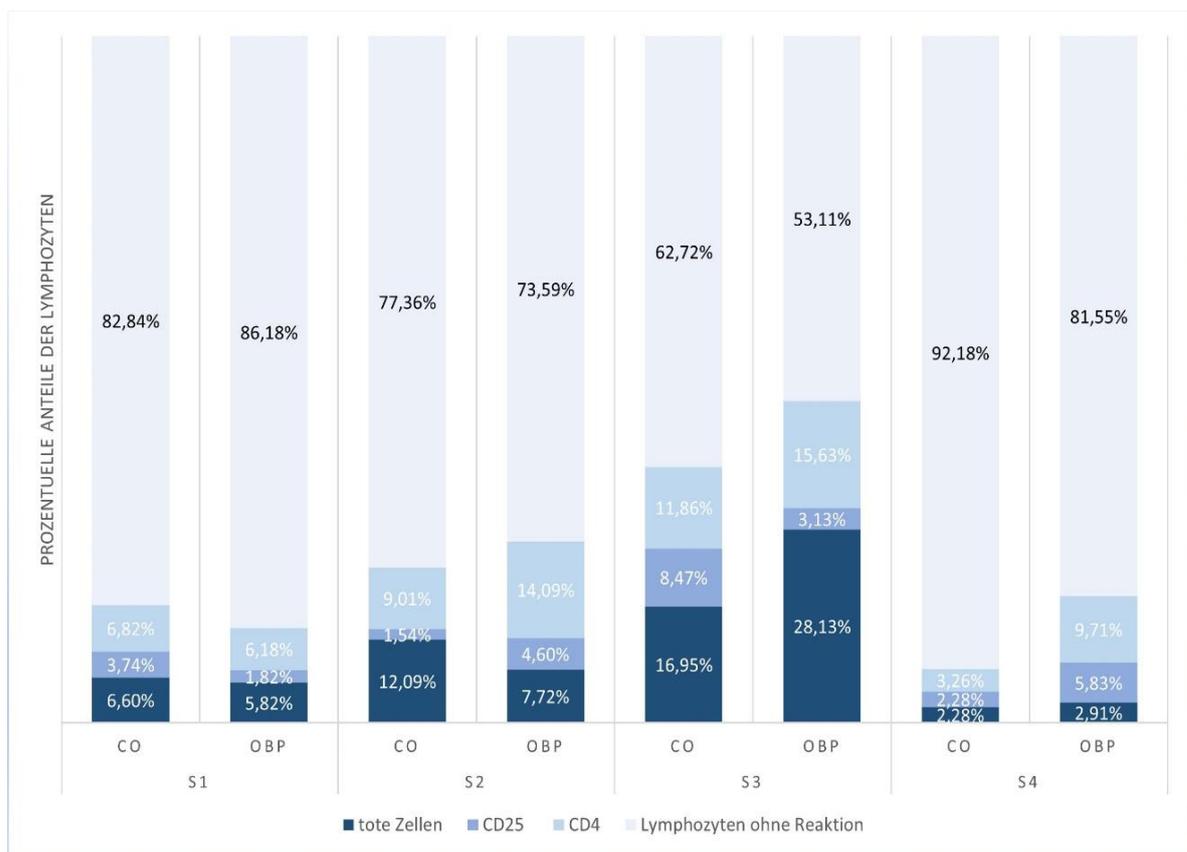
Aufgrund der kleinen Stichprobenmenge wurde der Wilcoxon-Test angewendet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Expression von CD4 und CD25

Eine genaue Übersicht der Ergebnisse und die absoluten Zahlen sind dem Anhang zu entnehmen. Alle Grafen wurden mit Excel Version 365 erstellt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mir einem paarweisen Wilcoxon-Test getestet.

Bei der Zellzählung konnte festgestellt werden, dass die Lymphozyten-Verteilung aller Schweine sowohl beim Kontroll- als auch beim Behandlungsdurchgang tierindividuelle Unterschiede aufwies (Abb. 11, Abb. 15 b).



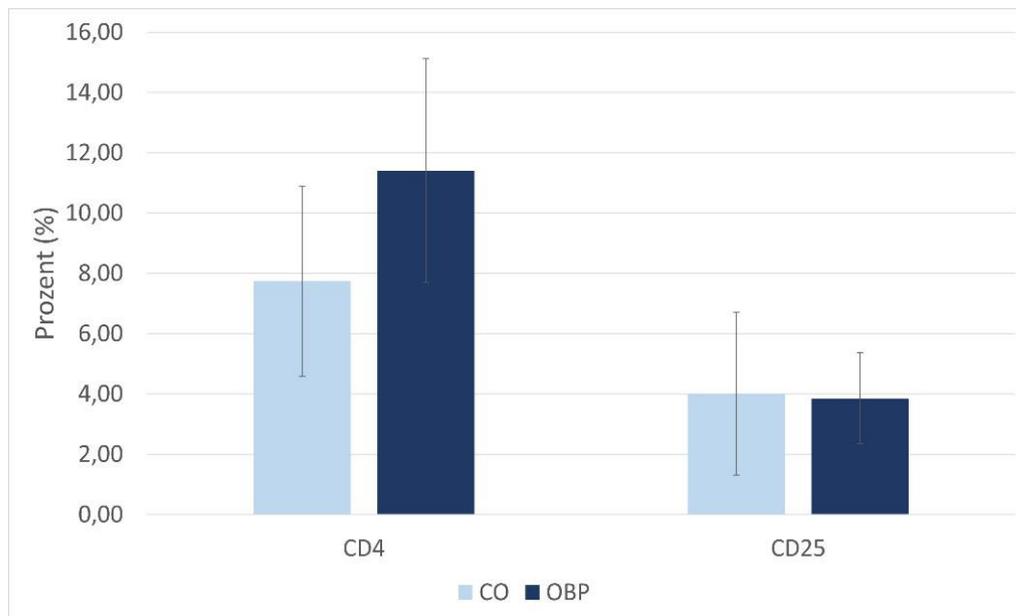
**ABBILDUNG 11: PROZENTUELLE AUFTEILUNG DER LYMPHOZYTEN IM PERIPHEREN BLUT PRO SCHWEIN JEWEILS IM VERGLEICH DES KONTROLL- UND BEHANDLUNGSDURCHGANG; „LYMPHOZYTEN OHNE REAKTION“ REPRÄSENTIERT JENE LYMPHOZYTEN WELCHE NICHT MIT ANTIKÖRPERN ANGEFÄRBT WURDEN. (P<0,05).**

Während der Anteil der toten Zellen bei Schwein 1 und 4 unter 10% betrug, zeigten Schwein 2 und 3 einen größeren Anteil toter Zellen. Schwein 3 hatte in beiden Durchgängen (CO und OBP) den größten Anteil an toten Zellen, aber auch den größten Anteil an CD4 positiven (CD4+) Zellen. Schwein 4 zeigte im Kontrolldurchgang im Vergleich den geringsten Anteil an CD4+ Zellen und toten Zellen im Behandlungsdurchgang (OBP) jedoch gleichzeitig den größten Anteil an CD25 positiven (CD25+) Zellen. Die Verschiebung der Lymphozyten-

Verteilung nach der Behandlung ist bei Schwein 2 und 4 ähnlich (Abb. 11; Abb. 13 a,b). Hier konnte ein prozentueller Anstieg der CD 25+ und CD4+ Zellen beobachtet werden. Auch bei Schwein 3 findet man einen größeren Anteil an CD4+ Lymphozyten bei den behandelten Zellen, jedoch verringerten sich die Prozent der CD25+ Zellen. Bei Schwein 1 nahmen nach der Behandlung sowohl die CD4+, also auch die CD25+ Zellen ab (Abb. 11; Abb. 13a, b). Im Durchschnitt konnte beobachtet werden, dass der prozentuelle Anteil der CD4+ Zellen nach der Behandlung deutlich zunahm, während sich der Anteil CD25+ Zellen durchschnittlich etwas verringerte (Abb. 12). Die Ab- und Zunahme der prozentuellen Aufteilung der toten Zellen nach der Behandlung zeigt kein Muster. Bei Schwein 1 und 2 nahm dieser Anteil ab, während er bei Schwein 3 und 4 zunahm (Abb. 11). Auch bei dem Ausmaß der Veränderung sind keine Zusammenhänge zu erkennen. Bei Schwein 1 verringerte sich der Anteil der toten Zellen um 0,78% bei Schwein 2 um < 4%. Eine deutliche Zunahme der toten Zellen (> 10 %) konnte bei Schwein 3 beobachtet werden und die kleinste Veränderung zeigte Schwein 4 mit einer Zunahme von 0,63 % (Abb. 11; Tab. 3). Tendenziell ließ sich erkennen, dass die Lymphozyten nach der Behandlung mit OBP einen geringeren Prozentsatz an toten Zellen zeigen (Abb. 15 a). Zusätzlich konnte ein vermehrtes Auftreten von CD4+ Lymphozyten beobachtet werden (Abb. 15 a; Abb. 12), die Behandlung schien jedoch keinen Einfluss auf das Vorhandensein von CD25+ Zellen zu haben (Abb. 15 a), durchschnittlich ließ sich sogar eine Verringerung deren Vorkommen feststellen (Abb. 12).

**TABELLE 3: AUFTEILUNG DER LYMPHOZYTEN IN PROZENT FÜR SCHWEIN 1-4 (S1-S4), JEWEILS IM VERGLEICH DES KONTROLL- UND BEHANDLUNGSDURCHGANGS; Tot\* STELLT TOTE ZELLEN (FÄRBUNG: DAPI) DAR**

	S1		S2		S3		S4	
	CO	OBP	CO	OBP	CO	OBP	CO	OBP
<b>Tot*</b>	6,60%	5,82%	12,09%	7,72%	16,95%	28,13%	2,28%	2,91%
<b>CD25</b>	3,74%	1,82%	1,54%	4,60%	8,47%	3,13%	2,28%	5,83%
<b>CD25<sup>high</sup></b>	1,76%	0,00%	0,81%	0,89%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%
<b>CD25<sup>dim</sup></b>	3,74%	2,55%	1,54%	3,71%	8,47%	3,13%	2,28%	5,83%
<b>CD4</b>	6,82%	6,18%	9,01%	14,09%	11,86%	15,63%	3,26%	9,71%
<b>CD25+CD4</b>	0,99%	0,73%	0,37%	1,79%	3,39%	0,00%	0,33%	0,00%



**ABBILDUNG 12: ÜBERBLICK ZUR ENTWICKLUNG DER CD4- UND CD25- EXPRESSION, HIER WURDEN DIE MITTELWERTE DER PROZENTANGABEN ALLER SCHWEINE (S1-S4) VERWENDET; ANGABE IN % WOBEI 100% ALLE GEZÄHLTEN LYMPHOZYTEN SIND**

Die Aufteilung der CD25+ Lymphozyten in CD25<sup>high</sup> und CD25<sup>dim</sup> zeigt ebenfalls tierindividuelle Unterschiede (Tab. 3). In der Kontrollgruppe zeigte Schwein 1 den größten Anteil an CD25<sup>high</sup>+ Zellen, hingegen konnte bei Schwein 3 keine CD25<sup>high</sup>+ Lymphozyten beobachtet werden. Nach der Behandlung mit OBP® konnte nur bei Schwein 2 CD25<sup>high</sup>+ Zellen gesehen

werden (Tab. 3; Abb. 14). Die Aufteilung der CD25+ Lymphozyten in CD25<sup>high</sup> und CD25<sup>dim</sup> verschob sich nach der Behandlung bei allen Schweinen somit noch weiter zugunsten der CD25<sup>dim</sup>+ Zellen (Abb. 14). Das Verhältnis und die Veränderung des CD25<sup>dim</sup>+ Lymphozyten korreliert mit dem gesamten Anteil der CD25+ Zellen. Bei Schwein 1 und 3 sinkt dieser, wobei Schwein 3 mit einer Abnahme von 5,35 % die größte Veränderung bei CD25<sup>dim</sup>+ Zellen nach der Behandlung zeigte. Schwein 2 und 4 hingegen zeigten eine prozentuelle Zunahme in dieser Kategorie, wobei bei Schwein 2 ein besonders großer Anstieg von 3,55 % beobachtet wurde (Tab. 3). Der Anteil an Lymphozyten, welche sowohl CD25+ und CD4+ sind, stiegen nur bei Schwein 2 nach der Behandlung um 1,42 % an. Bei Schwein 1, 3 und 4 konnte eine Abnahme dieses Anteils vernommen werden, wobei bei Schwein 3 und Schwein 4 keine Zellen gesehen wurden, die CD4+ und CD25+ Reaktion zeigten (Tab. 3, p <0,05).

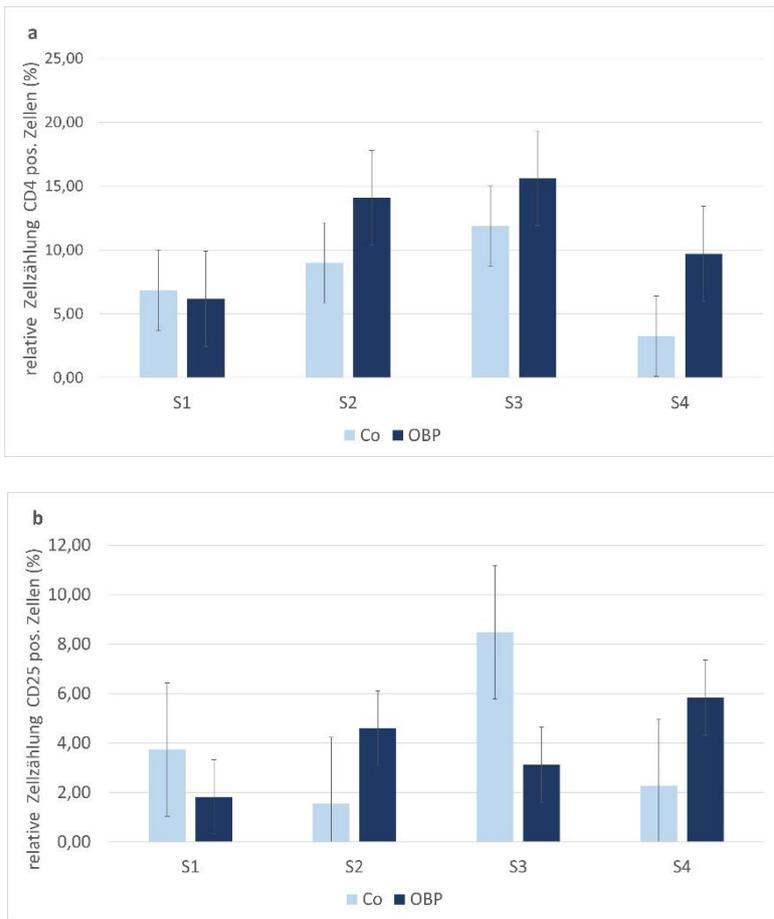


ABBILDUNG 13: (A) ENTWICKLUNG DER CD4 – UND DER CD25 – (B) EXPRESSION NACH BEHANDLUNG MIT OBP PRO SCHWEIN; ANGABE IN % WOBEI 100% ALLE GEZÄHLTEN LYMPHOZYTEN SIND.

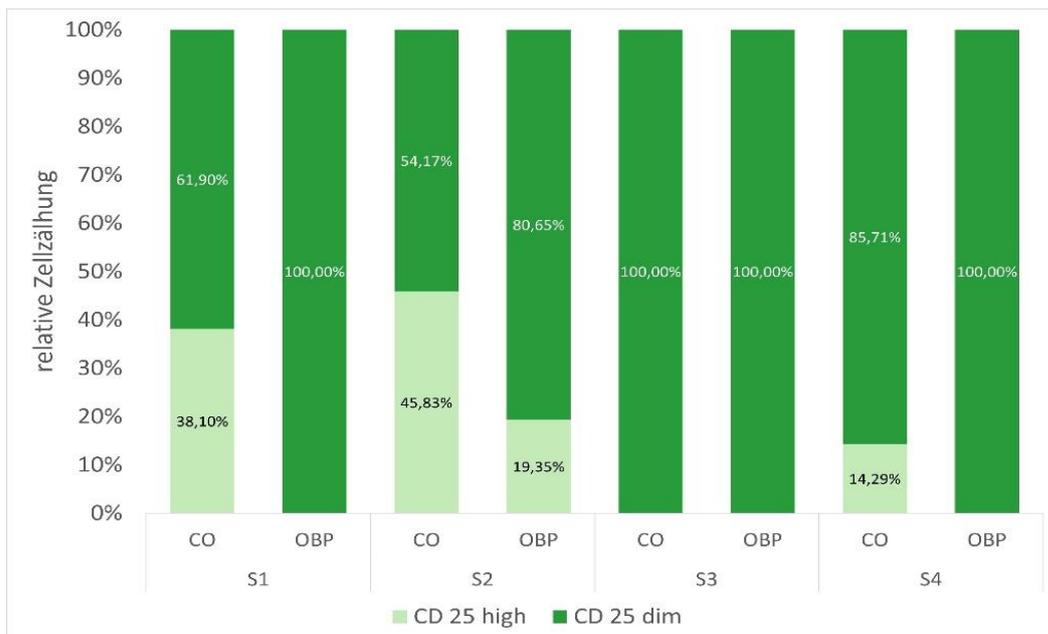
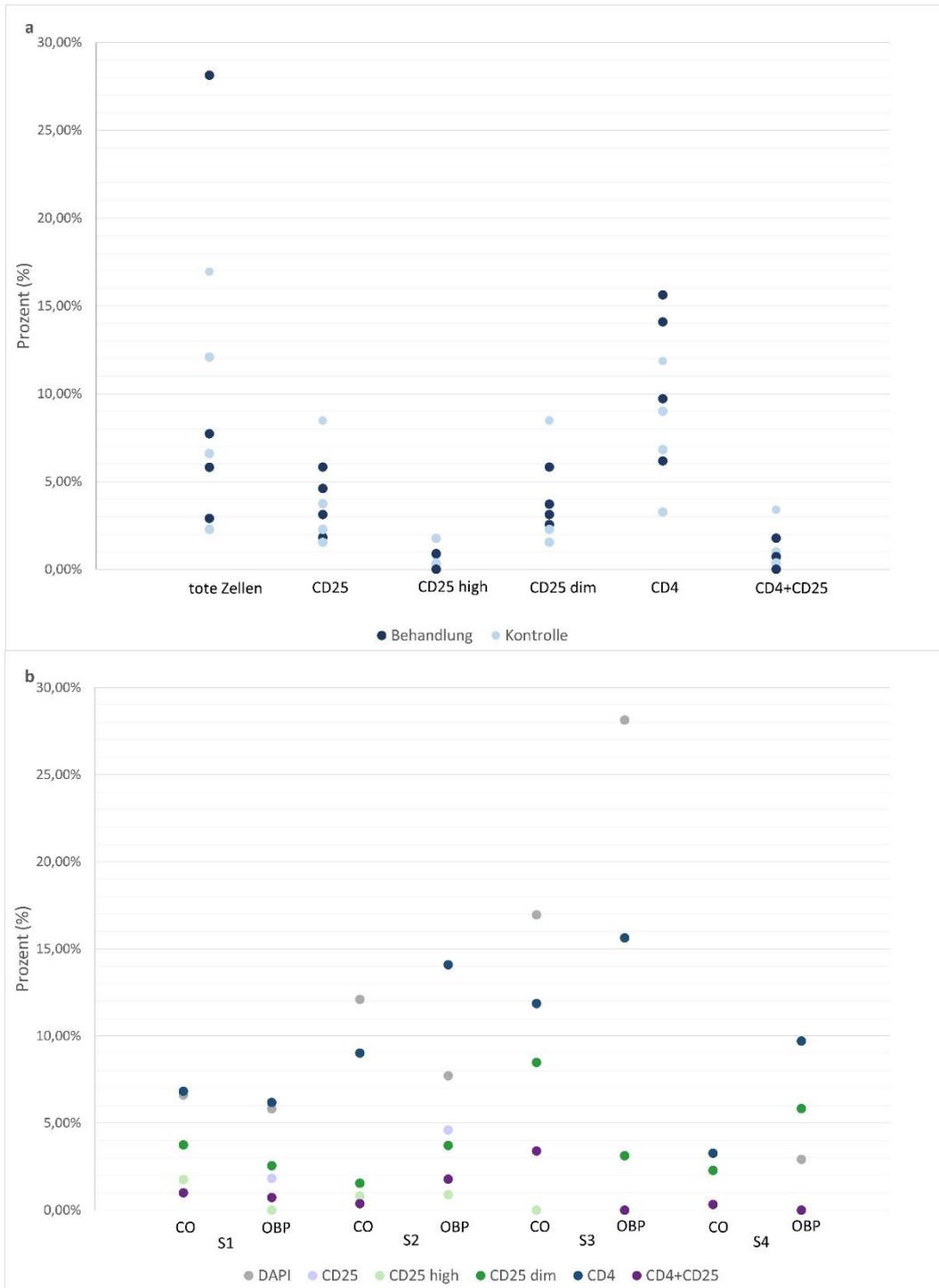


ABBILDUNG 14: VERGLEICH DER ENTWICKLUNG DER CD25 AUFTeilUNG IN CD25<sup>HIGH</sup> UND CD25<sup>DIM</sup>, WOBEI 100% ALLE CD25-FLUORESZIERENDEN LYMPHOZYTEN SIND



**ABBILDUNG 15: (A) PUNKTDIAGRAMM ZUR ÜBERSICHT DER LYMPHOZYTEN-POPULATIONEN IM VERGLEICH KONTROLLE VS BEHANDLUNG; JEDER PUNKT REPRÄSENTIERT DIE MITTLERE ZELLAHL ALLER AUFGENOMMENEN GESICHTSFELDER (PRO FÄRBUNG 3 GESICHTSFELDER) PRO SCHWEIN (S1-S4) IN PROZENT (P<0,05).**

**(B) PUNKTDIAGRAMM ZUR ÜBERSICHT DER SCHWEINE 1-4 (S1-S4). JEDER PUNKT REPRÄSENTIERT DIE MITTLERE ZELLAHL ALLER AUFGENOMMENEN GESICHTSFELDER IN PROZENT (P<0,05).**

### 3.2 Genexpression von CD25 und Forkhead-Box-Protein P3 (FOX P3)

Jedes Schwein wurde pro Kontrolle und Behandlung in Duplikaten gemessen. Das Duplikat S2.2 (OBP) wurde von den Berechnungen ausgeschlossen. Alle weiteren Berechnungen wurden nur für S2.1 (OBP) durchgeführt. Durch die Schmelzkurve (Abb. 16, Abb. 17) wird bestätigt, dass das qPCR-Assay ein Einzelprodukt erzeugte und so die Spezifität der Amplifikation gegeben ist.

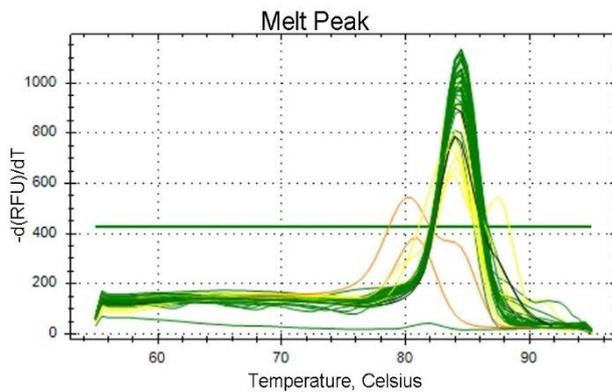


ABBILDUNG 16: GENEXPRESSION CD25

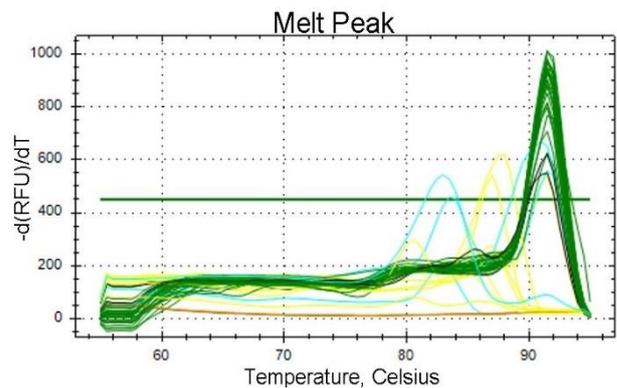


ABBILDUNG 17: GENEXPRESSION FOX P3

AUF DER X-ACHSE SIND DIE CYCLES (ANZAHL DER DURCHGÄNGE) ANGEZEIGT, DIE NOTWENDIG WAREN UM DIE REALTIVE FLUORESZINEINHEIT (RFU; AUF Y-ACHSE ANGEZEIGT) ZU ERREICHEN. BEIDE ABILDUNGEN ZEIGEN EINEN SINGULÄREN PEAK, WAS ALS REINES, EINZELNES AMPLIKON- ALSO EINE SPEZIFISCHE REAKTION- ZU INTERPRETIEREN IST.

#### FOX P3

Auch in der Genexpression von FOX P3 lassen sich tierindividuelle Unterschiede in der Reaktion auf die Behandlung erkennen. Die Kontrollgruppe zeigt bei allen Schweinen einen ähnlichen Genexpression (Abb. 18a) und einen Median von 1 (Abb. 18b). In der Behandlungsgruppe lässt sich bei Schwein 2, 3 und 4 eine vermehrte Genexpression erkennen (Abb. 18a). Hierbei zeigt Schwein 2 einen besonders starken Anstieg. Schwein 1 zeigt eine verminderte FOX P3-Expression (Abb. 18a). Im Durchschnitt lässt sich aber ein Anstieg der Genexpression nach der Behandlung mit OBP® im Vergleich feststellen (Abb. 18b).

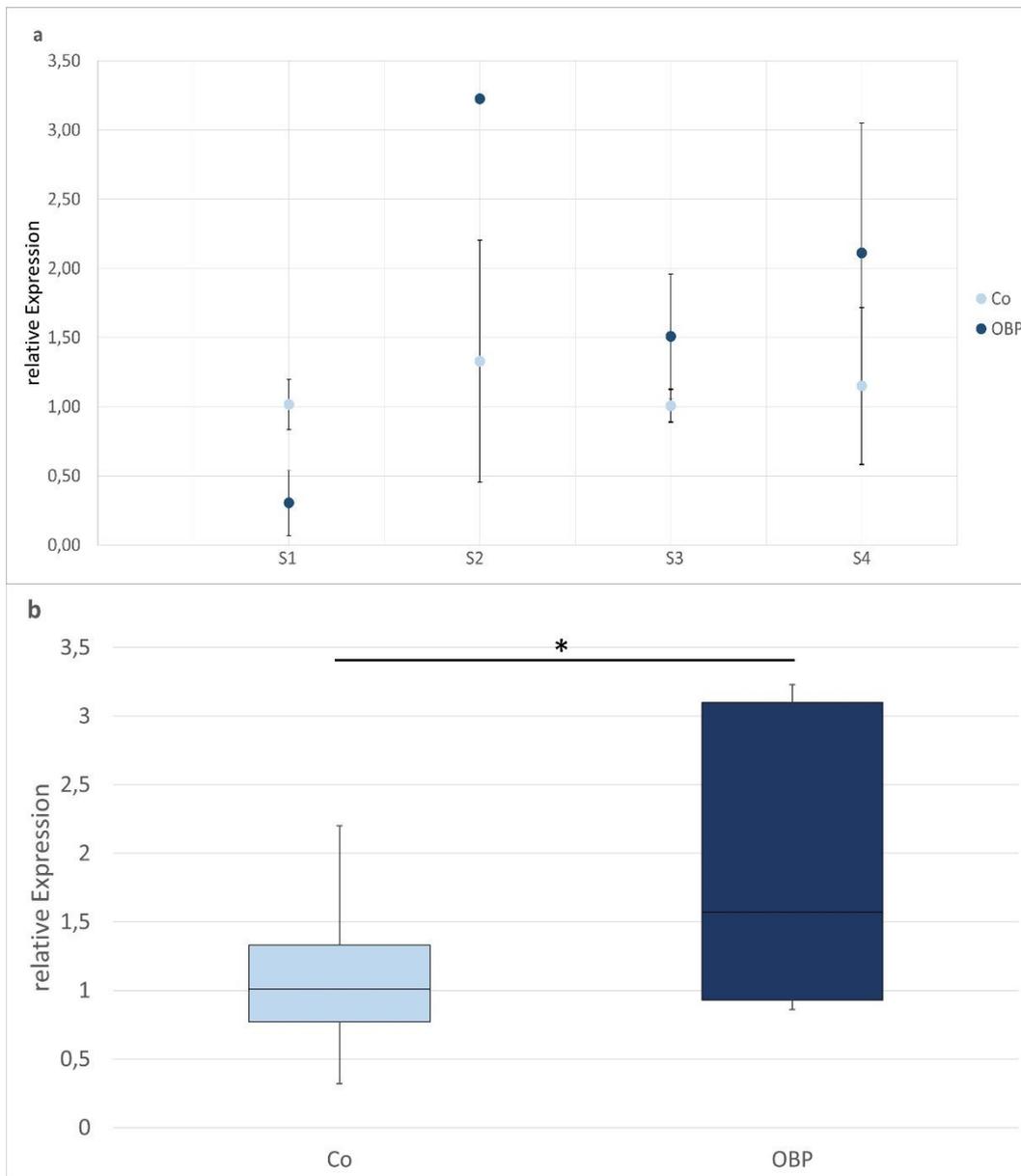


ABBILDUNG 18: RELATIVE EXPRESSION VON FOX P3

(A) IM VERGLEICH SCHWEIN 1-4 (S1-S4). JEDER DATENPUNKT WURDE ALS DUPLIKAT GEMESSEN. DIE DABEI ERHALTENEN ERGEBNISSE WURDEN NACH DER DELTA-DELTA CT METHODE BERECHNET UND GEGEN JEWEILS EINEN EXTERNEN KALIBRATOR PRO SCHWEIN REGULIERT. DARGESTELLT IST DIE RELATIVE EXPRESSIONSRATE AUF DER Y-ACHSE. FÜR JEDEN DATENPUNKT WERDEN DIE BERECHNETEN STANDARDABWEICHUNGEN IM GRAFEN ANGEZEIGT, STANDARDABWEICHUNG VON S2 OBP =0. JEDER PUNKT STEHT FÜR DEN MITTELWERT ZWEIER TECHNISCHER REPLIKATE, WELCHE JEWEILS VON ZWEI BIOLOGISCHEN REPLIKATEN GEMESSEN WURDE ( $p > 0,05$ ). (B) VERGLEICH KONTROLLE UND BEHANDLUNG. FÜR DIE DARSTELLUNG WURDEN ERNEUT DIE MITTELWERTE DER DUPLIKATE PRO SCHWEIN VERWENDET, STATISTISCHE SIGNIFIKANZ ERFOLGTE DURCH DEN WILCOXON TEST, \*  $p > 0,05$ .

## CD25

Die qPCR hat eine höhere Expression von CD25 nach der Behandlung mit OBP® im Vergleich zur Kontrolle. Die Expression aller Schweine in der Kontrollgruppe war bei etwa 1 (Abb. 19a), ebenso wie der Median (Abb. 19b). Nach der Behandlung zeigten Schwein 2, 3 und 4 auch hier eine erhöhte Genexpression, während sich bei Schwein 1 eine verringerte CD25 – Expression beobachten ließ (Abb. 19a). Im Allgemeinen kann aber festgestellt werden, dass die Behandlung mit OBP® zu einer vermehrten CD25 – Genexpression geführt hat (Abb. 19b).

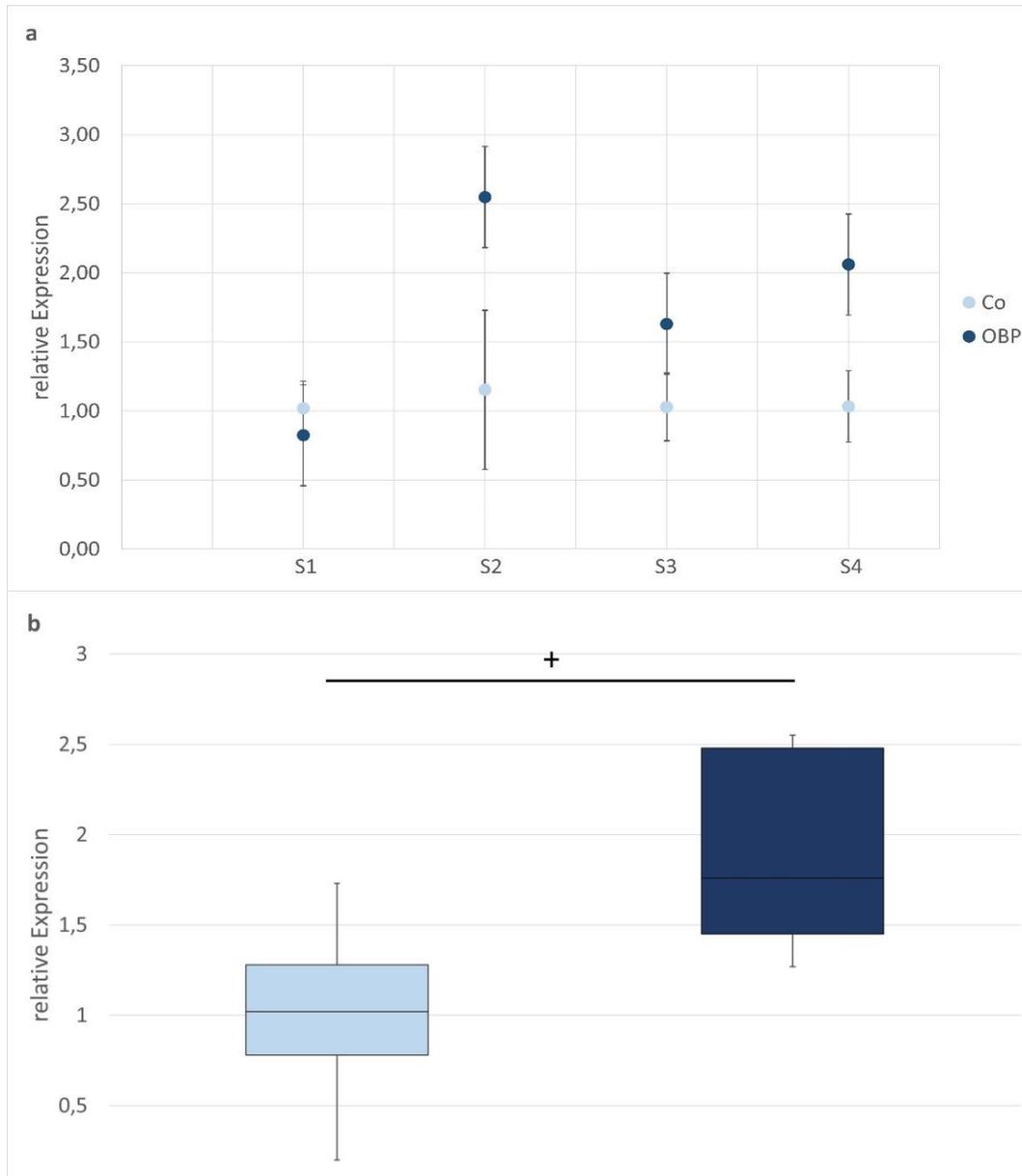


ABBILDUNG 19: RELATIVE EXPRESSION VON CD25

(A) IM VERGLEICH SCHWEIN 1-4 (S1-S4). JEDER DATENPUNKT WURDE ALS DUPLIKAT GEMESSEN. DIE DABEI ERHALTENEN ERGEBNISSE WURDEN NACH DER DELTA-DELTA Ct METHODE BERECHNET UND GEGEN JEWEILS EINEN EXTERNEN KALIBRATOR PRO SCHWEIN REGULIERT. DARGESTELLT IST DIE RELATIVE EXPRESSIONSRATE AUF DER Y-ACHSE. FÜR JEDEN DATENPUNKT WERDEN DIE BERECHNETEN STANDARDABWEICHUNGEN IM GRAFEN ANGEGEBEN, STANDARTABWEICHUNG VON S2 OBP =0. JEDER PUNKT STEHT FÜR DEN MITTELWERT ZWEIER TECHNISCHER REPLIKATE, WELCHE JEWEILS VON ZWEI BIOLOGISCHEN REPLIKATEN GEMESSEN WURDE; ( $p > 0,05$ ). (B) VERGLEICH KONTROLLE UND BEHANDLUNG. FÜR DIE DARSTELLUNG WURDEN ERNEUT DIE MITTELWERTE DER DUPLIKATE PRO SCHWEIN VERWENDET. STATISTISCHE SIGNIFIKANZ ERFOLGTE DURCH DEN WILCOXON TEST, +  $p > 0,05$ .

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden die Auswirkungen der Behandlung mit dem Probiotikum Omni Biotic PandA® auf Schweinelymphozyten, mit besonderem Schwerpunkt auf die Oberflächenexpression der Marker CD4, CD25 sowie auf Transkriptebene die Expression von CD25 und von dem Transkriptionsfaktors FOX P3 untersucht. Es ist zu beachten, dass Studien an Zellkulturen einen einzigen Zeitpunkt in einem Modell beleuchten und die Situation in vivo nicht vollständig widerspiegelt und weitere Untersuchungen am Tiermodell für ein vollständiges Bild notwendig sind. Es ist weiters zu betonen, dass Limitationen, wie die geringe Anzahl der untersuchten Schweine und tierindividuelle Unterschiede bestehen und zukünftige Forschungen genannte Limitationen überwinden müssen und können, um noch genauere Einblicke zu ermöglichen.

### 4.1 CD4+CD25+FOX P3+-T-Zellen

Die Ergebnisse aus der Fluoreszenzmikroskopie zeigen starke tierindividuelle Unterschiede und eine heterogene Reaktion auf die Behandlung (Abb.11a, b). Ein Schwein (Schwein 1) zeigt interessanterweise eine paradoxe Reaktion und wies eine prozentuelle Verringerung beider Oberflächenmarker sowie der Genexpression von CD25 und FOX P3 auf und wird somit als „non responder“ identifiziert. Das Phänomen, dass Organismen aufgrund von individuellen Faktoren nicht die erwarteten Reaktionen zeigen, wurde bereits bei Starke et al. (88) beschrieben. In dem Versuch wurden tragende Jungsauen vor der Geburt mit *E. faecium* zugefüttert und der Kot der Jungsauen sowie der Nachkommen zu verschiedenen Zeitpunkten auf DNA-Extrakte untersucht. Die Hälfte der Sauen sprach nicht auf die Behandlung an und die Saugferkel der ansprechenden und nicht-ansprechenden Sauen zeigten signifikante Unterschiede in der Bakterienzusammensetzung. Die Ergebnisse zeigen, dass Probiotika das Darmmikrobiom der Sauen verändern kann und diese Veränderung auch auf die Nachkommen weitergegeben werden können. Zusätzlich unterstreicht diese Studie unsere Ergebnisse, nämlich die unterschiedliche Verteilung der Lymphozyten, sowohl vor als auch nach der Behandlung mit Omni Biotic PandA® (Kapitel 3.1). Bei der Zellzählung mittels Fluoreszenzmikroskopie war Schwein 1 das einzige, welches eine gleichzeitige prozentuelle Verringerung bei CD25+ und CD4+-T-Zellen nach der Behandlung zeigte (Abb. 13a, b). Unterdessen wurde auch eine verminderte Genexpression von FOX P3 und CD25 bei Schwein 1 im Vergleich zum Kontrolldurchgang festgestellt (Abb. 18a, Abb. 19a). Ebenso ist eine paradoxe Entwicklung bei Schwein 3 von CD25+-Zellen nach der Behandlung in der Fluoreszenzmikroskopie zu erkennen (Abb. 13b). Die Ergebnisse zur Entwicklung zu CD25+ -Zellen sind in der Fluoreszenzmikroskopie und PCR im Durchschnitt

widersprüchlich (Abb. 19b; Abb. 12). Hierzu gibt es mehrere potenzielle Begründungen. CD25 wird in der Durchflusszytometrie oft als Oberflächenmarker für T-regulatorische-Zellen gewählt, jedoch exprimieren neben Tregs auch andere Immunzellen wie T- und B-Lymphozyten, sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen CD25 auf ihren Oberflächen (89). Somit ist es möglich, dass im Zuge der PCR auch die Genexpression für CD25 von anderen genannten Immunzellen gemessen wurde. Außerdem ist nicht auszuschließen, dass die gemessene RNA der CD25-Oberflächenmoleküle bereits intrazellulär vorhanden waren, in der Fluoreszenzmikroskopie jedoch noch nicht auf der Oberfläche angefärbt werden konnte. Für anschließende Versuche wird daher empfohlen, die Untersuchungen der Oberflächenmoleküle und Genexpressionen zu mehreren Zeitpunkten durchzuführen, um mögliche verspätete Reaktion aufzeichnen zu können.

Verschiedene Untergruppen von Tregs können durch diverse Oberflächenmoleküle, intrazelluläre Marker und/oder Zytokine charakterisiert werden. CD25<sup>dim</sup> und CD25<sup>high</sup> können auf Tregs gefunden werden und kennzeichnen deren Aktivität. Nach der Bildung im Thymus differenzieren sich Tregs in den lymphatischen Organen in ruhende (CD25<sup>dim</sup>), sezernierende (CD25<sup>dim</sup>) oder aktivierte (CD25<sup>high</sup>) Zellen (56). Der Begriff „high“ suggeriert dabei eine erhöhte Expression an CD25-Proteinen und starke FOXP3-Expression, während CD4<sup>+</sup>CD25<sup>dim</sup> T-Zellen eine geringere FOXP3-Expression auszeichnet.

Bemerkenswerterweise ist diese Zellgruppe allerdings, jene Tregs-Untergruppe, welche am meisten IL-10 sezerniert (90). Durch die intra- und interindividuellen Unterschiede in der Aufteilung der CD25-Untergruppen (Abb. 19, Tab. 3) wird die tierindividuelle Reaktion der Immunzellen auf das Probiotikum verdeutlicht. Für eine kompetente Interpretation der Tregs-Untergruppen ist diese alleinige Kategorie jedoch nicht ausreichend. Für eine genauere Identifizierung ist eine Analyse des Oberflächenmusters in größerem Rahmen notwendig (56). CD4<sup>+</sup>Zellen zeigen im Durchschnitt einen deutlichen Anstieg der behandelten Zellen (Abb. 12). Tregs stellen eine von mehreren Untergruppe von CD4<sup>+</sup>Zellen dar, andere mögliche Untergruppen von CD4<sup>+</sup> Zellen sind Th1, Th2, Th17 und TFH (89). Wie bereits behandelt ist die Identifikation von Tregs noch beschwerlich und nach den angegebenen Kriterien (Kapitel 1.4) ist das alleinige Vorhandensein von CD4-Oberflächenproteinen nicht ausreichend, um jene CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten als Tregs anzusprechen. Grundsätzlich lässt sich aber feststellen, dass die Behandlung mit Omni Biotic PandA® zu einem vermehrten Vorkommen von CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-

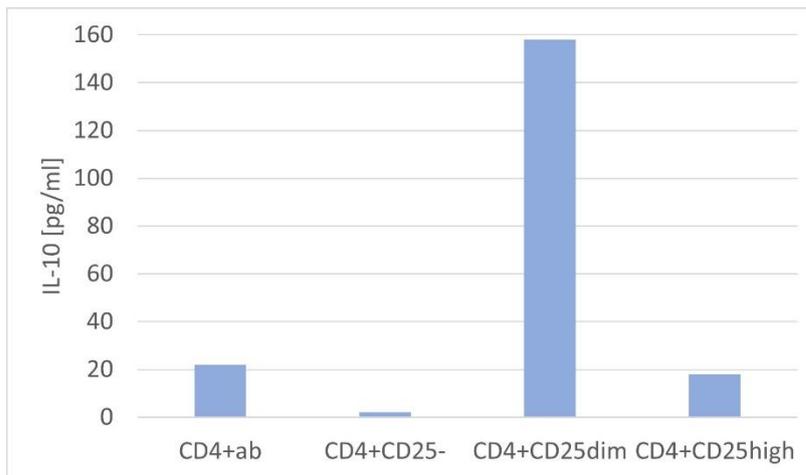


ABBILDUNG 20: IL-10  
PRODUKTION VON CD4+CD25-T-  
ZELL UNTERGRUPPEN  
(90)

Zellen geführt hat.

In mehreren Studien wird betont, dass es keine klaren Leitlinien für die Identifizierung von Tregs gibt (56, 91), was in Humanstudien bereits zu irreführenden und widersprüchlichen Ergebnissen geführt hat. Als zuverlässige Methode wird die durchflusszytometrische Analyse des Musters spezifischer Oberflächenantigene empfohlen. Jedoch stellt die zuverlässige Tregs-Identifizierung aufgrund eines Mangels an Tregs-Markern immer noch eine Herausforderung dar. Tregs wurden somit, wie in diesem Versuch auf Basis ihrer CD4+CD25<sup>high</sup> Expression identifiziert, was aber auch dem Phänotyp von aktivierten T-Helferzellen entsprechen kann (92). Der intrazelluläre Transkriptionsfaktor FOX P3 wird spezifisch von CD4+ CD25+-Tregs exprimiert und koordiniert die Entwicklung und Funktion von Tregs. Es wird allerdings nicht empfohlen die Analyse und Identifikation von Tregs alleinig durch die Detektion von FOX P3 durchzuführen, da die ausschließlich intrazelluläre Expression eine starke Einschränkung eines zuverlässigen Ergebnisses darstellt (56). In diesem Versuch wurde die Veränderung von FOX P3 als weiteres Kriterium zur Identifikation von Tregs interpretiert. Es konnte eine durchschnittliche Vermehrung des Vorhandenseins von FOX P3 gemessen werden, demnach ist darauf zu schließen, dass die Bakterienzusammensetzung von Omni Biotic Panda® zu einer gesteigerten Genexpression von FOX P3 führt. In Kombination mit CD25 und CD4 zählt FOX P3 als spezifischer Transkriptionsfaktor für aktive Tregs, jedoch kann die Differenzierung andere Immunzellen anstatt der Proliferation der vorhandenen Tregs nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Mittlerweile sind als weitere Möglichkeit zur Identifikation von Tregs kommerziell erhältliche Anti-FOX P3 Antikörper, FJK-16s vorhanden. Dieser Antikörper soll die Identifikation und Lokalisation von FOX P3-Proteinen im Zellkern und somit Tregs im Blut und anderem

Gewebe erleichtern. Beim Schwein wurde eine spezifische Reaktion nachgewiesen (91), jedoch ist die interspezifische Funktion noch nicht ausreichend geklärt (92), weshalb hier immer noch die Identifikation der Oberflächenmarker empfohlen wird (56). Des Weiteren wird auch CD127 als Negativ-Marker für Tregs eingesetzt und eignet sich zur Differenzierung von Tregs und aktivierten CD25+ T-Zellen (93, 93, 94)

#### 4.2 OBP® führt zu einer Immunmodulation

Die immunmodulierenden Fähigkeiten der einzelnen Bakterienarten von OBP sind kaum untersucht. Deshalb werden die Bakteriengattungen in Hinblick auf den Einfluss der CD4 und CD25 Expression verglichen. Es wurde berichtet, dass *Bifidobacterium bifidum* in vitro die Differenzierung von humanen naiven T-Zellen zu funktionalen Tregs (CD25<sup>high</sup>FOX P3<sup>high</sup> CD127<sup>-low</sup>) anregt und in weiterer Folge zu einer besonders hohen IL-10 Sekretion führt (López et al. 2012). Durch dieses Potential kann die Zugabe von *B. bifidum* als sicheres und effektives Adjuvans in Immuntherapien genutzt werden. Ähnliche immunmodulierende Effekte wurden ebenso bei *Lactobacillus reuteri.*, *Lactobacillus casei* (95) und *B. animalis*-Stämmen (96) beobachtet. Gesammelt wurden diese Ergebnisse durch eine durchflusszytometrische Analyse (97), die in diesem Versuch nicht durchgeführt wurde. Jedoch konnte auch in unserem Versuch eine deutlich höhere FOX P3, CD4 und C25-Werte festgestellt werden und bestätigt somit die Tregs Differenzierung. Auch in Mäusen konnte der anregende Effekt von Bifidobakterien auf CD4+ CD25+ FOX P3+ T-Zellen durchflusszytometrisch bestätigt werden und hierbei stieg nicht nur die Quantität der Zellen, sondern auch die Funktionsfähigkeit der IL-10 Produktion (98). Eine andere Studie (99) zeigt eine gesteigerte Anzahl von CD4+FOX P3+ Tregs durch die Behandlung von *L. lactis*, was sich ebenfalls mit den Ergebnissen dieser Studie deckt. Neben Studien zur Beobachtung und Identifikation von Tregs wurde auch beobachtet, dass *L. lactis* indirekt die Aktivität von CD4+ T-Zellen in der Zytokinproduktion stärkt und somit die darauf basierte Immunität verbessert (100).

Unsere Hypothese, dass OBP® zu einer vermehrten Proliferation oder Differenzierung von T regulatorischen Zellen führt wurde aufgrund unserer Ergebnisse grundsätzlich bestätigt, allerdings bedarf es weiterer Versuche, um diese Hypothese zu untermauern. Beispielsweise ist es empfehlenswert die Auswirkungen in vivo nachvollziehen zu können da hier auch der große Faktor des Gastrointestinaltrakts und das individuelle Mikrobiom inkludiert ist. Außerdem sollten weitere Analysemethoden, wie die zusätzlichen Anwendung des anti-FOX P3 Antikörpers, sowie auch der CD127-Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie zurückgegriffen werden. Zukünftige Studien sollten zusätzlich eine verbesserte Analyse der

Untergruppen der T-regulatorischen Lymphozyten umfassen, um auch die immunologische Aktivität messen zu können und so unser Verständnis die Interaktion von Tregs und OBP® zu vertiefen.

#### 4.3 Praktische Implikationen

Probiotika sind in der Nutztierwirtschaft schon ein gut etablierter Bestandteil des Gesundheitsmanagements. Das Zufüttern von OBP® oder der Bakterienzusammensetzung von OBP® kann durch den Einfluss auf die T-Zell basierte Antwort nicht nur den individuellen Organismus unterstützen, sondern auch positive Auswirkung auf die Zuchtproduktion mit sich bringen. Da die intrauterine Umgebung bei der Schwangerschaft Th2-dominiert ist, kann eine Th1-Th2- Zytokin Inbalance zu einer Abstoßung des Fötus kommen (49). Um die mütterliche Immuntoleranz gegenüber dem Fötus zu steigern und so die Implantation, Plazentation und eine erfolgreiche Befruchtung zu unterstützen, kann OBP® zum Einsatz kommen und so die Anzahl der Konzeptionsverluste verringern. Mit dieser Methode können großen wirtschaftlichen Verlusten in der Nutztierhaltung auf mehreren Ebenen entgegengewirkt werden.

#### 5. Conclusio

Aufgrund der Ergebnisse dieser und früherer Studien wurde bestätigt, dass Probiotika in vielen Weisen das Immunsystem, speziell die T-Zellen basierte adaptive Immunantwort, nicht nur in der Quantität der Immunzellen sondern auch in der Qualität ihrer Aktivität stärken kann. Somit bietet die Anwendung von Probiotika, neben weiteren Hygiene- und Managementmaßnahmen eine gute Alternative zu Antibiotika, um wirtschaftlichen Verlusten in der Nutztierwirtschaft entgegenzuwirken. In diesem Versuch wurde überprüft ob OBP in der Lage ist, die Proliferation porciner T-regulatorische Lymphozyten anzuregen. Dafür wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie die Zellen mit den Oberflächenproteinen CD4 und CD25 gezählt. Zusätzlich wurde die Genexpression für CD25 und FOXP3 mittels qPCR gemessen. Zwar sind die Ergebnisse der Zellzählung für CD25 auf individueller Basis und im Vergleich zur Genexpression für CD25 widersprüchlich, dennoch ist festzustellen, dass es zu einer Immunmodulation kommt, die darauf hindeutet, dass die Behandlung mit OBP zu einer gesteigerten Proliferation von T-regulierenden-Zellen führt.

## 6. Anhang

Der Anhang mit Materialien, Ergebnissen und dazugehörigen Berechnungen sind im folgenden Link zu entnehmen:

[https://drive.google.com/drive/folders/10zQLh8qYfaW1K3wH2ql34\\_rnXiztA-rw?usp=sharing](https://drive.google.com/drive/folders/10zQLh8qYfaW1K3wH2ql34_rnXiztA-rw?usp=sharing)



## 6.1 Abkürzungsverzeichnis

AGP	antibiotic growth promoter = Antibiotikafutterzusatz
APC	<i>Allophycocyanin</i>
B.	<i>Bifidobacterium</i>
CD	cluster of differentiation
cDNA	copy DNA
Ct	Cycle threshold
Cy5	Sulfo-Cyanine5
DAPI	Dihydrochlorid
ddCt	Delta delta Cycle thresholds
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor = epidermaler Wachstumsfaktor
EGF-LL	Wachstumsfaktoren-induzierendes- <i>L. lactis</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enterotoxische <i>E. coli</i>
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations = Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen
FOX P3	Forkhead Box P3
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GALT	gut-associated lymphoid tissue
Goi	Gene of interest
IBD	inflammatory bowel disease
IBS	inflammatory bowel syndrom
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobuline
IL	Interleukin
LAB	lactic acid bacteria = Milchsäurebakterien
L.	<i>Lactococcus</i>
NF	Nekrosefaktor
OAZ1	Ornithindecaboxylase-Antizym
OBP	OMNi-BiOTiC® PANDA
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCOS	polyzystischen Ovarialsyndrom
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PWD	post weaning diarrhoea
qPCR	quantitative polymerase chain reaction = Real Time Quantitative PCR
RFP	Red fluorescent Protein
RFU	Relative Fluoreszineinheit
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
S	Schwein
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
T-reg	regulatorischen T-Zellen
USDA	Landwirtschaftsministerium der Vereinigten Staaten
MIC	Minimum inhibitory concentration
WHO	World health organisation

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:Entwicklung des Schweinebestands in Österreich.....	6
Abbildung 2:Entwicklung der Viehbestände im Vergleich.....	6
Abbildung 3:Konsum von Fleisch weltweit nach Fleischart in den Jahren 2012 bis 2023.....	7
Abbildung 4:Verkaufte Antibiotika-Mengen in der Veterinärmedizin nach Wirkstoffgruppen für die Jahre 2017-2021 in Tonnen .....	10
Abbildung 5:Vergleich von Gesichtsfeldern in Vergrößerung x4.....	23
Abbildung 6:Zellzählung mit ImageJ® anhand des Beispiels einer behandelten Probe.....	23
Abbildung 7:Beispiel DAPI-Färbung.....	24
Abbildung 8:Beispiel CD25-Färbung.....	24
Abbildung 9:Beispiel CD24-Färbung.....	24
Abbildung 10:Beispiel der Auswertung CD25 positiven Zellen in CD25 <sup>high</sup> und CD25 <sup>dim</sup> .....	25
Abbildung 11:Prozentuelle Aufteilung der Lymphozyten im peripheren Blut pro Schwein ....	28
Abbildung 12:Überblick zur Entwicklung der CD4-und CD25-Expression.....	30
Abbildung 13a:Entwicklung der CD4-Expression .....	31
Abbildung 13b:Entwicklung der CD25-Expression .....	31
Abbildung 14:Vergleich der Entwicklung der CD25 Aufteilung in CD25 <sup>high</sup> und CD25 <sup>dim</sup> .....	31
Abbildung 15a:Punktdiagramm zur Übersicht der Lymphozyten-Population im Vergleich ....	32
Abbildung 15b:Punktdiagramm zur Übersicht der Schweine 1-4.....	32
Abbildung 16:Genexpression CD25.....	33
Abbildung 17: Genexpression FOX P3 .....	33
Abbildung 18a:Relative Expression FOX P3 im Vergleich Schwein 1-4 .....	34
Abbildung 18b:Relative Expression FOX P3 im Vergleich Kontrolle und Behandlung .....	34
Abbildung 19a: Relative Expression CD25 im Vergleich Schwein 1-4.....	36
Abbildung 19b: Relative Expression CD25 im Vergleich Kontrolle und Behandlung.....	36
Abbildung 20:IL-10 Produktion von CD4+CD25-T-Zell Untergruppen .....	39

## 6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Fleischanfall in Tonnen 2016 bis 2020 .....	7
Tabelle 2 Verwendete Primersequenzen .....	26
Tabelle 3: Aufteilung der Lymphozyten in Prozent für Schwein 1-4.....	29

## Literaturverzeichnis

1. Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Regionen und Wasserwirtschaft. Tierische Produktion 2022: Tabellensammlung 2022.
2. Jensen P, Recén B. When to wean — Observations from free-ranging domestic pigs. *Applied Animal Behaviour Science* 1989; 23(1-2):49–60. doi: 10.1016/0168-1591(89)90006-3.
3. Gresse R, Chaucheyras-Durand F, Fleury MA, van de Wiele T, Forano E, Blanquet-Diot S. Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health. *Trends Microbiol* 2017; 25(10):851–73. doi: 10.1016/j.tim.2017.05.004.
4. Nehf H, Dr. Stalljohann G, Pohl C, Riewenherm G, Feller B, Dr. Kampf D. Fütterung und Tierwohl bei Schweinen: Teil A: Futter, Fütterung und Faserstoffversorgung. DLG e.V. Fachzentrum Landwirtschaft 2021; (463) [Stand: 10.09.2023]. Verfügbar unter: [https://www.dlg.org/fileadmin/downloads/landwirtschaft/themen/publikationen/merkblaetter/dlg-merkblatt\\_463.pdf](https://www.dlg.org/fileadmin/downloads/landwirtschaft/themen/publikationen/merkblaetter/dlg-merkblatt_463.pdf).
5. Eriksen EØ, Kudirkiene E, Barington K, Goecke NB, Blirup-Plum SA, Nielsen JP et al. An observational field study of porcine post-weaning diarrhea: clinical and microbiological findings, and fecal pH-measurements as a potential diagnostic tool. *Porcine Health Manag* 2023; 9(1):33. doi: 10.1186/s40813-023-00325-x.
6. Molinari BLD, Possatti F, Lorenzetti E, Alfieri AF, Alfieri AA. Unusual outbreak of post-weaning porcine diarrhea caused by single and mixed infections of rotavirus groups A, B, C, and H. *Vet Microbiol* 2016; 193:125–32. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.08.014.
7. Melin L, Mattsson S, Katouli M, Wallgren P. Development of post-weaning diarrhoea in piglets. Relation to presence of *Escherichia coli* strains and rotavirus. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2004; 51(1):12–22. doi: 10.1111/j.1439-0450.2003.00723.x.
8. Patil AK, Kumar S, Verma AK, Baghel RPS. Probiotics as Feed Additives in Weaned Pigs: A Review; 2015. ( Bd. 3). Verfügbar unter: [https://www.researchgate.net/profile/ashok-patil-2/publication/306395070\\_probiotics\\_as\\_feed\\_additives\\_in\\_weaned\\_pigs\\_a\\_review](https://www.researchgate.net/profile/ashok-patil-2/publication/306395070_probiotics_as_feed_additives_in_weaned_pigs_a_review).
9. Campbell JM, Crenshaw JD, Polo J. The biological stress of early weaned piglets. *J Anim Sci Biotechnol* 2013; 4(1):19. doi: 10.1186/2049-1891-4-19.
10. Rhouma M, Fairbrother JM, Beaudry F, Letellier A. Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Vet Scand* 2017; 59(1):31. doi: 10.1186/s13028-017-0299-7.
11. Canibe N, Højberg O, Kongsted H, Vodolazska D, Lauridsen C, Nielsen TS et al. Review on Preventive Measures to Reduce Post-Weaning Diarrhoea in Piglets. *Animals (Basel)* 2022; 12(19). doi: 10.3390/ani12192585.
12. Page SW, Gautier P. Use of antimicrobial agents in livestock. *Rev Sci Tech* 2012; 31(1):145–88. doi: 10.20506/rst.31.1.2106.
13. Wegener HC. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6(5):439–45. doi: 10.1016/j.mib.2003.09.009.
14. Diana A, Manzanilla EG, Calderón Díaz JA, Leonard FC, Boyle LA. Do weaner pigs need in-feed antibiotics to ensure good health and welfare? *PLoS One* 2017; 12(10):e0185622. doi: 10.1371/journal.pone.0185622.
15. Plata G, Baxter NT, Susanti D, Volland-Munson A, Gangaiah D, Nagireddy A et al. Growth promotion and antibiotic induced metabolic shifts in the chicken gut microbiome. *Commun Biol* 2022; 5(1):293. doi: 10.1038/s42003-022-03239-6.
16. Dibner JJ, Richards JD. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult Sci* 2005; 84(4):634–43. doi: 10.1093/ps/84.4.634.
17. Broom LJ. The sub-inhibitory theory for antibiotic growth promoters. *Poult Sci* 2017; 96(9):3104–8. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28595312/>.
18. Unno T, Kim J-M, Guevarra RB, Nguyen SG. Effects of antibiotic growth promoter and characterization of ecological succession in Swine gut microbiota. *J Microbiol Biotechnol* 2015; 25(4):431–8. doi: 10.4014/jmb.1408.08063.
19. Brown K, Uwiera RRE, Kalmokoff ML, Brooks SPJ, Inglis GD. Antimicrobial growth promoter use in livestock: a requirement to understand their modes of action to develop effective alternatives. *Int J Antimicrob Agents* 2017; 49(1):12–24. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.08.006.
20. Gùths MF, Siqueira HA, Montes JH, Moreira F, Rizzoto G, Peripolli V et al. Removal or substitution of in feed antimicrobials in swine production. *Preventive veterinary medicine* 2022; 205:105696. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35753200/>.
21. Mungroo NA, Neethirajan S. Biosensors for the Detection of Antibiotics in Poultry Industry—A Review. *Biosensors (Basel)* 2014; 4(4):472–93. doi: 10.3390/bios4040472.
22. Sørum H, Sunde M. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Vet Res* 2001; 32(3-4):227–41. doi: 10.1051/vetres:2001121.

23. van den Bogaard AE, Stobberingh EE. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 14(4):327–35. doi: 10.1016/S0924-8579(00)00145-X.
24. Chantziaras I, Boyen F, Callens B, Dewulf J. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69(3):827–34. doi: 10.1093/jac/dkt443.
25. Ma F, Xu S, Tang Z, Li Z, Zhang L. Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. *Biosafety and Health* 2021; 3(1):32–8. doi: 10.1016/j.bsheal.2020.09.004.
26. Bates J, Jordens JZ, Griffiths DT. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. *J Antimicrob Chemother* 1994; 34(4):507–14. doi: 10.1093/jac/34.4.507.
27. Sarmah AK, Meyer MT, Boxall ABA. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 2006; 65(5):725–59. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.03.026.
28. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003; 2003.
29. Phillips I. Withdrawal of growth-promoting antibiotics in Europe and its effects in relation to human health. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30(2):101–7. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.02.018.
30. Wierup M. The Swedish experience of the 1986 year ban of antimicrobial growth promoters, with special reference to animal health, disease prevention, productivity, and usage of antimicrobials. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)* 2001; 7(2):183–90. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11442345/>.
31. Casewell M, Friis C, Marco E, McMullin P, Phillips I. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52(2):159–61. doi: 10.1093/jac/dkg313.
32. Kyung-Hyo D, Jae-Won B, Wan-Kyu L. Antimicrobial Resistance Profiles of *Escherichia coli* from Diarrheic Weaned Piglets after the Ban on Antibiotic Growth Promoters in Feed. *Antibiotics (Basel)* 2020; 9(11). doi: 10.3390/antibiotics9110755.
33. Cremon C, Barbaro MR, Ventura M, Barbara G. Pre- and probiotic overview. *Curr Opin Pharmacol* 2018; 43:87–92. doi: 10.1016/j.coph.2018.08.010.
34. Du T, Lei A, Zhang N, Zhu C. The Beneficial Role of Probiotic *Lactobacillus* in Respiratory Diseases. *Front Immunol* 2022; 13:908010. doi: 10.3389/fimmu.2022.908010.
35. Mazziotta C, Tognon M, Martini F, Torreggiani E, Rotondo JC. Probiotics Mechanism of Action on Immune Cells and Beneficial Effects on Human Health. *Cells* 2023; 12(1). doi: 10.3390/cells12010184.
36. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Joint FAO/WHO Expert Consultation on [Stand: 27.07.2023]. Verfügbar unter: <https://www.fao.org/3/y6398e/y6398e.pdf>.
37. Sanders ME, Akkermans LMA, Haller D, Hammerman C, Heimbach J, Hörmannspurger G et al. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes* 2010; 1(3):164–85. doi: 10.4161/gmic.1.3.12127.
38. Kneifel W. Entwicklung und Qualitätsmerkmale von Probiotika; 2005 [Stand: 27.07.2023]. Verfügbar unter: [https://www.lohmann-information.com/content/l\\_i\\_1\\_05\\_artikel4.pdf](https://www.lohmann-information.com/content/l_i_1_05_artikel4.pdf).
39. BgVV. Abschlussbericht der Arbeitsgruppe Probiotische Mikroorganismenkulturen in Lebensmitteln Oktober 1999 [Stand: 27.07.2023]. Verfügbar unter: <https://mobil.bfr.bund.de/cm/343/probiot.pdf>.
40. Pandey KR, Naik SR, Vakil BV. Probiotics, prebiotics and synbiotics - a review. *J Food Sci Technol* 2015; 52(12):7577–87. doi: 10.1007/s13197-015-1921-1.
41. He Y, Kim K, Kovanda L, Jinno C, Song M, Chase J et al. *Bacillus subtilis*: a potential growth promoter in weaned pigs in comparison to carbadox. *J Anim Sci* 2020; 98(9). doi: 10.1093/jas/skaa290.
42. Xu B, Fu J, Zhu L, Li Z, Jin M, Wang Y. Overall assessment of antibiotic substitutes for pigs: a set of meta-analyses. *J Anim Sci Biotechnol* 2021; 12(1):3. doi: 10.1186/s40104-020-00534-2.
43. Yang F, Hou C, Zeng X, Qiao S. The use of lactic Acid bacteria as a probiotic in Swine diets. *Pathogens* 2015; 4(1):34–45. doi: 10.3390/pathogens4010034.
44. Fanelli D. Negative results are disappearing from most disciplines and countries. *Scientometrics* 2012; 90(3):891–904. doi: 10.1007/s11192-011-0494-7.
45. Trevisi P, Latorre R, Priori D, Luise D, Archetti I, Mazzoni M et al. Effect of feed supplementation with live yeast on the intestinal transcriptome profile of weaning pigs orally challenged with *Escherichia coli* F4. *Animal* 2017; 11(1):33–44. doi: 10.1017/S1751731116001178.

46. Verna EC, Lucak S. Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? *Therap Adv Gastroenterol* 2010; 3(5):307–19. doi: 10.1177/1756283X10373814.
47. Siepert B, Reinhardt N, Kreuzer S, Bondzio A, Twardziok S, Brockmann G et al. Enterococcus faecium NCIMB 10415 supplementation affects intestinal immune-associated gene expression in post-weaning piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 2014; 157(1-2):65–77. doi: 10.1016/j.vetimm.2013.10.013.
48. Kreuzer S, Janczyk P, Assmus J, Schmidt MFG, Brockmann GA, Nöckler K. No beneficial effects evident for Enterococcus faecium NCIMB 10415 in weaned pigs infected with Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78(14):4816–25. doi: 10.1128/AEM.00395-12.
49. Steyer GE, Sartor H. Allergieprävention: Risikoreduktion durch Multispezies-Probiotika. *Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen* 2010:54–6 [Stand: 03.08.2023]. Verfügbar unter: <https://www.kup.at/kup/pdf/9203.pdf>.
50. OMNi-BiOTiC®. OMNi-BiOTiC® PANDA - Ein guter Start für Mutter und Kind | AT; 2023 [Stand: 18.07.2023]. Verfügbar unter: <https://www.omni-biotic.com/at/produkte/omni-biotic-panda/>.
51. Hofmann H, Diepold A, List K. Ein-Jahres-Zwischenergebnisse der OMNi-BiOTiC® Panda Evaluierung. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2014; 74(05). doi: 10.1055/s-0034-1374772.
52. Fiocchi A, Cabana MD, Mennini M. Current Use of Probiotics and Prebiotics in Allergy. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2022; 10(9):2219–42. doi: 10.1016/j.jaip.2022.06.038.
53. Böhm I, Bauer R. Th1-Zellen, Th2-Zellen und atopische Dermatitis. *Hautarzt* 1997; 48(4):223–7. doi: 10.1007/s001050050573.
54. Corthay A. How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol* 2009; 70(4):326–36. doi: 10.1111/j.1365-3083.2009.02308.x.
55. Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(12):849–59. doi: 10.1038/nri2889.
56. Ciccocioppo F, Lanuti P, Pierdomenico L, Simeone P, Bologna G, Ercolino E et al. The Characterization of Regulatory T-Cell Profiles in Alzheimer's Disease and Multiple Sclerosis. *Sci Rep* 2019; 9(1):8788. doi: 10.1038/s41598-019-45433-3.
57. Dowarah R, Verma AK, Agarwal N. The use of Lactobacillus as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs: A review. *Anim Nutr* 2017; 3(1):1–6. doi: 10.1016/j.aninu.2016.11.002.
58. Liu Y, Espinosa CD, Abelilla JJ, Casas GA, Lagos LV, Lee SA et al. Non-antibiotic feed additives in diets for pigs: A review. *Anim Nutr* 2018; 4(2):113–25. doi: 10.1016/j.aninu.2018.01.007.
59. Liao SF, Nyachoti M. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Anim Nutr* 2017; 3(4):331–43. doi: 10.1016/j.aninu.2017.06.007.
60. Roura E, Koopmans S-J, Lallès J-P, Le Huerou-Luron I, Jager N de, Schuurman T et al. Critical review evaluating the pig as a model for human nutritional physiology. *Nutr Res Rev* 2016; 29(1):60–90. doi: 10.1017/S0954422416000020.
61. Ku S, Park MS, Ji GE, You HJ. Review on Bifidobacterium bifidum BGN4: Functionality and Nutraceutical Applications as a Probiotic Microorganism. *Int J Mol Sci* 2016; 17(9). doi: 10.3390/ijms17091544.
62. Turrone F, Duranti S, Milani C, Lugli GA, van Sinderen D, Ventura M. Bifidobacterium bifidum: A Key Member of the Early Human Gut Microbiota. *Microorganisms* 2019; 7(11). doi: 10.3390/microorganisms7110544.
63. Cheng J, Laitila A, Ouwehand AC. Bifidobacterium animalis subsp. lactis HN019 Effects on Gut Health: A Review. *Front Nutr* 2021; 8:790561. doi: 10.3389/fnut.2021.790561.
64. Marras L, Caputo M, Bisicchia S, Soato M, Bertolino G, Vaccaro S et al. The Role of Bifidobacteria in Predictive and Preventive Medicine: A Focus on Eczema and Hypercholesterolemia. *Microorganisms* 2021; 9(4). doi: 10.3390/microorganisms9040836.
65. Zhang J, Sun Z, Jiang S, Bai X, Ma C, Peng Q et al. Probiotic Bifidobacterium lactis V9 Regulates the Secretion of Sex Hormones in Polycystic Ovary Syndrome Patients through the Gut-Brain Axis. *mSystems* 2019; 4(2). doi: 10.1128/msystems.00017-19.
66. Cao J, Amakye WK, Qi C, Liu X, Ma J, Ren J. Bifidobacterium Lactis Probio-M8 regulates gut microbiota to alleviate Alzheimer's disease in the APP/PS1 mouse model. *Eur J Nutr* 2021; 60(7):3757–69. doi: 10.1007/s00394-021-02543-x.
67. Cavanagh D, Fitzgerald GF, McAuliffe O. From field to fermentation: the origins of Lactococcus lactis and its domestication to the dairy environment. *Food Microbiol* 2015; 47:45–61. doi: 10.1016/j.fm.2014.11.001.
68. Burakova I, Smirnova Y, Gryaznova M, Syromyatnikov M, Chizhkov P, Popov E et al. The Effect of Short-Term Consumption of Lactic Acid Bacteria on the Gut Microbiota in Obese People. *Nutrients* 2022; 14(16). doi: 10.3390/nu14163384.

69. Wolfe W, Xiang Z, Yu X, Li P, Chen H, Yao M et al. The Challenge of Applications of Probiotics in Gastrointestinal Diseases. *Advanced Gut & Microbiome Research* 2023; 2023:1–10. doi: 10.1155/2023/1984200.
70. Siddiqui R, Makhlof Z, Alharbi AM, Alfahemi H, Khan NA. The Gut Microbiome and Female Health. *Biology (Basel)* 2022; 11(11). doi: 10.3390/biology11111683.
71. Moreno LeBlanc A de, LeBlanc JG, Perdígón G, Miyoshi A, Langella P, Azevedo V et al. Oral administration of a catalase-producing *Lactococcus lactis* can prevent a chemically induced colon cancer in mice. *Journal of Medical Microbiology* 2008; 57(Pt 1):100–5. Verfügbar unter: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.47403-0>.
72. Li Q, Zheng T, Ding H, Chen J, Li B, Zhang Q et al. Exploring the Benefits of Probiotics in Gut Inflammation and Diarrhea—From an Antioxidant Perspective. *Antioxidants (Basel)* 2023; 12(7). doi: 10.3390/antiox12071342.
73. Pang J, Liu Y, Kang L, Ye H, Zang J, Wang J et al. *Bifidobacterium animalis* Promotes the Growth of Weaning Piglets by Improving Intestinal Development, Enhancing Antioxidant Capacity, and Modulating Gut Microbiota. *Appl Environ Microbiol* 2022; 88(22):e0129622. doi: 10.1128/aem.01296-22.
74. Yao S, Zhao Z, Wang W, Liu X. *Bifidobacterium Longum*: Protection against Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol Res* 2021; 2021:8030297. doi: 10.1155/2021/8030297.
75. Yu D, Xia Y, Ge L, Tan B, Chen S. Effects of *Lactococcus lactis* on the Intestinal Functions in Weaning Piglets. *Front Nutr* 2021; 8:713256. doi: 10.3389/fnut.2021.713256.
76. Bedford A, Huynh E, Fu M, Zhu C, Wey D, Lange C de et al. Growth performance of early-weaned pigs is enhanced by feeding epidermal growth factor-expressing *Lactococcus lactis* fermentation product. *J Biotechnol* 2014; 173:47–52. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.01.012.
77. Kang P, Toms D, Yin Y, Cheung Q, Gong J, Lange K de et al. Epidermal growth factor-expressing *Lactococcus lactis* enhances intestinal development of early-weaned pigs. *J Nutr* 2010; 140(4):806–11. doi: 10.3945/jn.109.114173.
78. Bedford A, Li Z, Li M, Ji S, Liu W, Huai Y et al. Epidermal growth factor-expressing *Lactococcus lactis* enhances growth performance of early-weaned pigs fed diets devoid of blood plasma. *J Anim Sci* 2012; 90 Suppl 4:4–6. doi: 10.2527/jas.53973.
79. Naudin CR, Maner-Smith K, Owens JA, Wynn GM, Robinson BS, Matthews JD et al. *Lactococcus lactis* Subspecies *cremoris* Elicits Protection Against Metabolic Changes Induced by a Western-Style Diet. *Gastroenterology* 2020; 159(2):639–651.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2020.03.010.
80. Kelly B, Pearce EL. Amino Assets: How Amino Acids Support Immunity. *Cell Metab* 2020; 32(2):154–75. doi: 10.1016/j.cmet.2020.06.010.
81. Hou N, Du X, Wu S. Advances in pig models of human diseases. *Animal Model Exp Med* 2022; 5(2):141–52. doi: 10.1002/ame2.12223.
82. Studer SM, Joseph S. Binding of mRNA to the bacterial translation initiation complex. *Methods Enzymol* 2007; 430:31–44. doi: 10.1016/S0076-6879(07)30002-5.
83. Red Fluorescent Protein (RFP) | Thermo Fisher Scientific - AT; 2023 [Stand: 08.10.2023]. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/at/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/red-fluorescent-protein.html>.
84. FluoroFinder; 2024 [Stand: 13.02.2024]. Verfügbar unter: <https://app.fluorofinder.com/dyes/30-pe-ex-max-565-nm-em-max-578-nm>.
85. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) | Thermo Fisher Scientific - AT; 2023 [Stand: 08.10.2023]. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/at/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/dapi-stain.html>.
86. Duvigneau JC, Hartl RT, Groiss S, Gemeiner M. Quantitative simultaneous multiplex real-time PCR for the detection of porcine cytokines. *J Immunol Methods* 2005; 306(1-2):16–27. doi: 10.1016/j.jim.2005.06.021.
87. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4):402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
88. Starke IC, Pieper R, Neumann K, Zentek J, Vahjen W. Individual responses of mother sows to a probiotic *Enterococcus faecium* strain lead to different microbiota composition in their offspring. *Benef Microbes* 2013; 4(4):345–56. doi: 10.3920/BM2013.0021.
89. Murphy KM, Weaver C. *Janeway Immunologie*. 9. Aufl. Berlin: Springer Spektrum; 2018.
90. Käser T, Gerner W, Hammer SE, Patzl M, Saalmüller A. Phenotypic and functional characterisation of porcine CD4(+)CD25(high) regulatory T cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2008; 122(1-2):153–8. doi: 10.1016/j.vetimm.2007.08.002.

91. Bolzer K, Käser T, Saalmüller A, Hammer SE. Molecular characterisation of porcine Forkhead-box p3 (Foxp3). *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 132(2-4):275–81. doi: 10.1016/j.vetimm.2009.05.014.
92. Käser T, Gerner W, Hammer SE, Patzl M, Saalmüller A. Detection of Foxp3 protein expression in porcine T lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 2008; 125(1-2):92–101. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.05.007.
93. Banham AH. Cell-surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP3(+) regulatory T cells. *Trends Immunol* 2006; 27(12):541–4. doi: 10.1016/j.it.2006.10.002.
94. Dawson HD, Lunney JK. Porcine cluster of differentiation (CD) markers 2018 update. *Res Vet Sci* 2018; 118:199–246. doi: 10.1016/j.rvsc.2018.02.007.
95. Smits HH, Engering A, van der Kleij D, Jong EC de, Schipper K, van Capel TMM et al. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115(6):1260–7. doi: 10.1016/j.jaci.2005.03.036.
96. Falalyeyeva TM, Leschenko IV, Beregova TV, Lazarenko LM, Savchuk OM, Sichel LM et al. Probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria alter pro- and anti-inflammatory cytokines production in rats with monosodium glutamate-induced obesity. *Fiziol Zh (1994)* 2017; 63(1):17–25. doi: 10.15407/fz63.01.017.
97. López P, González-Rodríguez I, Sánchez B, Gueimonde M, Margolles A, Suárez A. Treg-inducing membrane vesicles from *Bifidobacterium bifidum* LMG13195 as potential adjuvants in immunotherapy. *Vaccine* 2012; 30(5):825–9. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.11.115.
98. Zhao H-M, Huang X-Y, Zuo Z-Q, Pan Q-H, Ao M-Y, Zhou F et al. Probiotics increase T regulatory cells and reduce severity of experimental colitis in mice. *World J Gastroenterol* 2013; 19(5):742–9. doi: 10.3748/wjg.v19.i5.742.
99. Rezende RM, Oliveira RP, Medeiros SR, Gomes-Santos AC, Alves AC, Loli FG et al. Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4+LAP+ regulatory T cells. *J Autoimmun* 2013; 40:45–57. doi: 10.1016/j.jaut.2012.07.012.
100. Saito S, Okuno A, Kakizaki N, Maekawa T, Tsuji NM. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* C60 induces macrophages activation that enhances CD4+ T cell-based adaptive immunity. *Biosci Microbiota Food Health* 2022; 41(3):130–6. doi: 10.12938/bmfh.2021-057.
101. Statistik Austria. Lebend- & Schlachtgewichte 2020.
102. Statista. Fleischkonsum weltweit nach Fleischart bis 2023 | Statista; 2023 [Stand: 19.07.2023]. Verfügbar unter: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/296612/umfrage/konsum-von-fleisch-weltweit-nach-fleischart/>.
103. AGES. AGES - Antibiotika-Vertriebsmengen in der Veterinärmedizin in Österreich; 2023 [Stand: 04.08.2023]. Verfügbar unter: <https://www.ages.at/tier/tierarzneimittel-hormone/antibiotika-vertriebsmengen-in-der-veterinaermedizin>.