

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen der
Veterinärmedizinischen Universität Wien, Institut für Tierernährung und funktionelle
Pflanzenstoffe (Leiter: Univ.-Prof. Dr.sc.agr. Qendrim Zebeli)

Untersuchung der immunmodulatorischen Effekte von Probiotika auf primär kultivierte equine Immunzellen

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Sonja Männer BSc

Wien, Mai 2023

Wissenschaftliche Betreuerin: Assistenz Professorin Dr. rer. agr. Susanne Kreuzer-Redmer

Gutachterin: Ass.-Prof. Dr.med.vet. Franziska Dengler

Abkürzung

ConA	Concanavalin A
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E.faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
EFSA	European Food and Drug Agency
ePL	Equines Platelet Lysate
<i>ETEC</i>	<i>Escherichia coli K88</i>
FBS	Fötale bovines Serum
Fiaf	induced adipozyten Faktor
h (24h,48h,...)	hour (engl.) Stunde
LPS	Lipopolysaccharide
ml	Milliliter
PAMPS	pathogen associated molecular patterns
PBMCs	mononukleäre Leukozyten aus dem Blut (Peripheral blood mononuclear cells)
PBS	phosphatgepufferten Kochsalzlösung
PPRs	pattern recognition receptors Muster-Erkennungs-Rezeptoren
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
rpm	rounds per minute
scRNA-Seq	Einzel-Zell-RNA Sequenzierung

TLRs	toll-like Rezeptoren
°C	Grad Celsius

1	Ziel der Studie	1
2	Einleitung	2
2.1	Immunsystem des Pferdes	3
2.2	Probiotika	4
2.3	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	6
2.4	<i>Enterococcus faecium</i>	7
2.5	Probiotika beim Pferd	9
2.6	Probiotika als Futtermittelzusatzstoff	10
3	Material	11
3.1	Probenmaterial	11
3.2	Verwandtschaftsgrade der biologischen Replikate	12
3.3	Seren	13
3.4	Geräte	13
3.5	Medien und Reagenzien	14
4	Methoden	15
4.1	Zellkultivierung	17
4.2	Incucyte®	17
4.3	Messung der Viabilität und Proliferation	19
5	Vorexperiment	20
5.1	Ergebnisse	20
5.1.1	PBMCs mit ConA im Vergleich der genutzten Seren (Schwein, Rind, Pferd, Human, ePL)	23
5.1.2	PBMCs mit LPS im Vergleich der genutzten Seren (Schwein, Rind, Pferd, Human, ePL)	23
5.1.3	PBMCs in der Kontrollgruppe im Vergleich der genutzten Seren (Schwein, Rind, Pferd, Human, ePL)	24
5.2	Ähnlichkeitsfaktor equines Serum zu FBS	25
5.3	Korrelationskoeffizient	26
5.4	Geschlechtsbezogener Zusammenhang	27
5.4.1	ConA	28
5.4.2	LPS	29
5.4.3	Kontrollgruppe	30
5.5	Diskussion und weitere Schritte	31
6	Ergebnisse Hauptexperiment	33
6.1	Einleitung	33

6.2	Zellzählung mit Countess-Zellzähler in verschiedenen Seren	33
6.2.1	Ergebnisse nach 24h	33
6.2.2	Ergebnisse nach 48h	34
6.2.3	Ergebnisse nach 72h	35
6.3	Ergebnisse im Incucyte®	36
6.3.1	Ergebnisse in allen Gruppen	37
6.4	Linearität	39
6.5	Korrelationskoeffizient	40
6.6	Diskussion der Ergebnisse des Hauptexperimentes	40
7	Zusammenfassung	43
8	Abstract	44
9	Abbildungsverzeichnis	45
10	Quellen	47

1 Ziel der Studie

Ziel dieser Studie ist es, die immunmodulatorischen Effekte der Bakterienstämme *Enterococcus faecium* DSM10663/NCIMB 10415 (*E.f.*) und *Lactobacillus acidophilus* CECT 4529 (*L.a.*) auf equine Immunzellen zu untersuchen. In den folgenden Experimenten soll daher die Immunantwort equiner, peripherer Blut Leukozyten (PBMCs) in Zellkultur analysiert werden. Die PBMCs werden dafür in zwei verschiedenen Seren kultiviert, sowie auch als positiv Kontrolle mit dem T-Zell Mitogen Concanavalin A stimuliert. Die Immunreaktivität wird anhand zweier Kriterien bestimmt: die absolute Anzahl der lebenden Zellen und die prozentuelle Zellzunahme über die Zeit. Dies wird auf zwei verschiedene Methoden gemessen: mit einem Countess Zellzähler (Thermo Fischer Scientific) und mit einem Live-Cell-Imaging System (Incucyte® S3), direkt im Inkubator.

Da PBMCs sehr sensible Zellen sind, die nur schwer über längere Zeit in Kultur gehalten werden können, war ein Vorexperiment wichtig, um ihnen optimale Kulturbedingungen zu ermöglichen. Im Rahmen dieses Experimentes wurden verschiedene Nährmedien getestet und die Reaktion der Zellen mit den im vorangegangenen Absatz erwähnten Methoden gemessen. Die zwei Seren mit den besten Messwerten (lebender Zellen) wurden in weiterer Folge für das zweite Experiment mit den Bakterienstämmen verwendet.

Dieser Versuchsaufbau soll Forschungen am lebenden Tier reduzieren und trotzdem einen Einblick in das equine Immunsystem liefern. Die in diesem Pilotprojekt gewonnenen Ergebnisse immunmodulierender Futtermitteladditiva *in vitro* könnten in Zukunft dem equinen Organismus *in vivo* gesundheitliche Vorteile ermöglichen.

Hypothesen:

Probiotische Bakterien haben die Fähigkeit Zellen des equinen Immunsystems zu stimulieren und können somit zu einem verbesserten Immunstatus des Pferdes beitragen. Dieser Effekt soll in *in vitro* mit Hilfe von equinen peripheren Blutmonozyten erforscht werden. Damit diese Zellen eine längere Lebensdauer aufweisen, wird im Vorversuch das beste Nährmedium für sie ermittelt. Die zwei Medien, mit denen die besten Resultate in Bezug auf Anzahl und Langlebigkeit der Zellen erzielt wurden, werden für den Hauptversuch verwendet, in welchem die Auswirkung von Probiotika auf equine Immunzellen erforscht wird.

2 Einleitung

Über die Bereicherung als Freizeitpartner hinaus, haben Pferde für die heimische Wirtschaft auch eine relevante wirtschaftliche Bedeutung. Laut der Studie vom Industriewissenschaftlichen Institut mit Sitz in Wien, generierte der Wirtschaftsfaktor Pferd eine Wertschöpfung von rund 1,1 Mrd. Euro (Wert 2018), das sind ca. 8.600,- Euro je Pferd und Jahr. Mit über 24.000 Arbeitsplätzen (das ist im Vergleich die Anzahl der Einwohner von Bregenz) hat das Pferd einen nennenswerten Anteil am Arbeitsmarkt. Dies betrifft alle Wirtschaftssektoren, vom primären Sektor (Pferdezucht, Pferdenahrung,...) bis zum tertiären Sektor der Dienstleistungen rund ums Pferd wie Veranstaltungen, Tiergärten, Reitclubs (Industriewissenschaftliches Institut et al. 2019).

In der folgenden Arbeit über das Gebiet Pferdeernährung soll vor allem der Einfluss von Probiotika auf die zelluläre Immunantwort des Pferdes untersucht werden. Da in verschiedenen Studien, vom Menschen bis zur Biene, die positiven Effekte dieses Supplements auf das Immunsystem belegt werden konnten, soll diese Arbeit einen Beitrag zur Forschung am equinen Immunsystem liefern. Umso größer unser Verständnis über die komplexen Zusammenhänge von Ernährung und Immunsystem ist, umso besser sind wir in der Lage, den Freizeit- und Wirtschaftspartner „Pferd“ gesund zu erhalten.

Die ersten domestizierten Pferde der Nomaden Völker in der russischen Steppe wurden vermutlich mit dem gefüttert, was die Vegetation hergab. Hier unterschied sich die Ernährung nicht wesentlich von der der Wildpferde. Im 2. Jahrtausend vor Christus verbreitete sich das Pferd, welches nun intensiv als Arbeits- und Reittier genutzt wurde, Richtung Fruchtbaren Halbmond und bis nach China. Der hohe Arbeitseinsatz des Pferdes forderte mehr Energie ein, als über herkömmliche Ernährung mit Gras und Heu gedeckt werden konnte. Durch den Übergang vom Nomadentum zum Ackerbau, konnten energiedichtere Futtermittel genutzt werden. Eine der ersten Berichte über die Fütterung von Getreide ist im Kikkuli Text aus dem 14. Jhd. vor Christus zu lesen: *„Sobald man die Pferde ausspannt, versorgt man sie mit Wasser, dann vermischt man ihnen 3 Hand Weizen, 2 Hand Gerste und 5 Hand Heu ...“* Obwohl schon früh ungefähre Vorstellung über bedarfsgerechte Fütterung bestand, begann die Forschung an der Verdauungsphysiologie erst im 19. Jahrhundert. Das Interesse war groß, da Pferde vor allem beim Militär eine wichtige Arbeit zu verrichten hatten und gesunde so wie leistungsstarke Pferde einen strategischen Vorteil liefern konnten. Die immer intensivere Haltung von Pferden auf engem Raum verlangte nach energiereichen und platzsparenden Futtermitteln. Die Idee der

Fertigfuttermischungen war 1870 mit der Erfindung von „Pferdebiskuits“ für britische Militärpferde geboren (Meyer et al 2019).

Das Pferd besitzt als reiner Pflanzenfresser einen einhöhligen Magen mit einem Fassungsvermögen von bis zu 20l. Der anschließende ca. 20m lange Dünndarm geht in den Dickdarm über. Dieser ist in drei Abschnitte unterteilt: das voluminöse Zäkum und das wesentlich kleinere Kolon, welche dem Pferd als Gärkammer dienen, und anschließend das Rektum. In diesen Abschnitten wird ausschließlich mikrobiell verdaut (Meyer et al 2019).

Das mikrobielle System im Verdauungstrakt eines Pferdes mit ausschließlicher Grasfütterung beträgt durchschnittlich 10^7 Bakterien pro Gramm Gastrointestinaltrakt, schwankend je nach Abschnitt. Angesichts dieser Menge ist es nicht verwunderlich, dass sie einen großen Einfluss auf die Nährstoffaufnahme und somit auf die Gesundheit hat (Al Jassim & Andrews 2009).

Die meisten Studien wurden zur mikrobiellen Besiedlung der Pansenflora gemacht. Da aber bei einhöhligen Mägen, wie sie das Pferd oder das Kaninchen besitzen, das Caecum als alternative Gärkammer zum Pansen fungiert, ist anzunehmen, dass im Verdauungstrakt von Pferden ähnliche Bakterien zur mikrobiellen Fermentation dienen (Edward und Hume 1998).

Das Mikrobiom ist von Pferd zu Pferd individuell, zudem gibt es verschiedene Literatur zu Mikroorganismen, die den Gastrointestinaltrakt besiedeln.

Firmicuten scheinen von 40 - 70% die dominante Spezies in Feces zu sein, während Bakerodeuta, Proteobakterien, Verrucomikroben, Actinobakterien, and Spirochaeten zu ca. 0% und 15% vertreten sind (Schoster et al 2014).

2.1 Immunsystem des Pferdes

Die Aufgabe des Immunsystems besteht darin, körpereigene und körperfremde Stoffe voneinander zu unterscheiden und letztere effizient unschädlich zu machen. Eine Unterteilung der verschiedenen Ebenen des Immunsystems erfolgt in das angeborene (unspezifische) und das erworbene (adaptive) Immunsystem. Verschiedene Barrierefunktionen verhindern schon das Eindringen der Pathogene, wie zum Beispiel die Barrierefunktion der Haut oder der Schleimhäute. Sind Pathogene schon in den Körper eingedrungen, besitzt der Organismus körpereigene Abwehrsysteme.

Eine weitere Unterteilung des Immunsystems erfolgt in die humorale Immunantwort, welche mit löslichen Komponenten die Antigene (die körperfremden Substanzen) bindet oder unschädlich macht, und in die zelluläre Immunantwort. Bei der zellulären Immunantwort ist

unmittelbar eine körpereigene Zelle daran beteiligt, das Antigen unschädlich zu machen (Kues 2020).

Mit dieser Art von Immunantwort befassen wir uns in den folgenden *in vitro* Experimenten. Sie sollen einen Einblick liefern, inwieweit sich die zelluläre Immunantwort des Pferdes mit Nahrungsergänzungsmitteln, in unserem Fall Probiotika, beeinflussen lassen.

Einer der wichtigsten Vertreter des adaptiven Immunsystems sind die peripheren mononukleären Blutzellen, kurz PBMCs genannt. Beim gesunden Pferd überwiegen die Leukozyten, gefolgt von den neutrophilen Granulozyten sowie den Lymphozyten. Nur das Vollblutpferd neigt zu einer höheren Anzahl an Lymphozyten als Granulozyten. Leukozyten befinden sich bei gesunden Pferden in einem Referenzbereich von $3,5 - 9,4 \cdot 10^9$ Zellen pro Liter Blut. Neutrophile Granulozyten teilen sich in zwei Unterkategorien auf, den segmentkernigen, neutrophilen Granulozyten mit $1,6 - 6,4 \cdot 10^9$ Zellen pro Liter und den stabkernigen, neutrophilen Granulozyten unter $0,6 \cdot 10^9$ Zellen pro Liter.

Lymphozyten sind zu $1,2 - 4 \cdot 10^9$ Zellen pro Liter und eosinophile Granulozyten zu unter $0,6 \cdot 10^9$ Zellen pro Liter vorhanden. Monozyten sollten im gesunden Pferd weniger als $0,6 \cdot 10^9$ Zellen pro Liter im Blut zu finden sein und weniger als $0,3 \cdot 10^9$ basophile Granulozyten (Wehrend et al. 2016).

Eine so genaue Differenzierung der einzelnen Arten ist in den folgenden Experimenten nicht möglich, da es den zeitlichen und finanziellen Rahmen gesprengt hätte. Es wurde daher die Proliferation und Viabilität aller Leukozyten gemeinsam untersucht.

Zudem sind die aktuellen Protokolle für Durchflusszytometrie für equine Immunzellen nicht in der Lage, die verschiedenen Immunzellsubtypen genau zu identifizieren. Eine Studie aus dem Jahr 2021 befasste sich mit der genaueren Phänotypisierung der equinen PBMCs mit Hilfe von Einzel-Zell-RNA Sequenzierung (scRNA-Seq). Die grobe Unterteilung der equinen PBMCs erfolgte angelehnt an die humanen PBMCs in Basophile Granulozyten, Monozyten, B Zellen und CD3 Lymphozyten. Mit scRNA-Seq und einem vergleichenden, spezieübergreifenden Clustering konnte festgestellt werden, dass zwar Ähnlichkeiten zu den humanen Immunzellen besteht, aber viele Untertypen noch nie zuvor beschrieben wurden und einzelne Immunzellpopulationen sich doch von den humanen unterscheiden (Patel et al 2021).

2.2 Probiotika

Schon in der frühen Menschheitsgeschichte nutzten unsere Vorfahren die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von Mikroorganismen. Anfangs noch durch Zufall, dann durch Versuch

und Irrtum, bis hin zum aktuellen technischen Wissensstand, wurden der Einsatz und das Verständnis für gezielte bakterielle Kontamination von immer größerem Nutzen. Vor über 10.000 Jahren BC wurden mit Hilfe von Bakterien quer durch Europa fermentierte Milchprodukte erzeugt und diese Praktiken bis in die Neuzeit praktiziert (Ozen und Dinleyici 2015).

In der traditionellen Heilkunde vieler Völker wurden fermentierten Produkten heilende Eigenschaften zugesprochen. Im antiken Griechenland berichten mehrere Quellen vom therapeutischen Effekt von fermentierten Milchprodukten auf das Gastrointestinale System. Sowohl Plinius der Jüngere als auch der griechische Physiker Galen schrieben darüber. Im Jahr 1892 entdeckte Albert S. Döderlein den Zusammenhang zwischen Mikroorganismen und der menschlichen Gesundheit. Er fand heraus, dass die vaginale Bakterienflora Milchsäure aus Zucker produziert und das Wachstum pathogener Keime somit verhindert. Von dieser Zeit an wurde intensiv an der mikrobiellen Flora des Menschen geforscht. Um 1906 wurden von Henry Tissier klinisch dokumentierte, positive Effekte von *Bifidobacteria* und *Enterobacteriaceae* auf die mikrobielle Darmflora von Kindern mit Darminfektionen beschrieben. Noch im gleichen Jahr kam Michel Cohendy zu der Entdeckung, dass die Fäulnisprodukte im Darm, bei einer laktobazillenreichen Ernährung, abnehmen (Santacroce, Charitos, and Bottalico 2019).

Als Probiotika werden, laut den aktuellen Bezeichnungsvorschlägen der WHO und FAO, Bakterien bezeichnet, die bei ausreichender Menge einen positiven Einfluss auf die Gesundheit haben (WHO und FAO 2006).

Probiotika können Mono- oder Mischkulturen lebender Mikroorganismen sein. Das Wort Probiotika stammt aus dem Griechischen von *pro* (für) und *bios* (Leben) (Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH).

Nicht zu verwechseln sind Probiotika mit Präbiotika. Präbiotika sind Stoffe, wie zum Beispiel der Mehrfachzucker Inulin, deren Aufgabe darin bestehen, das Wachstum bestimmter Bakterien im Darm zu fördern. Durch ihre Verdauung zerfallen sie in Abbauprodukte, die für bestimmte Bakterien ihr bevorzugtes Milieu bilden. Somit können gezielt gutartige Bakterien gefördert und pathogene verdrängt werden (Suerbaum et al. 2008).

Probiotika können auf verschiedene Arten das Immunsystem beeinflussen: Immunmodulation des Individuums, Produktion antimikrobieller Stoffe, Verdrängung pathogener Organismen oder Inaktivierung deren Noxen. Viele dieser Mechanismen wurden *in vitro* erforscht und

beschrieben. Die Forschung *in vivo* ist noch wesentlich weniger erforscht und verstanden. (Schoster, et al 2014).

Das angeborene Immunsystem fungiert über das Erkennen von sogenannten pathogen assoziierten molekularen Mustern (pathogen associated molecular patterns PAMPS), die sich auf der Oberfläche der meisten Pathogene befinden. Diese Moleküle werden von sogenannten Muster-Erkennungs-Rezeptoren (pattern recognition receptors PPRs) erkannt und der Körper setzt eine Entzündungsreaktion in Gang, um die Pathogene unschädlich zu machen. Am besten erforscht sind hierzu die toll-like receptors (TLRs). Probiotika besitzen die Fähigkeit, die Expression von TLR herunterzuregulieren um die intestinale Entzündungsreaktion zu unterdrücken (Schütt und Bröcker 2011).

Ein zweiter membrangebundener Rezeptor, genannt NLR, interagiert erwiesenermaßen auch mit Probiotika. Genauer erforscht wurde dieser Mechanismus mit Laktobazillen. Inflammatory Bowel Disease steht im Verdacht, durch eine Dysregulation dieser Rezeptoren verursacht zu werden. Eine Hochregulierung durch Laktobazillen zeigt, zumindest im Versuch mit Schweinen, eine Möglichkeit, diese Rezeptoren gezielt zu steuern. Die komplexe Interaktion zwischen Probiotika und Immunsystem ist noch immer nicht ganz erforscht und bedarf weiterer wissenschaftlicher Erkenntnisse (Bermudez-Brito et al. 2012).

Probiotika scheinen nicht nur das Immunsystem zu beeinflussen, sondern auch die Art und Weise, wie die Energiegewinnung und Speicherung im Körper stattfindet. Mit Hilfe von mikrobiotafreien Mäusen des C57BL/6 Stammes konnte unter Laborbedingungen gezeigt werden, dass der Körperfettaufbau vom Mikrobiom des Darms abhängt. Die Mikrobiota beeinflussen die Absorption der Monosaccharide aus dem Darmlumen und verstärken indirekt die *de novo* Lipogenese in der Leber. Mit normalen, als auch keimfreien sowie auch Mikrobiota induzierten Mäusen fand man heraus, dass das Mikrobiom im Darm den Fastening induced adipozyten Faktor (Fiaf) unterdrückt, welcher für die Triglycerid-Einlagerung in den Adipozyten verantwortlich ist. Beide Mechanismen führen dazu, dass das Mikrobiom im Darm den Körperfettanteil in Mäusen erhöht. Es konnte bis zu 60% Körperfettzunahme nach Probiotikagabe in den keimfreien Mäusen festgestellt werden, trotz gleichbleibender Fütterung (Bäckhed et al. 2004).

2.3 *Lactobacillus acidophilus*

Eine Literaturstudie aus dem Jahr 2022 über *Lactobacillus acidophilus* ergab, dass dieser probiotische Stamm bei Kindern das Potential besitzt, akute Gastroenteritis-Phasen zu

verkürzen oder zu mildern. Die Ergebnisse schwankten je nach Studie, aber ein positiver Effekt konnte belegt werden (Cheng et al. 2022).

Lactobacillus acidophilus besitzt wie *E.f.* die Eigenschaft pathogene *E.coli* Bakterien aus der Darmflora zu verdrängen. Dieser Effekt konnte auch bei Katzen belegt werden (Fusi et al. 2019).

Bei Pferden scheint die Menge der Laktobazillen im Verdauungstrakt keine Aussage über ihre Gesundheit zu liefern, da sowohl bei kranken als auch gesunden Tieren die gleiche Menge an Laktobazillen gefunden wurde. In diesem Bereich besteht aber noch mehr Forschungsbedarf. (Schoster et al 2014).

2.4 *Enterococcus faecium*

Heutzutage werden üblicherweise in den meisten Probiotika-Präparaten Bakterien folgender Gattungen verwendet: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* und *Streptococcus*. (Santacroce, Charitos, and Bottalico 2019).

Die ersten Enterococcen wurden erstmals 1899 in humanen Faeces entdeckt. Da sie damals noch zur Familie der Streptococcen gezählt wurden, erschien 1906 die erste Beschreibung des *Streptococcus faecalis*, isoliert aus der Herzklappe eines Patienten mit Endocarditis. 1919 wurde dann erstmals *Streptococcus faecium* entdeckt (Zhou et al.).

Beide Arten gehören zur selben Gattung, nämlich der Enterokokken. Diese sind grampositiv und Katalase negative Bakterien. Enterokokken sind sehr widerstandsfähig gegen Umwelteinflüsse und besiedeln vor allem den Verdauungstrakt von Säugetieren, Vögeln und diversen Insekten, wie zum Beispiel der Honigbiene. Diese Bakterien treten überwiegend als Kommensalen auf. Durch ihre Anpassungsfähigkeit besitzen sie das Potential, rasch Antibiotikaresistenzen zu entwickeln, was vor allem für geschwächte Immunsysteme eine ernstzunehmende Bedrohung darstellen kann (Castillo-Rojas, et al. 2013).

Schon 1989 wurden die positiven Auswirkungen von *E.faecium* auf Menschen belegt. In einer placebokontrollierten Doppelblindstudie wurden Antibiotika induzierte Durchfälle mit *E.f.* SF68 behandelt. Bei Patienten, die *E.f.* erhielten, wurde nur bei 8,7% milde Durchfallssymptomatik notiert, bei der Kontrollgruppe, die nur ein Placebo erhielt, waren es 27,2% (Wunderlich et al. 1989).

Neben Antibiotika induzierten Durchfällen gibt es auch Studien am Menschen zur Reduktion von viral bedingten Durchfällen. *E.f.* verkürzt die Dauer von Rota Virus bedingtem Durchfall und reduziert die Virenlast. Der gleiche Effekt ist auch bei enterotoxischen Infektionen durch *Clostridium difficile* zu beobachten. Nur bei der Behandlung von *Vibrio cholera* oder enterotoxischen *Escheria coli* Bakterien scheint die probiotische Behandlung mit *E.f.* keine Erfolge zu bringen (Teitelbaum 2005).

Ein weiterer spannender Effekt von *E.faecium* wurde bei der Honigbiene beobachtet. Hier wurden Mikrobiota freie Bienen der Art *A.melifera* mit *E.faecium* des H7 Strains gefüttert. Es konnte gezeigt werden, dass *E.faecium* genregulierend wirkt und zu einer Erhöhung des Magengewichts führt (Du et al. 2021).

Auch beim Schwein konnten positive Effekte mit *E.f.* erzielt werden. Ein Teil einer Gruppe Saugferkel wurde über einen Zeitraum von einer Woche mit *E.f.* gefüttert. Anschließend wurden einige der Ferkel mit dem enterotoxischen Stamm *Escherichia coli* K88 (ETEC) infiziert. In histologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die infizierten Schweine eine geringere Zottenhöhe und Kryptentiefe der Darmschleimhaut aufwiesen, sowie eine verringerte Anzahl an Becherzellen. Die Fütterung von *E.f.* konnte diese Schäden abmildern, denn Tiere, die damit gefüttert wurden, besaßen einen physiologischeren Aufbau der Darmschleimhaut und zeigten geringere Durchfallsymptome (Peng et al. 2019).

Das *E.faecium* beim Schwein die Viruslast von Enteroviren in den Ausscheidungen mindern kann, bestätigte auch eine weitere Studie 2012. Mit Hilfe von Echtzeit RT-PCR Tests wurden die Ausscheidungen von Sauen und ihren Saugferkel untersucht. Saugferkel der Gruppe ohne Probiotika zeigten höhere Rotavirus-Werte als die Saugferkel, welche zuvor *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 gefüttert bekamen. Es konnten zudem auch höhere Werte CD8b+ T-Zellen in der Probiotika Gruppe festgestellt werden, was auf eine verbesserte zelluläre Immunantwort dieser Gruppe hindeutet (Kreuzer et al. 2012).

In der Geflügelzucht zeigen Studien die positiven Effekte von *E.f.*, welcher, in Kombination mit *Lactobacillus animalis in ovo* injiziert wurde. Die probiotische Behandlung veränderte nicht nur die Länge, den pH-Wert und das Gewicht des Gastrointestinaltraktes, sondern resultierte auch in einer gesteigerten Futtermittelverwertung der Tiere zwischen dem 7. und 14. Tag, im Vergleich zur Kontrollgruppe (Beck, et al. 2019).

Die Auswirkung von Probiotika auf die Darmflora von Haushunden ist ebenfalls wissenschaftlich belegt worden. Verwendet wurde ein kommerziell erhältliches Präparat namens Enteroform, welches *E. faecium* des Stammes NCIB 10415 enthält. So wurde, unter

anderem, in einer Studie aus 2002 unter der Leitung von W. Vahjen und K. Männer an 12 Haushunden gezeigt, dass eine Probiotika Gabe, 18 Tage lang, die bakterielle Zusammensetzung der Fäkalien ändert. *Clostridium spp.* war signifikant reduziert, während *Salmonella spp.* und *Campylobacter spp.* tendenziell höhere Messwerte erreichten. Dies wird von den Autoren damit begründet, dass *E.f.* metabolisch aktiv ist und somit die Produktivität von Laktobazillen fördert, die ein saures Milieu erzeugen und somit das Wachstum von *Clostridium spp.* hemmen (Vahjen, et al. 2003).

Bei all den positiven Eigenschaften von *E.f.* als Nahrungsergänzungsmittel für verschiedene Tierarten, ist es naheliegend, dass sie diese auch beim Pferd aufweisen. Im folgenden Kapitel soll ein Überblick über die aktuelle Studienlage zu Probiotika beim Pferd, mit besonderem Fokus auf *E.f.*, gezeigt werden.

2.5 Probiotika beim Pferd

Bei diversen Spezies konnten die Auswirkungen von Probiotika auf den Körper und den Metabolismus nachgewiesen werden, so auch beim Pferd. In einer Studie mit 24 Pferden wurde der Einfluss von Probiotika auf die Körpergewichtszunahme beim Fohlen untersucht. Die Gruppe, welche mit einer Kombination aus *B. bifidum*, *E. faecium*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* und *S. cerevisiae* gefüttert wurde, fraß im Durchschnitt weniger als die Fohlen der anderen Versuchsgruppe und nahm trotzdem genauso viel Körpermasse zu wie die anderen Fohlen. Obwohl der Versuch nur über 28 Tage ging, unterstreicht es die Theorie, dass die erweiterte Masse des Mikrobioms im Verdauungstrakt den Fohlen effizienter Energie aus Nahrung gewinnen lässt (de Moura et al. 2009).

Tägliche *E.f.*- Supplementierung scheint auch den Blutcholesterinspiegel des Pferdes positiv zu beeinflussen. Eine Fütterungsstudie aus dem Iran zeigte, dass bei Pferden in der Gruppe mit *E.f.* im Futter die High-Density Lipoproteinwerte stiegen und die Low-Density Lipoproteinwerte sanken. Zudem sank in dieser Gruppe auch der pH-Wert im Zäkum sowie im Kot, veränderte aber nicht die Nährstoffaufnahme im Darm (Saedi et al. 2021).

Ein weiteres, potentiell Anwendungsbereich für Probiotika könnte in der Behandlung von Koliken liegen. In einer Gruppe von gesunden Pferden wurde nachgewiesen, dass die Ausscheidung von aufgenommenem Sand mit Probiotika beschleunigt werden kann. Hierfür wurden die Tiere eine Woche lang mit einer Kombination aus 40 Millionen Zellen *Saccharomyces cerevisiae*, 2.25 Millionen Kolonie formenden Einheiten von *Lactobacillus acidophilus*, und 1.55 Kolonie formenden Einheiten von *Enterococcus faecium* und kleinen

Mengen an Sand gefüttert. Die Sandausscheidung konnte um das 2,5fache gesteigert werden. Es scheint eine gute Begleittherapie zur Sandkolik Behandlung darzustellen (Landes et al. 2008).

2.6 Probiotika als Futtermittelzusatzstoff

In der EU unterliegen Probiotika der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des europäischen Parlaments und Rates und müssen als Futtermittelzusatzstoff deklariert sein (Europäische Union 2003).

Aktuell wurden von der European Food and Drug Agency (EFSA) nur probiotische Futtermittelzusatzstoffe für Pferde auf der Basis von *Saccharomyces cerevisiae* erlaubt. Es liegen sehr wenige Studien, die auch nicht peer reviewed wurden, zu deren Wirksamkeit vor. (Schoster, Weese, and Guardabassi 2014, 1641).

3 Material

3.1 Probenmaterial

Für diese Studie wurden fünf miteinander verwandte Araberpferde herangezogen sowie ein Anglo-Araberwallach (Abbildung 1). Alle Pferde stammen aus dem gleichen Distanzsportstall und wurden uns freundlicherweise von der Familie Mauritsch zur Verfügung gestellt. Vor der Probenentnahme wurden alle Pferde untersucht und als gesund befunden. Um ein möglichst durchschnittliches Ergebnis zu erhalten, wurden Pferde aus verschiedenen Altersklassen sowie beider Geschlechter gewählt. In dieser Studie befinden sich drei Stuten, zwei Wallache und ein Hengst.

Die Studie wurde von der Ethik- und Tierschutzkommission der Veterinärmedizinischen Universität Wien im Hinblick auf ihre Übereinstimmung mit der Good Scientific Practice und den einschlägigen nationalen Rechtsvorschriften geprüft und unter dem Geschäftszeichen ETK-101/01/2022 befürwortet.

Die Blutentnahme erfolgte auf der linken Halsseite aus der *Vena jugularis*. Jedem Pferd wurden 18ml Blut mit Hilfe eines Vacutainer-Systems entnommen. Als Gerinnungshemmer verwendeten wir mit EDTA beschichtete Röhrchen, da dieser im Gegensatz zu Natrium-Heparin nach dem Transport mehr lebende und somit mehr zu Forschungszwecken verwendbare Zellen liefert (Männer 2022).

Die Proben wurden gekühlt bei ca. 4°C gelagert, unter einer Stunde ins Labor gebracht und dort weiterverarbeitet.

3.2 Verwandtschaftsgrade der biologischen Replikate

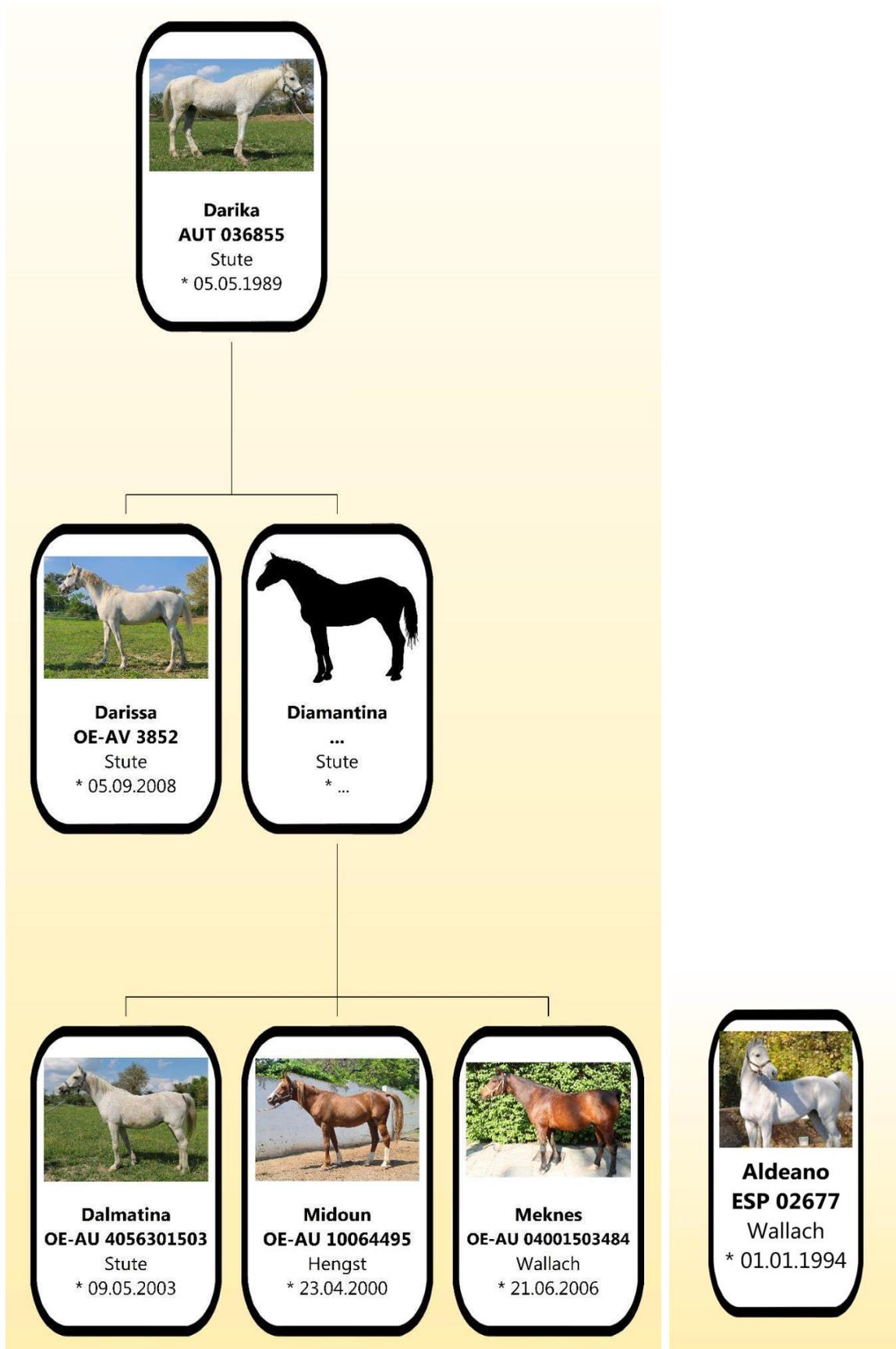


Abbildung 1 Verwandtschaftsbeziehungen der Araber der Familie Mauritsch. Die Stute Diamantina wurde nicht als Spender verwendet, da sie zum Zeitpunkt der Studie nicht mehr lebte. Aldeano ESP 02677 stammt aus einer spanischen Zucht und ist auch im Besitz der Familie Mauritsch (Männer 2022).

3.3 Seren

Die equinen PBMCs wurden mit Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI) versetzt und entweder mit fötalem bovinen Serum oder mit eigens für den Versuch hergestelltem equinen Serum kultiviert. Das equine Serum wurde aus den gesammelten Proben für die folgenden Experimente hergestellt. Hierfür wurden die verschiedenen Serumüberstände gepooled und filtriert. Das für den Vorversuch verwendete humane Serum konnte, dankenswerterweise mit Hilfe von Dr. Georg Männer, von der Autorin zur Verfügung gestellt werden. Das für den Vorversuch benötigte fötale bovine Serum (FBS) wurde kommerziell erworben (Gibco, USA) und das equine Plättchenlysat (ePL) wurde freundlicherweise von Frau Ass.-Prof. Dr. Franziska Dengler zur Verfügung gestellt.

Im anschließenden Hauptversuch beschränkten wir uns nur noch auf das kommerziell erhältliche FBS und das abermals frisch für den Versuch hergestellte equine Serum.

3.4 Geräte

Beschreibung	Firma
Centrifuge Micro Star 17R	VWR Avantor®
Centrifuge Mega Star 1.6R	VWR Avantor®
Cell counter, Countess 3 FL	VWR Avantor®
Laminar Flow Hood, MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific, USA
Incubator, HeraCell VIOS 160i	Thermo Fisher Scientific, USA
Steel bath, Precision GP 10	Thermo Fisher Scientific, USA

3.5 Medien und Reagenzien

Lösungen	Firma
Cell cultivation medium, 500 mL RPMI Medium 1640 (1X) with L-Glutamine	Thermo Fisher Scientific, USA
Phosphate buffered saline, 500 mL, PBS (1X) without CaCl ₂ /MgCl ₂	Thermo Fisher Scientific, USA
DAPI	Thermo Fisher Scientific, USA
Trypanblau	Thermo Fisher Scientific, USA

Folgende Verbrauchsmaterialien wurden des Weiteren verwendet: Pipetten(spitzen), Wells, Filtersysteme, Tubes und Eppendorfer-Tubes in diversen Größen, DAPI-Lösung (4',6-Diamidino-2-phenylindol), Histopaque-1077 -Lösung.

4 Methoden

Folgende Arbeitsschritte der Isolation der PBMCs wurden nach Vorlage des Standardprotokolls zur Isolierung von PBMCs der Arbeitsgruppe Nutrigenomik, Institut für Tierernährung der Veterinärmedizinischen Universität Wien erstellt (Kreuzer-Redmer 2021)

Sämtliche Arbeitsschritte wurden so steril wie möglich und größtenteils unter dem Lamina Air Flow gemacht, um Fremdkontaminationen zu vermeiden. Zu Beginn wurde im Vorversuch das RPMI-Medium mit 5ml einer 1%igen Penicillin G und Streptomycin Mischung auf 500ml Medium versetzt. Im Hauptversuch mit *E.f.* wurde dieser Schritt ausgelassen, da das Antibiotikum sonst alle vorhandenen Bakterien, samt den Probiotika, abgetötet hätte. Diese Mischung stellte das Nährmedium für die folgenden Versuche dar.

Danach wurde in beiden Versuchen das Nährmedium auf equine Körpertemperatur von 38 °C im Stahlkugelbad erwärmt, um optimale Bedingungen für die Zellen bereitzustellen (Männer 2022).

Die Blutproben wurden vorsichtig, ohne Luftblasen zu erzeugen, in sterilen 50ml Röhren überführt und dann mit einer eisgekühlten, phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) im Verhältnis Blut zu PBS 1 zu 1 gemischt. Danach wurden die verdünnten Proben vorsichtig auf die Histopaque-1077 Lösung in 50mL Röhren geschichtet.

Anschließend wurden diese 50ml Röhren für 25min bei 20 °C und 2000rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die oberste Schicht, das Plasma, gepoolt und für weitere Schritte aufgehoben. Mit einer 1250µL Filterspitze wurde die Zellwolke, welche die wichtigen PBMCs enthielt, in 15mL Tubes abpipettiert. Die Schichtung ist in Abbildung 2 gut zu erkennen. Um eine noch bessere Trennung von Plasma und PBCMS zu erhalten, wurden diese 15ml Röhren erneut mit PBS bis auf die 12ml Markierung verdünnt und abermals zentrifugiert. Dieses Mal bei 4 °C und 1200rpm für 10min. Anschließend konnte der restliche Überstand, außer dem PBMCs-Pellet am Rand der Röhren, abpipettiert werden. Es wurde kein Erythrolyse Puffer hinzugefügt, weil die Farbe der Proben auf wenig Erythrozyten rückschließen ließ. Anschließend wurde der Überstand entfernt und 1ml der PBS Lösung hinzugefügt und resuspendiert. Nach diesem Arbeitsschritt erfolgte die Zählung mittels Countess, um zu ermitteln, wie viele Zellen pro 1ml der Probe erhalten sind. Damit die Zellen

besser erhalten bleiben und nicht absterben, wurden sie nach der Zählung rasch mit Nährmedium in die 24- Wellplatten transferiert.



Abbildung 2 Cryotube mit Pferdeblut und Histopaque-1077 -Lösung nach Zentrifugation. Die Schichtung ist von oben nach unten gut erkennbar: Plasma (gelb), Zellwolke (weiß) und Zellpellet (dunkel) (Männer 2022).

4.1 Zellkultivierung

Für den Immunzell-Assay sollten 10^6 lebende Zellen pro ml eingesetzt werden, die wir auch in allen Proben erreichen konnten.

24-Wellplatten wurden mit dem fertigen Nährmedium-Medium versehen. Dieser Arbeitsschritt wurde in beiden Experimenten ident ausgeführt.

Für das Vorexperiment ergänzten wir zu dem Medium auf der 24-Wellplatte folgende Seren: equines Serum (Pferdeserum von unseren Probanden), bovines Serum (FBS), porcines Serum (Schwein) und equines Platelet Lysat (ePL).

Im Hauptexperiment nahmen wir nur mehr equines Serum und FBS, da unsere Studien zeigten, dass diese Seren die besseren Ergebnisse lieferten.

Um zwischen allen Arbeitsschritten ein Abkühlen der Wellplatten mit Proben zu vermeiden, wurden die verwendeten Platten immer nur so kurz wie möglich aus dem Inkubator entfernt.

Alles wurde in doppelter Stückzahl gefertigt, um eine Serie davon in den Incucyte® geben zu können und die andere Serie von dem Gerät Countess auszählen zu lassen.

Im weiteren Arbeitsschritt wurde in beiden Experimenten in die 24-Wellplatten 1ml Nährmedium, welches 10^6 PBMCs enthielt, in jede Vertiefung gefüllt.

Im Vorexperiment fügten wir, neben der Kontrollgruppe ohne Zellstimulans, entweder 1µL LPS (1mg/mL [PS:0111:B4]) oder 2µL ConA (eBioscience ConA Solution 500X=10uM) zu den Proben hinzu, um die Immunreaktion der PBMCs beobachten zu können. Das Pipettierschema ist auf Abbildung 3 zu finden.

Im Hauptexperiment wurde LPS durch *E.f.* ersetzt.

Anschließend wurden sie wieder in den Inkubator zurückgestellt oder im Incucyte® platziert. Da die 24-Wellplatten bis zu 72h gelagert wurden, war es nach 48h notwendig, etwas von der Nährlösung zu ergänzen, da die Zellen das meiste verstoffwechselt hatten.

4.2 Incucyte®

Parallel zu den Experimenten für das Countess-Zählsystem kultivierten wir die PBMCs im Live-Cell-Analysis System der Firma Sartorius, Incucyte®. Der Incucyte® ist ein vollwertiges Mikroskop und Zellinkubator in einem. Der Vorteil an diesem System ist, dass die Zellen ungestört und erschütterungsfrei proliferieren können, da das Gerät automatisch die Zellen erfasst und auszählt. Hierfür wurden 10^6 Zellen je Well in einer 24-Wellplatte ausgesät und mit RPMI Medium versetzt. Pro biologischem Replikat versetzten wir die Zellen mit LPS, 2µL ConA oder *E.f.*, neben der Kontrollgruppe, in verschiedenen Seren. Pro Well unterteilte das

Gerät jedes Well in 16 Quadranten. Pro Quadranten wurden 16 Bilder alle 3 Stunden geschossen. Anschließend erfolgte eine manuelle Sichtung der Bilder. Mit Hilfe der programmeigenen Software wurden Parameter festgelegt, welche es dem Programm erlaubten, so viele einzelne Zellen wie möglich als solche zu erkennen und auszählen zu können. Eine im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Standardeinstellung wurde über alle Versuche eines Experimentes gelegt. Die so erreichten Zellzahlen wurden anschließend für die 16 Bilder addiert. So konnte pro Probe ein ungefährer Wert der Gesamtzellzahl ermittelt werden. Die biologischen Replikate wurden gemittelt, um einen repräsentativen Wert zu erhalten.

4.3 Messung der Viabilität und Proliferation

Für die Bestimmung der Viabilität wurden lebende und tote Zellen mittels einer Countess 3, ein automatisches Zellzählgerät, welches bildbasiert durch Hellfeldmikroskopie zählt, der Firma Thermo Fischer Scientific ermittelt. Hierfür wurden die Zellen mit Thryptophanblau angefärbt und auf der geräteeigenen Kartusche aufgebracht. Thryptophanblau kann nur durch die Membran toter Zellen diffundieren und färbt somit tote Zellen an, sodass eine Unterscheidung von tot/lebend durch einfache Hellfeldmikroskopie der Countess möglich ist.

Um die Proliferation der Zellen in den verschiedenen Medien zu detektieren, wurde der Incucyte® der Firma Sartorius verwendet. Mit Hilfe dieses Gerätes ist es möglich, die Eigenschaften eines Inkubators und eines Mikroskops zu vereinen. Die Zellen konnten somit bei 38 °C inkubiert werden und gleichzeitig wurde alle 3h ein Bild von den einzelnen Wells erstellt. So wurde unnötiger Zelltod vermieden, der in herkömmlichen Mikroskopen durch das Entfernen aus dem Inkubator die Zellen beschädigen würde. Mit der geräteeigenen Software war es zudem möglich, automatisch die lebenden Zellen zu erkennen und diese auszuzählen. So konnte ein genaueres Bild über das Verhalten der Zellen im zeitlichen Verlauf erstellt werden, als es mit dem Gerät Countess möglich ist.

5 Vorexperiment

Da PBMCs sensible Zellen sind und es momentan noch kein Standardprotokoll zur Kultivierung von equinen PBMCs in der Arbeitsgruppe Nutrigenomik, Institut für Tierernährung gibt, war das Ziel unseres Vorexperimentes das beste Supplement zu finden. Zur Verfügung standen Seren von Rind (FBS), Schwein, Mensch, Pferd und equines Platelet Lysate (ePL). Letzteres scheint eine Alternative zu dem ethisch fragwürdigen FBS für die Kultivierung von equinen PBMCs darzustellen (Russell and Koch 2015) (Männer 2022).

In allen Seren wurden PBMCs mit entweder ConA oder LPS versetzt, da diese als Zellstimulanzien neben der Kontrollgruppe dienten. Danach wurden sie auf einer 24-Wellplatte für den Incucyte® aufgetragen. Hierfür wurden jeweils zwei technische Replikate pro Platte herangezogen und das von 6 verschiedenen Pferden, also 6 biologische Replikate genutzt (Abbildung 3).

ConA Schwein	LPS Schwein	Kontrollgruppe Schwein	ConA Schwein	LPS Schwein	Kontrollgruppe Schwein
ConA Rind	LPS Rind	Kontrollgruppe Rind	ConA Rind	LPS Rind	Kontrollgruppe Rind
ConA Pferd	LPS Pferd	Kontrollgruppe Pferd	ConA Pferd	LPS Pferd	Kontrollgruppe Pferd
ConA ePI	LPS ePI	Kontrollgruppe ePI	ConA ePI	LPS ePI	Kontrollgruppe ePI

Abbildung 3 Pipettierschema für das Vorexperiment

Für jedes biologische Replikat gab es somit zwei technische Replikate. Alle 3h wurde vom Gerät der aktuelle Status der lebenden Zellen ausgezählt und über 96h gemessen. Pro Well erfolgten 16 Einzelbildaufnahmen, welche summiert wurden, um den aktuellen Zeitwert zu ermitteln. Die Versuche zu den Seren ePL und humanem Serum wurden als einzige Ausnahme nur mit jeweils drei biologischen Replikaten durchgeführt. Alle biologischen Replikate eines Serums, mit oder ohne Zellstimulanz, wurden gemittelt und in den folgenden Graphiken im Kapitel 6.1 im zeitlichen Verlauf dargestellt.

5.1 Ergebnisse

Die folgenden Aufnahmen stammen von einem Probanden, dem Hengst Midoun, und sollen einen Einblick in die Funktion des Incucyte® geben. Die Bilder entstanden zu den Zeitpunkten

18h, 1d12h und 3d und zeigen eine Momentaufnahme der Zellen im selben Quadranten. Für den besseren, optischen Vergleich, wurden alle Seren abgebildet. In porcinem Serum (Abb.4) ist im Vergleich zu den anderen Serienbildern gut zu sehen, dass die Zellen sich nur schlecht vermehren. Equines Serum (Abb.5) sowie FBS (Abb.6), zeigten in diesen Bildern ähnliche Zellzahlen. Die Zellen bilden mit ePL Konglomerate (Abb.7), welche hier als verdichtete Zellwolken zu erkennen sind.

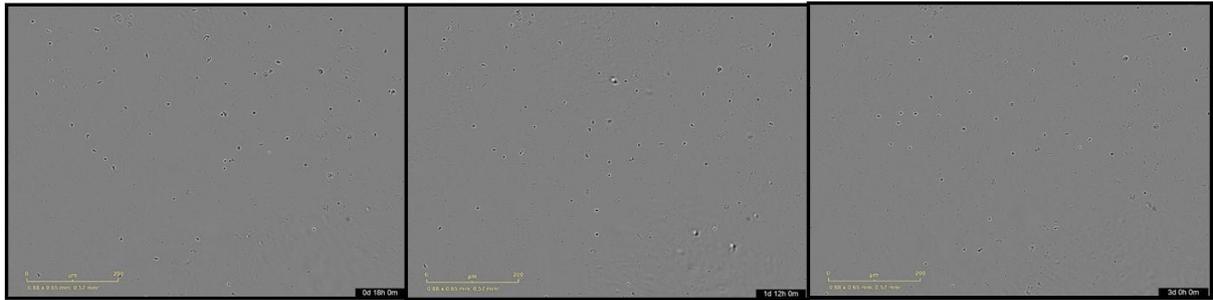


Abbildung 4 Incucyte® Aufnahmen: PBMCs von Hengst Midoun zu den Zeitpunkten 18h, 1d12h, 3d mit porcinem Serum

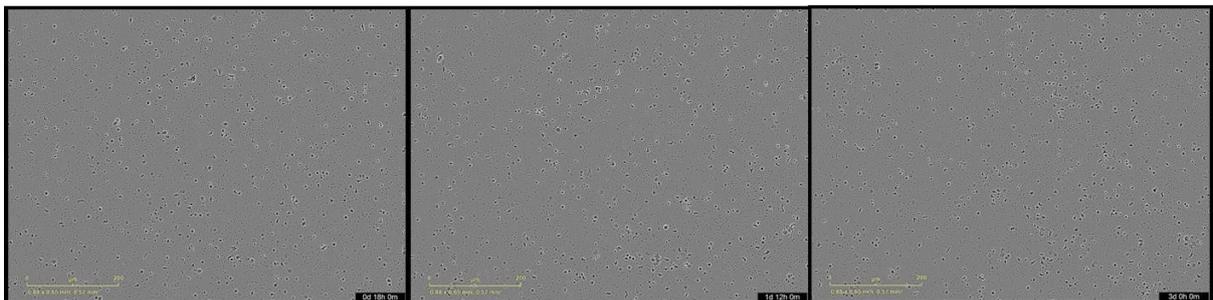


Abbildung 5 Incucyte® Aufnahmen: PBMCs von Hengst Midoun zu den Zeitpunkten 18h, 1d12h, 3d mit equinem Serum

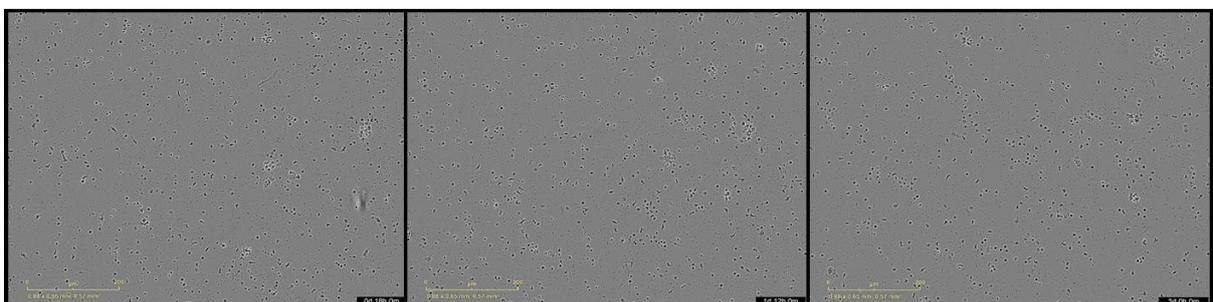


Abbildung 6 Incucyte® Aufnahmen: PBMCs von Hengst Midoun zu den Zeitpunkten 18h, 1d12h, 3d mit FBS

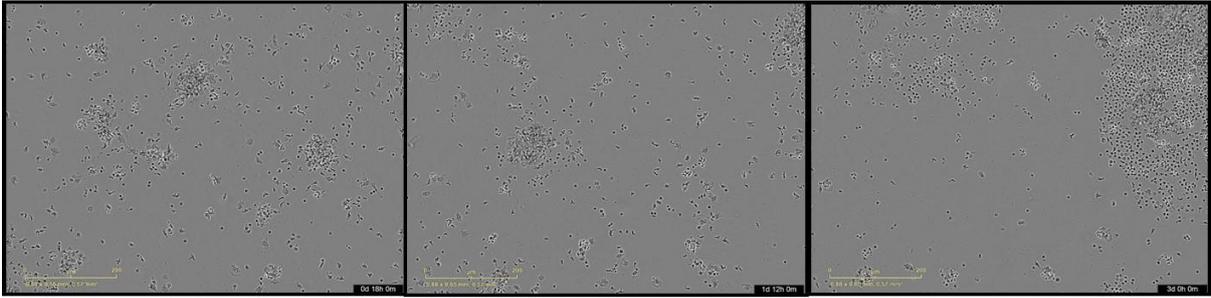


Abbildung 7 Incucyte® Aufnahmen: PBMCs von Hengst Midoun zu den Zeitpunkten 18h, 1d12h, 3d mit ePL

5.1.1 PBMCs mit ConA im Vergleich der genutzten Seren (Schwein, Rind, Pferd, Human, ePL)

Aus der folgenden Abbildung 8 ist herauszulesen, dass die Zellen mit FBS von allen Seren die höchste Zellzahl erreichen. Im Laufe der Zeit nähern sich die Werte an das equine Serum an. Porcines und humanes Serum schneiden im Vergleich beide relativ schlecht ab. Die geringsten Werte erreichten wir mit ePL.

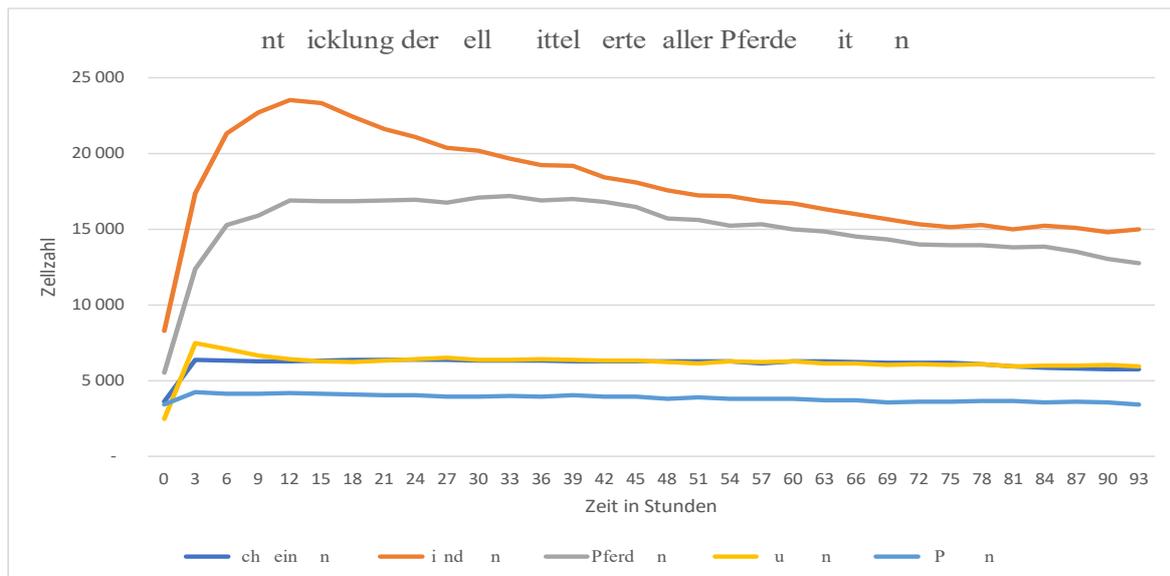


Abbildung 8 Entwicklung der absoluten Zellzahlen in Form von Mittelwerten über alle biologischen Replikate im Verlauf der Zeit mit ConA.

5.1.2 PBMCs mit LPS im Vergleich der genutzten Seren (Schwein, Rind, Pferd, Human, ePL)

In der folgenden Abbildung 9 ist herauszulesen, dass das FBS die höchsten Zellwerte auch unter dem Einfluss von LPS erreicht. Am zweitbesten schneidet hier das equine Serum ab. Das humane Serum erreicht eine geringfügig höhere Zellzahl als das ePL und das porcine Serum.

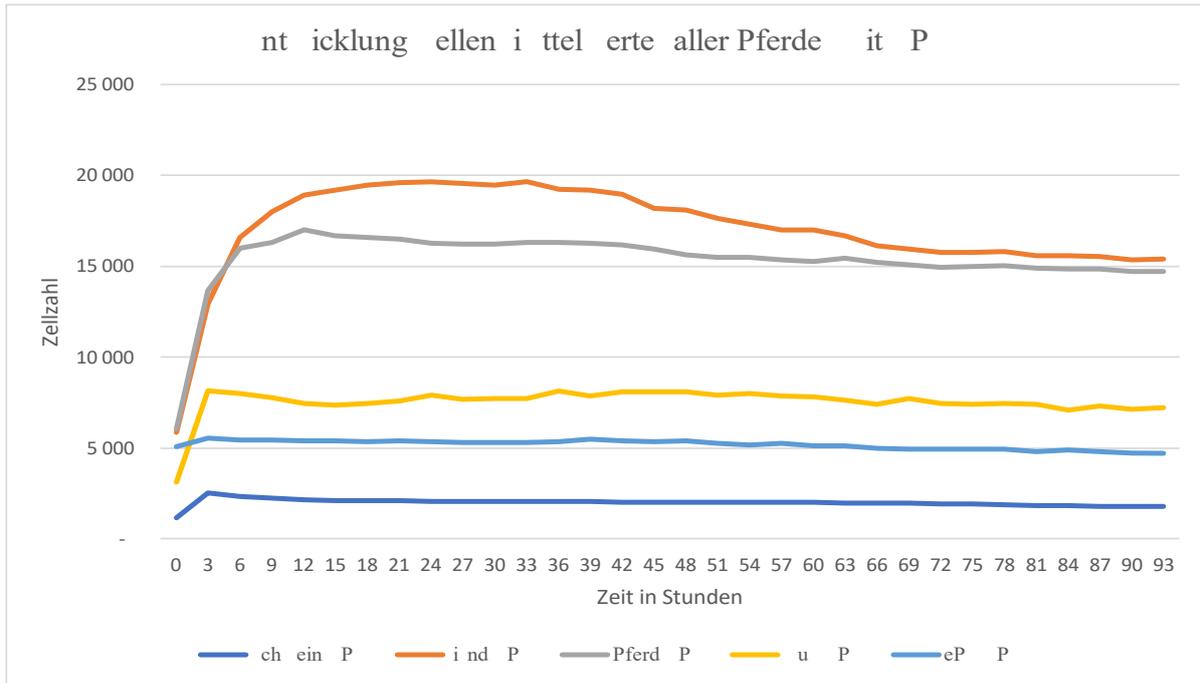


Abbildung 9 Entwicklung der absoluten Zellzahlen in Form von Mittelwerten über alle biologischen Replikate im Verlauf der Zeit mit LPS.

5.1.3 PBMCs in der Kontrollgruppe im Vergleich der genutzten Seren (Schwein, Rind, Pferd, Human, ePL)

Im Verlauf der Zeit schnitt Schweineserum eindeutig als schlechteste Serumalternative in der Kontrollgruppe ab (Abb.10). Es erreichte keine Zellwerte über 2000 Zellen, zu keinem Zeitpunkt. EPL und humanes Serum schnitten ein wenig besser ab, kamen aber nie über die 10000 Zellzahl. FBS erreichte im zeitlichen Vergleich etwas schneller als das equine Serum sein Zellmaximum, flachte aber schneller ab als das equine Serum. Das equine Serum überzeugte mit seiner konstant hohen Zellzahl, auch wenn es das Maximum an Zellen geringfügig später und niedriger erreichte als das FBS Medium.

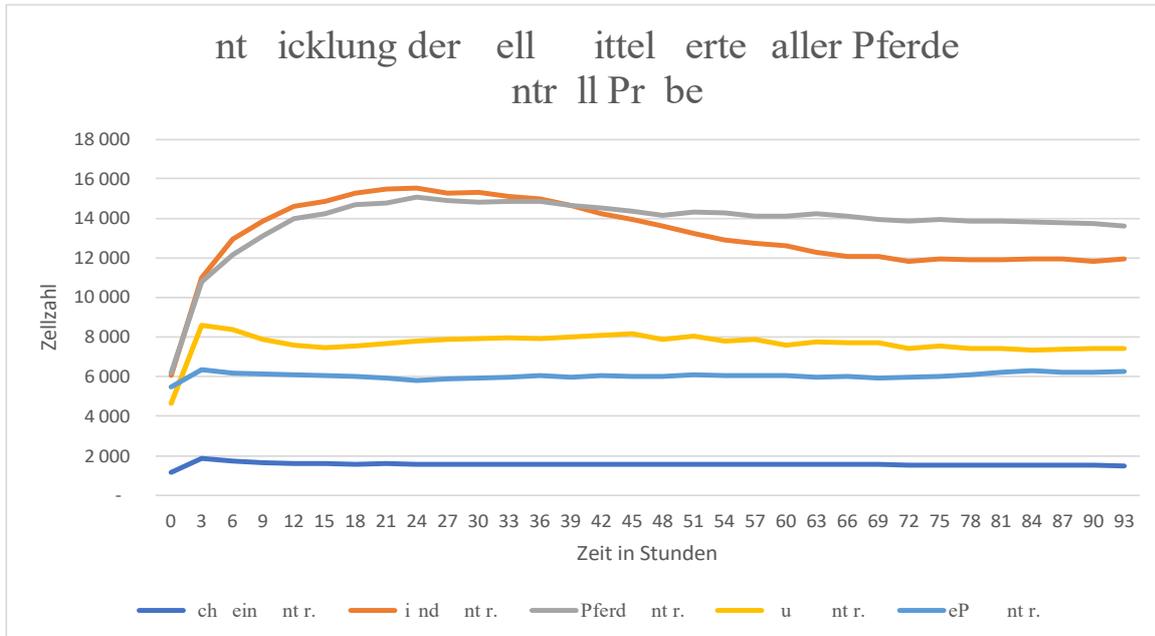


Abbildung 10 Entwicklung der absoluten Zellzahlen in Form von Mittelwerten über alle biologischen Replikate im Verlauf der Zeit der Kontrollgruppe.

5.2 Ähnlichkeitsfaktor equines Serum zu FBS

Da equines Serum und FBS in jeder Kategorie ähnliche Zellwerte erreichten, untersuchten wir noch rechnerisch die Ähnlichkeit von equinem Serum zu FBS. Hierfür wurden die Werte von FBS pro Messzeitpunkt als 100% genommen und die zeitgleichen Zellzahlen der PBMCs im Pferdeserum als prozentualer Wert angeführt. Von allen biologischen Replikaten wurde hierfür der Mittelwert verwendet. Folgende Grafiken sollen den zeitlichen Verlauf der Proben mit dem equinem Serum in Relation zu FBS darstellen. Wie zu erkennen ist, zeigen die Proben mit equinem Serum sehr ähnliche Zellzahlen, über den zeitlichen Verlauf, wie mit FBS. Sowohl mit ConA (Abb. 11) als auch mit LPS (Abb. 12) konnte dies beobachtet werden.

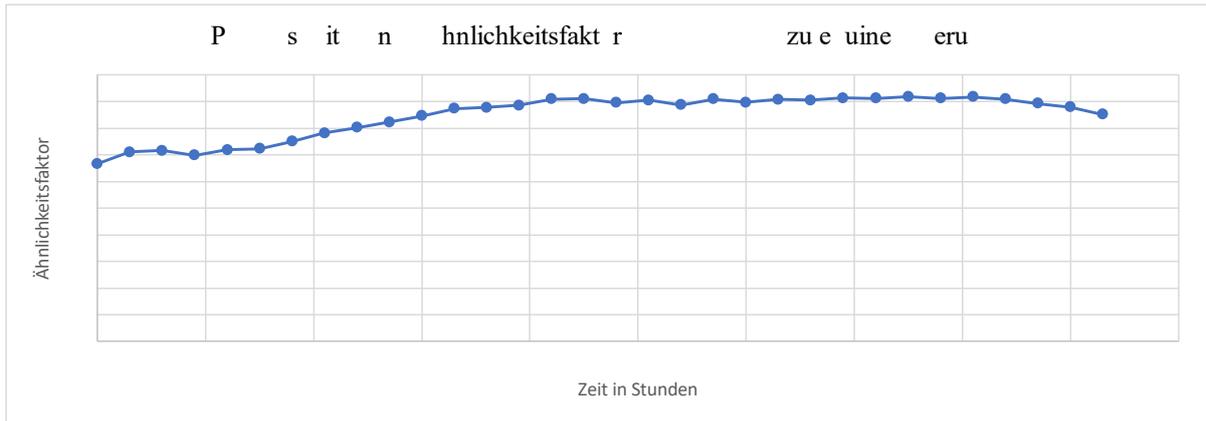


Abbildung 11 Ähnlichkeitsfaktor der zeitlichen Verlaufskurve von den PBMCs mit equinem Serum und ConA. FBS als Referenzwert.

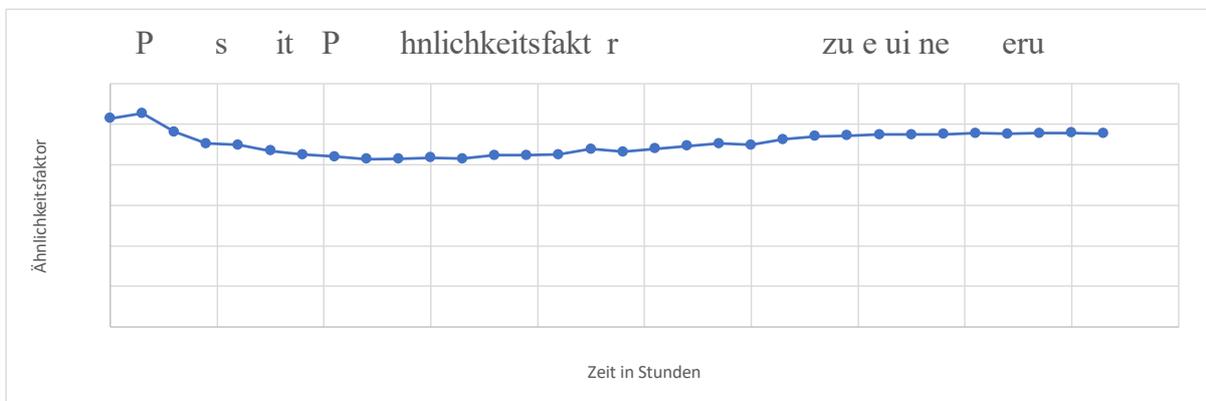


Abbildung 12 Ähnlichkeitsfaktor der zeitlichen Verlaufskurve von den PBMCs mit equinem Serum und LPS. FBS als Referenzwert.

5.3 Korrelationskoeffizient

Da der Ähnlichkeitsfaktor zwischen equinem Serum und FBS teils über 100% betrug, verwendeten wir noch ein weiteres statistisches Hilfsmittel, um die Ähnlichkeit der beiden Seren zu vergleichen.

Hierfür verwendeten wir den Korrelationskoeffizienten, auch Pearson-Korrelationskoeffizient genannt. Er ist ein Maß für die Stärke und Richtung der linearen Beziehung zweier Variablen.

Auf einer Skala von 1 bis -1 wird dieser nun mit folgender Formel (Abb.13) berechnet:

$$\text{Korrelationskoeffizient} = (\text{Kovarianz von X und Y}) / (\text{Standardabweichung von X} * \text{Standardabweichung von Y})$$

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\left(\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2\right)\left(\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2\right)}}$$

Abbildung 13 r = Korrelationskoeffizient, n = Stichprobengröße, x_i und y_i = Werte der beiden Variablen, \bar{x} und \bar{y} = Mittelwerte der beiden Variablen x und y

1 beschreibt eine perfekte, positive Korrelation. Das bedeutet, dass beide Variablen immer in die gleiche Richtung (Vektor) gehen. Die perfekte negative Korrelation wird mit -1 beschrieben und zeigt, dass beide Variablen immer in die entgegengesetzte Richtung gehen. 0 gibt an, dass keine Beziehung zwischen den Variablen existiert. Da der Korrelationskoeffizient nur die Stärke und Richtung zweier Variablen angibt, kann mit ihm nicht sichergestellt werden, dass eine Variable die andere Variable verursacht, was in den hier beschriebenen Experimenten relevant ist, da sie komplett unabhängig voneinander durchgeführt wurden. Daher, liegt hier keine Kausalität vor (Lange and Bender 2007, 9-11).

Der Korrelationskoeffizient der beiden Seren betrug bei der Versuchsreihe mit ConA 0,842, bei der mit LPS 0,942 und bei der Kontrollgruppe 0,821. Das Pferdeserum kann mit einer guten statistischen Korrelation genauso gut wie FBS für Experimente dieser Art verwendet werden.

5.4 Geschlechtsbezogener Zusammenhang

In den folgenden Grafiken wurden die weiblichen und männlichen Probanden getrennt voneinander auf ihre Zellzahlentwicklung im Laufe der Zeit miteinander verglichen. Diese Darstellung dient der besseren Veranschaulichung von eventuellen geschlechtsspezifischen Unterschieden. Wir wählten hierfür FBS und equines Serum, da sie die höchsten Zellwerte erreichten.

5.4.1 ConA

Mit ConA scheinen die männlichen Pferde immunkompetenter zu sein, da sie wesentlich höhere Zellzahlen liefern. Dieser Effekt konnte sowohl mit FBS (Abb.14). als auch equinem Serum (Abb.15). beobachtet werden.

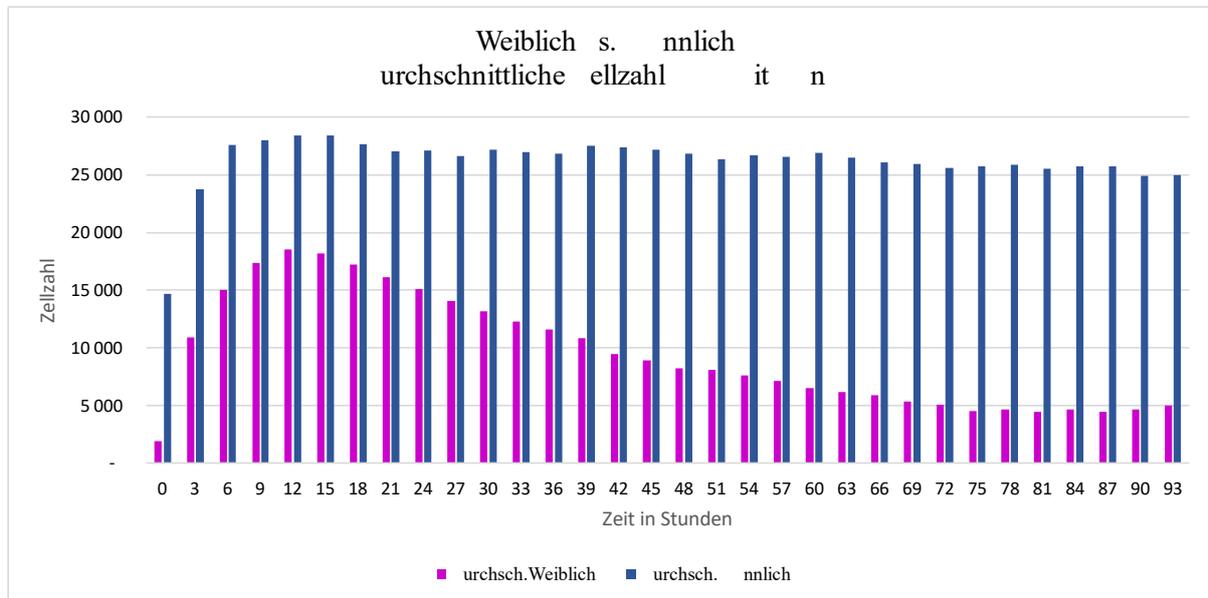


Abbildung 14 Diese Graphik zeigt die unterschiedlichen Zellzahlen als Mittelwert im Lauf der Zeit mit dem Zellstimulans ConA.

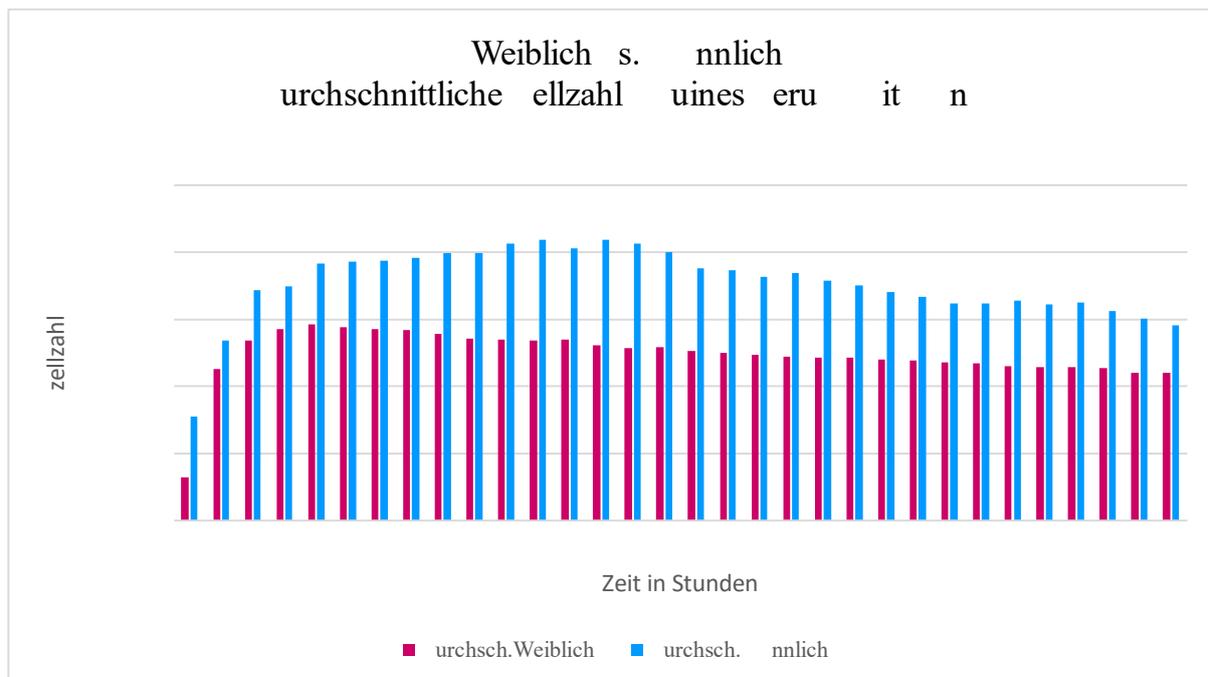


Abbildung 15 Diese Graphik zeigt die unterschiedlichen Zellzahlen als Mittelwert im Lauf der Zeit mit dem Zellstimulans ConA im equinen Serum.

Mit dem Zellstimulans ConA scheinen die männlichen Tiere immunkompetenter zu sein, da sie wesentlich höhere Zellzahlen als die Stuten liefern und diese bis Ende auch so beibehalten. Vergleichend kann gesagt werden, dass mit dem Zellstimulans ConA die Zellen der Stuten in beiden Seren schlechter abschneiden als die der männlichen Probanden.

5.4.2 LPS

Wobei beide Geschlechter anfangs ähnliche Zellzahlen haben mit LPS (Abb.16), flacht die Kurve der Stuten schneller ab, während die Zellzahl der männlichen Tiere konstant hoch bleibt.

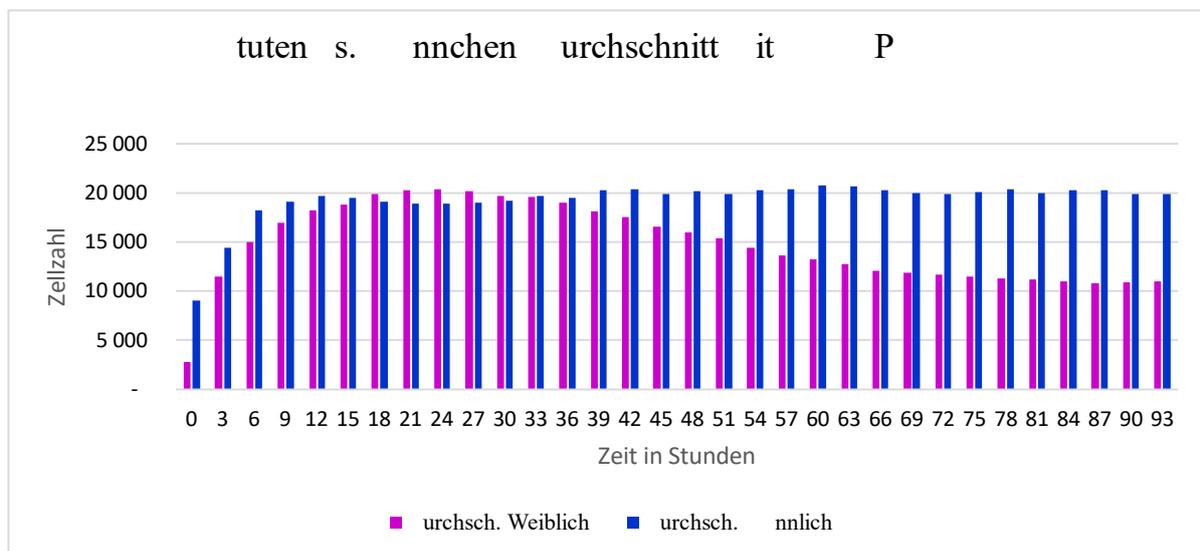


Abbildung 16 Diese Graphik zeigt die unterschiedlichen Zellzahlen als Mittelwert im Lauf der Zeit mit dem Zellstimulans LPS.

Die Zellzahl der männlichen Tiere steigt mit LPS rapide und hat konstant höhere Werte als die der Stuten mit LPS (Abb.17).

Im Vergleich fällt auf, dass die weiblichen Werte nur geringfügig unter denen der männlichen liegen und das in beiden Seren.

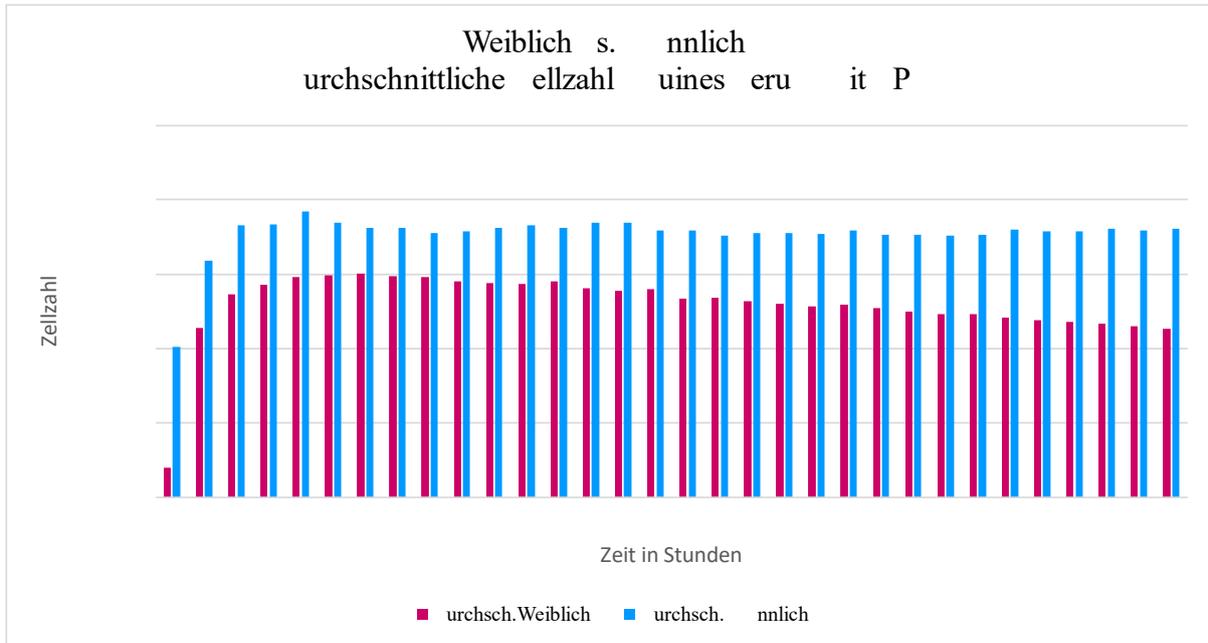


Abbildung 17 Diese Graphik zeigt die unterschiedlichen Zellzahlen als Mittelwert mit equinem Serum im Lauf der Zeit mit dem Zellstimulans LPS.

5.4.3 Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe mit FBS (Abb. 18) scheinen die Stuten in den ersten Zeitabschnitten immunkompetenter zu sein, da sie hier wesentlich höhere Zellzahlen liefern. Dieser Effekt flacht im Laufe der Zeit ab und sie nähern sich den Zellzahlen ihrer männlichen Kollegen.

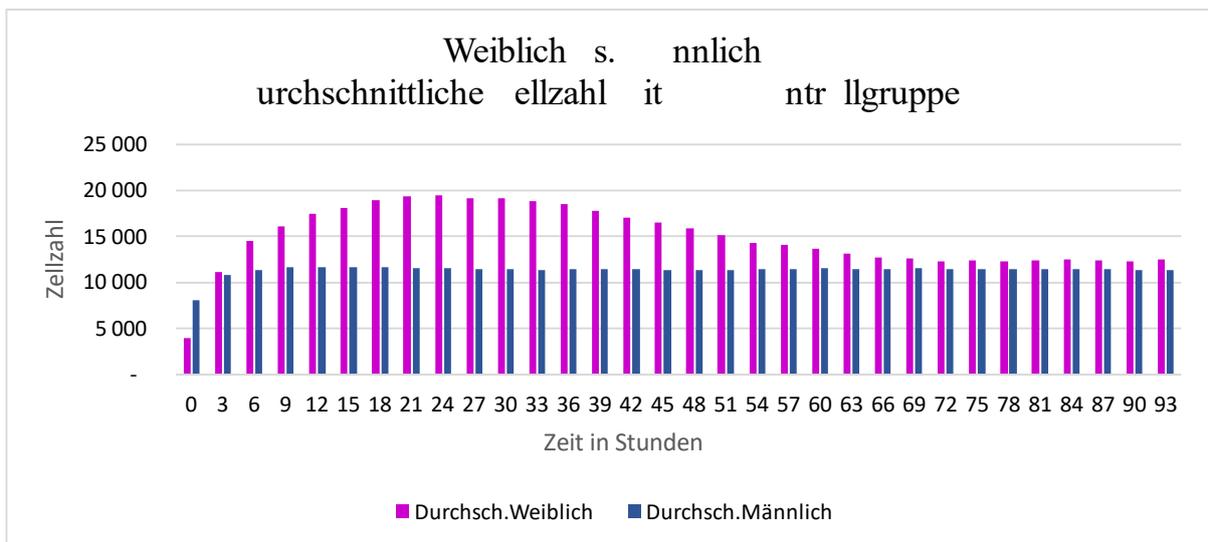


Abbildung 18 Diese Graphik zeigt die unterschiedlichen Zellzahlen als Mittelwert im Laufe der Zeit der Kontrollgruppe mit FBS

Die Abbildung 19 zeigt die unterschiedlichen Zellzahlen im Laufe der Zeit der Kontrollgruppe mit equinem Serum. Hier scheinen die Stuten generell immunkompetenter zu sein, da sie wesentlich höhere Zellzahlen liefern. Sie liefern durchgehend höhere Zellzahlen als ihre männlichen Kollegen.

Im Vergleich der beiden Kontrollgruppen haben die weiblichen Tiere eindeutig bessere Zellwerte als ihre männlichen Vergleichstiere.

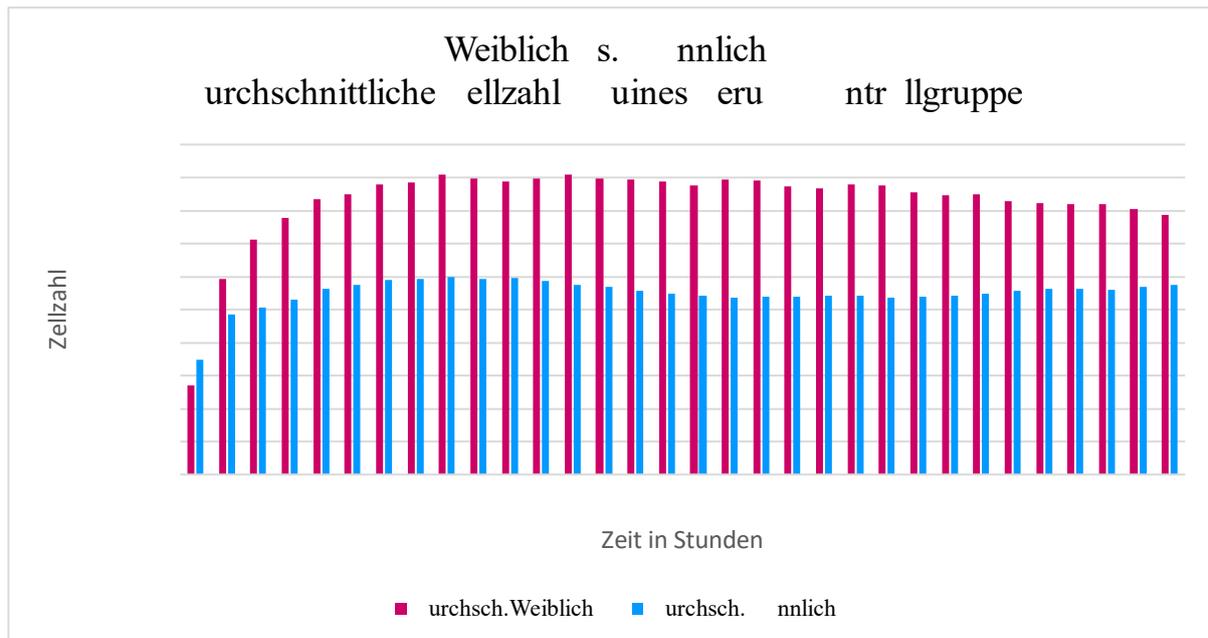


Abbildung 19 Diese Graphik zeigt die unterschiedlichen Zellzahlen als Mittelwert im Laufe der Zeit der Kontrollgruppe mit equinem Serum.

5.5 Diskussion und weitere Schritte

Da das equine Serum über alle Pferde ähnliche Zellmaxima und auch höhere Werte als das FBS über einen längeren Verlauf beibehielt, wurde dieses Serum für weitere Experimente verwendet. Es überzeugte zudem durch seine kostengünstige Herstellung, da das Pferdeserum in diesen Experimenten ein Abfallprodukt war. Auch war es ethisch unbedenklicher als das FBS. Humanes und porcines Serum, sowie ePL, wurden für weitere Experimente als potenziell alternatives Nährmedium zu FBS als nicht geeignet befunden. Die gemessenen Zellzahlen waren weitaus unter denen von FBS und equinem Serum. Da Mensch und Schwein näher miteinander als zum Pferd verwandt sind, verwundert es auch nicht, dass diese Seren ähnliche Zellwerte lieferten. EPL lieferte auch keine herausragend guten Werte. Dies könnte daran liegen, dass zwar Wachstumsfaktoren enthält, aber weniger nährstoffreich als das equine

Serum ist. Zudem kann durch die vorhergegangene Lagerung des ePLs ein geringer Qualitätsverlust aufgetreten sein. Das equine Serum hingegen wurde frisch hergestellt.

Interessant ist, dass die Zellen der Stuten mit jedem der Zellstimulanzen schlechtere Werte lieferten als die der männlichen Pferde. In der Kontrollgruppe beider Seren hatten sie wiederum die höchsten Zellzahlen. Obwohl dieser Versuchsaufbau viel zu wenig verschiedene Pferde beinhaltete, lassen die Ergebnisse die Vermutung aufkommen, dass es geschlechtsspezifische Unterschiede in der Immunkompetenz gibt. In folgenden Versuchen sollte nicht nur die Frage nach dem optimalen Serum, sondern auch die Frage nach dem optimalen Spendertier gestellt werden. Je nach wissenschaftlicher Fragestellung gibt es anscheinend geeignetere, sowie ungeeignete Kandidaten.

6 Ergebnisse Hauptexperiment

6.1 Einleitung

Im folgenden Experiment wurde die Reaktion der equinen PBMCs *in vitro* auf Probiotika der Stämme *Enterococcus faecium* DSM 10663/NCIMB 10415 und *Lactobacillus acidophilus* CECT 4529 untersucht. Neben einer Kontrollgruppe, nur mit den jeweiligen Seren, wurde auch immer eine Probe mit ConA als Postivkontrolle versetzt. Für eine leichtere Lesbarkeit im folgenden Fließtext wurden die Proben, welche mit den Probiotika versetzt wurden, mit *Enterococcus faecium* (*E.f.*) bezeichnet.

Für die Probiotikasupplementation wurde ein kommerziell erwerbliches Präparat der Firma OMNi-BiOTiC® (Institut AllergoSan, Österreich) namens CAT & DOG verwendet. Es enthält Maisstärke, Mannan-Oligosaccharide (MOS), Maltodextrin, Bakterienstämme* (= *Enterococcus faecium* DSM 10663/NCIMB 10415 und *Lactobacillus acidophilus* CECT 4529) zu je 1,25 Milliarden KBE (koloniebildenden Einheiten) pro Portion.

Der Versuchsaufbau ist ident zu dem ersten Versuch, mit der einzigen Ausnahme, dass *E.f.* statt LPS verwendet wurde. Hier erfolgte die Messung mit dem Incucyte®, laufend alle 3h.

6.2 Zellzählung mit Countess-Zellzähler in verschiedenen Seren

6.2.1 Ergebnisse nach 24h

Nach 24h wurden in den Proben folgende Werte lebender Zellen pro Well in absteigender Rangfolge gemessen (Abb.20): Bovines Serum mit *E.f.* mit 878690 Zellen, equines Serum mit *E.f.* 842337 Zellen, bovines Kontrollserum mit 448915 Zellen, equines Kontrollserum 263208 mit Zellen, bovines Serum mit ConA 227370 Zellen und equines Serum mit ConA 130839 Zellen.

Die Überlebensrate nach 24h schien am besten im equinen Serum mit *E.f.* von 179%, gefolgt vom bovines Kontrollserum mit 127%, equines Serum mit ConA 106%, bovinem Serum mit *E.f.* mit 105% zu sein, während das equine Kontrollserum und das bovine Serum mit ConA 100% erreichten.

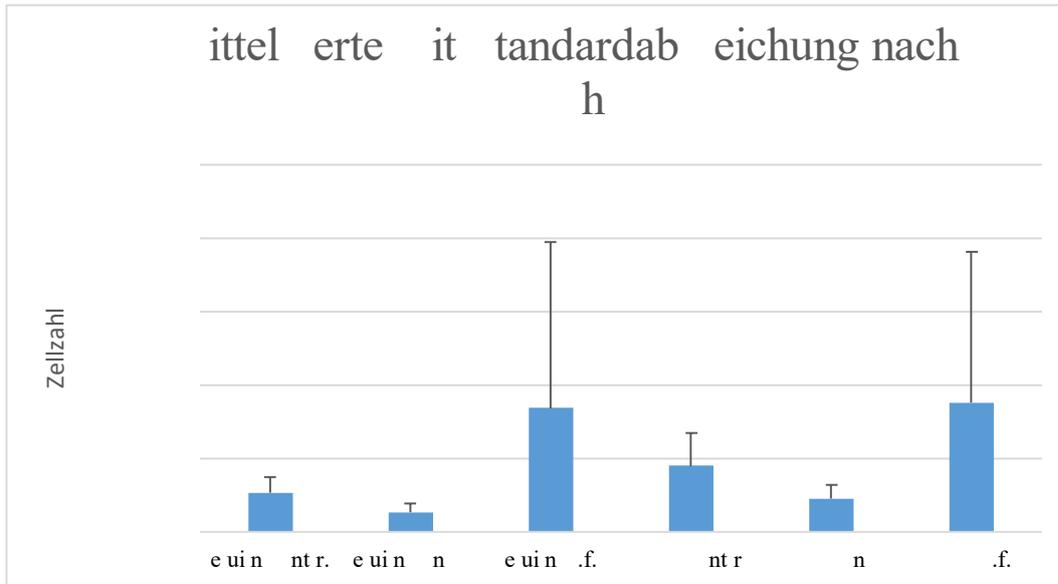


Abbildung 20 Mittelwerte alle PBMCs über alle Seren zum Zeitpunkt 24h.

6.2.2 Ergebnisse nach 48h

Nach 48h wurden in den Proben folgende Werte (Abb.21) lebender Zellen in absteigender Rangfolge gemessen:

Bovines Serum mit *E.f.* mit 421633 Zellen, equines Serum mit *E.f.* mit 299023 Zellen, bovinen Serum mit ConA mit 210002 Zellen, equines Kontrollserum 183442 Zellen, bovinen Kontrollserum mit 157308 Zellen und equines Serum mit ConA 130359 Zellen.

Die Überlebensrate nach 48h schien am höchsten im equinen Kontrollserum zu sein mit 104%, equines Serum mit ConA mit 97%, bovinen Serum mit ConA mit 87%, equines Serum mit *E.f.* mit 75%, gefolgt vom equinen Kontrollserum mit 65% und an letzter Stelle das bovine Kontrollserum mit 31%.

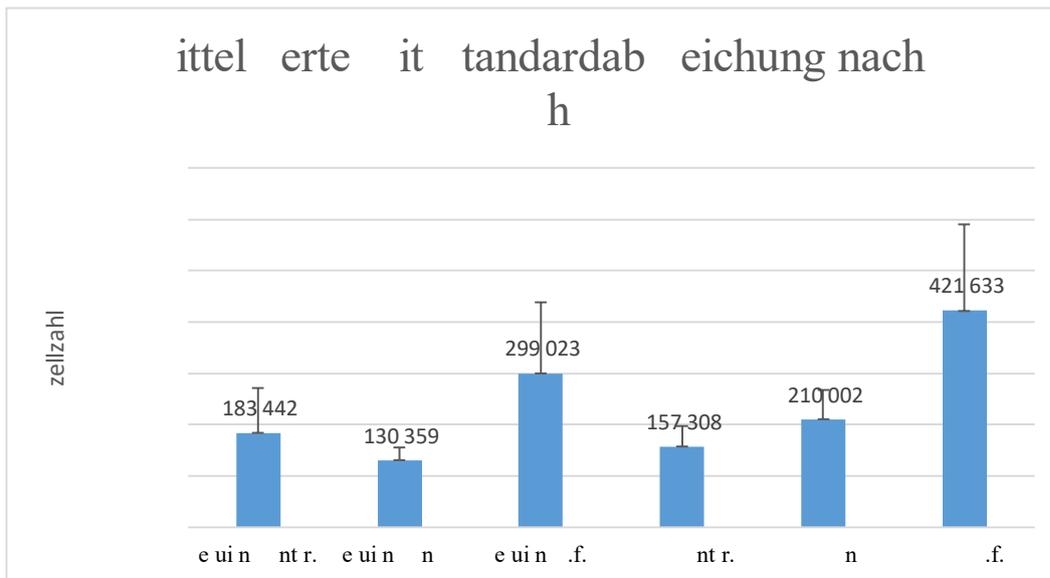


Abbildung 21 Mittelwerte aller PBMCs über alle Seren zum Zeitpunkt 48h.

6.2.3 Ergebnisse nach 72h

Nach 72h wurden in den Proben folgende Werte (Abb.22) lebender Zellen in absteigender Rangfolge gemessen:

Die Überlebensrate nach 72h schien am höchsten im equinen Serum mit *E.f.* 297248 Zellen, bovines Serum mit *E.f.* mit 280150 Zellen, equines Kontrollserum mit 225600 Zellen, bovines Kontrollserum mit 218190 Zellen, bovines Serum mit ConA 170658 Zellen und equines Serum mit ConA mit 107163 Zellen.

Die Überlebensrate nach 72h schien am besten im equinen Kontrollserum zu sein mit 154%, bovines Serum mit ConA 98%, bovines Kontrollserum mit ConA 84%, equines Serum mit *E.f.* 83%, equines Serum mit ConA 63% und gefolgt vom bovinen Serum mit *E.f.* mit 37%.

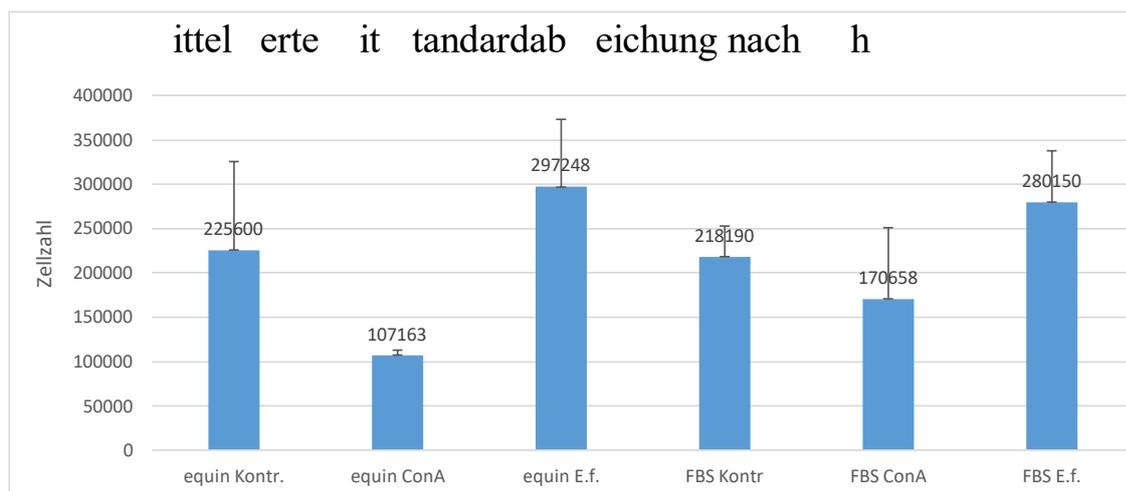


Abbildung 22 Mittelwerte aller PBMCs über alle Seren zum Zeitpunkt 72h.

6.3 Ergebnisse im Incucyte®

Parallel zu den Proben für die Countess wurden die gleichen Proben für den Incucyte® vorbereitet und über einen Zeitraum von 72 h gemessen. Von jedem Probanden wurden die Zellen dafür einmal mit ConA, *E.f.* verwendet oder als Kontrollgruppe ohne Zusatz gelassen (Abb 23). Sowohl auf RPMI versetzt mit FBS als auch mit equinem Serum wurden diese Proben kultiviert, um nebenbei abermals die Hypothese des Vorexperimentes zu untersuchen. Die Proben wurden nach folgendem Schema auf den eigens für den Incucyte® konzipierten Platten aufgetragen:

Kontr. FBS	ConA FBS	<i>E.f.</i> FBS	Kontr. equin	ConA equin	<i>E.f.</i> equin
Kontr. FBS	ConA FBS	<i>E.f.</i> FBS	Kontr. equin	ConA equin	<i>E.f.</i> equin
Kontr. FBS	ConA FBS	<i>E.f.</i> FBS	Kontr. equin	ConA equin	<i>E.f.</i> equin

Abbildung 23 Pipettierschema Hauptexperiment

Pro Zeile wurde ein biologisches Replikat mit zwei technischen Replikaten verwendet. Die Messung erfolgte alle 3h in Form von 16 Einzelbildern pro Quadrant. Diese wurden aufsummiert und alle Werte eines Zeitpunktes, aller biologischen Replikate des gleichen Supplements, gemittelt. Alle Berechnungen erfolgten mittels Excel Tabellen.

In den nachfolgenden Graphiken ist anzumerken, dass zum Zeitpunkt 27h und 33h bei drei biologischen Replikaten die Messwerte fehlen, wahrscheinlich aufgrund technischer Probleme

des Gerätes. Um diesen Messfehler zu beheben, wurden diese Werte interpoliert. Zudem konnten bei ein paar Messungen vom Gerät keine Zellen ausgezählt werden und es kam somit zu Nullwerten. Da diese die Durchschnittswerte erheblich beeinflusst hätten, wurden sie, sofern sie einzeln auftraten, interpoliert. Ab einer Anzahl von mehr als einem Nullwert hintereinander, wurde die Probe aus den Durchschnittswerten entfernt, da hier die Verfälschung zu groß gewesen wäre. Alle interpolierten Werte sind farblich gekennzeichnet im Anhang zu finden.

Da das Zellkulturmedium rasch aufgebraucht wurde von den Zellen, wurde es nach 24h ergänzt.

6.3.1 Ergebnisse in allen Gruppen

In der folgenden Abbildung 24 ist eine Übersicht über alle Seren im zeitlichen Verlauf zu sehen. Zu erkennen ist das Zellsterben bei 24h und der darauffolgende Zellanstieg nach Mediumwechsel.

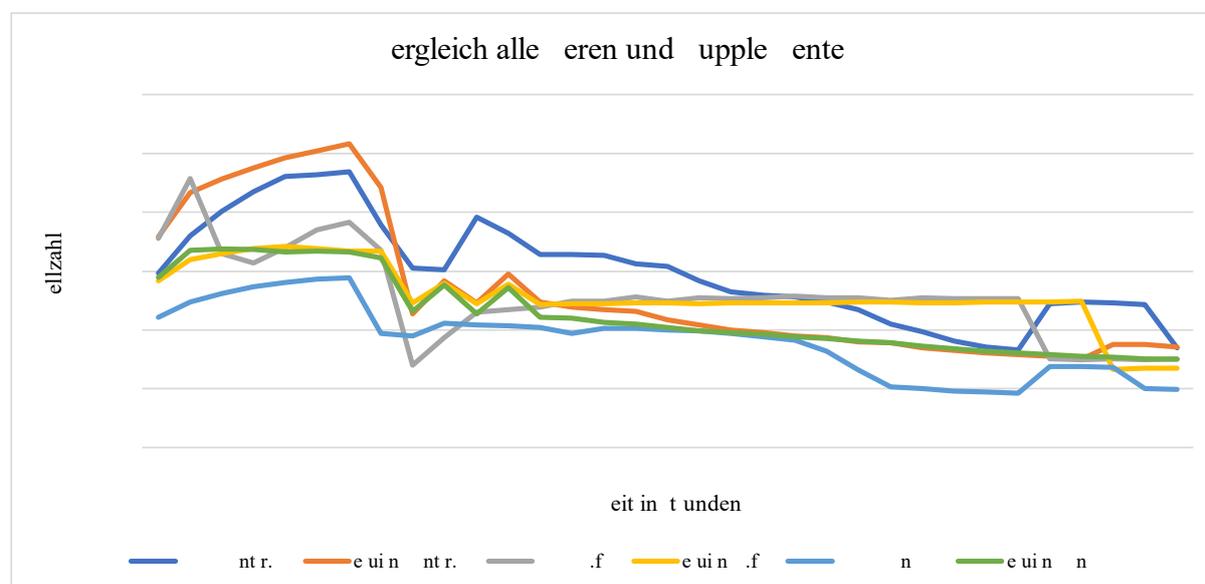


Abbildung 24 Diese Darstellung bietet eine Übersicht über alle Seren sowie Supplemente als Mittelwerte im zeitlichen Verlauf.

In der Abbildung 25 ist zu sehen, dass die PBMCs im equinen Serum eine schnellere und höhere Zellzahl als in FBS erreichen, aber im späteren zeitlichen Verlauf eine geringere Zellzahl aufweisen. Zudem brachte der Mediumwechsel bei 24h viele Zellen zum Absterben, oder sie wurden dabei weggespült. Diese vermehrten sich aber nachher durch Zellteilung wieder.

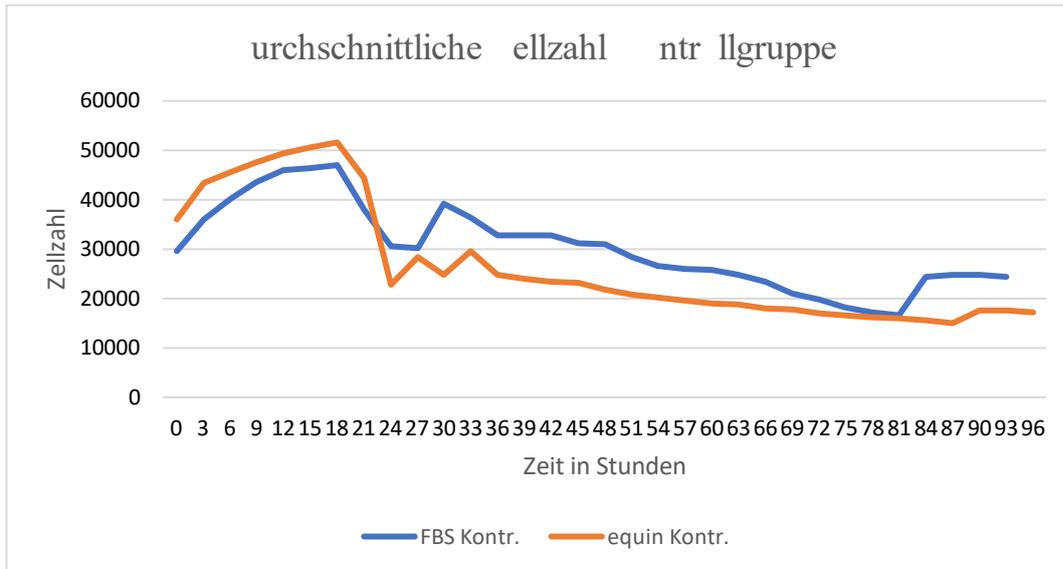


Abbildung 25 Entwicklung der absoluten Zellzahlen in Form von Mittelwerten in der Kontrollgruppe von FBS und equinem Serum.

Mit ConA als Zellstimulanz (Abb. 26) schneidet das FBS im Bezug zur Zellzahl geringfügig schlechter ab als das equine Serum. Gegen Ende des Versuches erreichen beide ungefähr dieselbe Zellzahl.

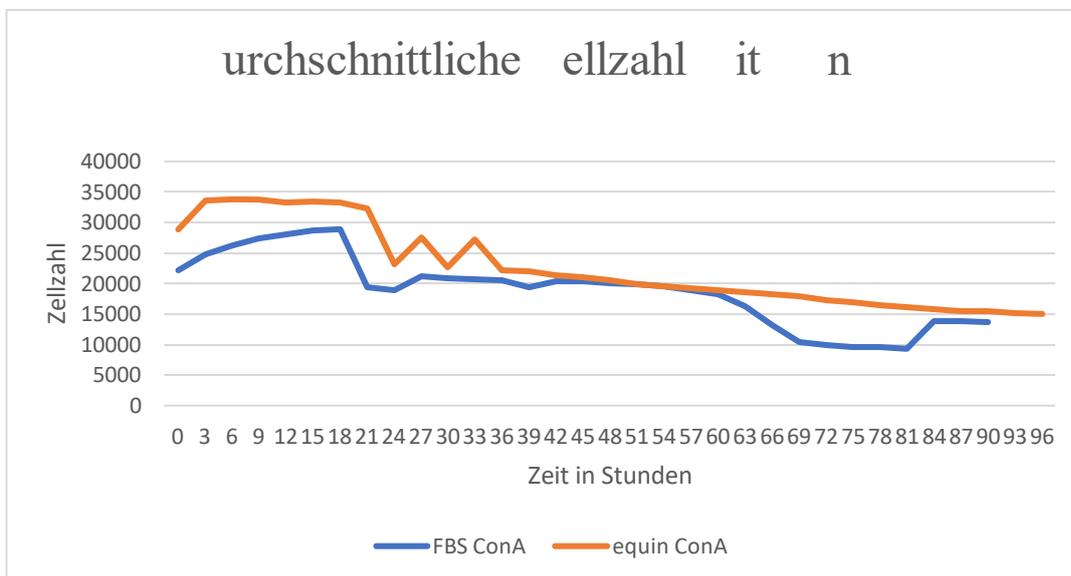


Abbildung 26 Entwicklung der absoluten Zellzahlen in Form von Mittelwerten mit ConA in FBS und equinem Serum.

Mit FBS (Abb.27) ist ein rapider Anstieg der Zellzahl zu beobachten, der aber im Verlauf der Zeit wieder abflacht. Interessant ist hier, dass FBS und equines Serum im Zeitraum von 39h

bis 78h fast identische Zellzahlen aufweisen und diese auch konstant halten. Mit equinem Serum scheinen die Zellen etwas länger in einer stabilen Population zu leben.

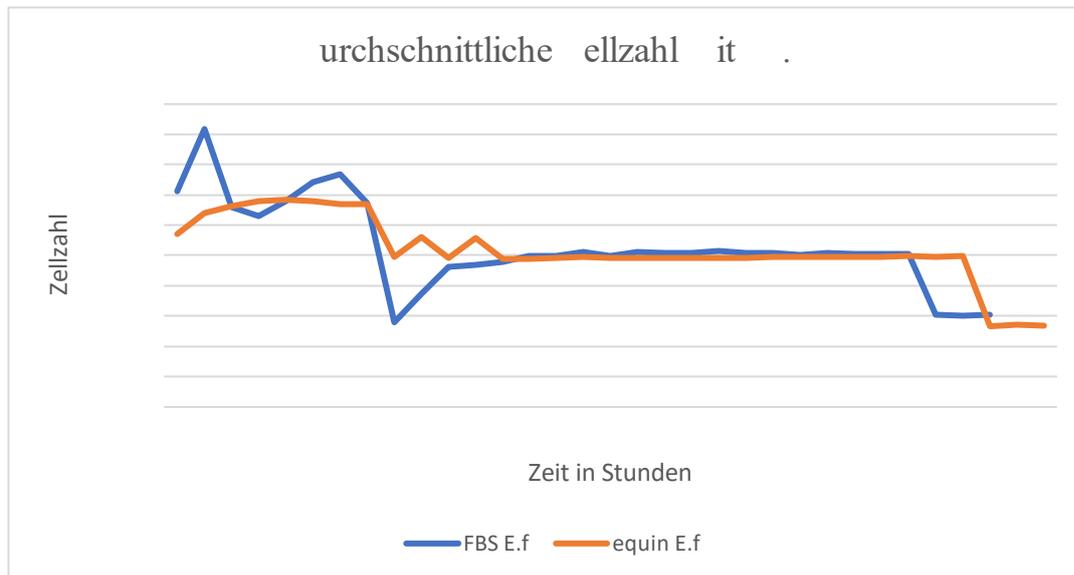


Abbildung 27 Entwicklung der absoluten Zellzahlen in Form von Mittelwerten über den zeitlichen Verlauf mit *E.f.* in FBS und equinem Serum.

6.4 Linearität

Für diverse Experimente mit PBMCs oder anderen Zellkulturen kann es von Vorteil sein, eine stabile Zellpopulation zu besitzen, die über einen längeren Zeitraum eine konstante Zellzahl aufweist. Wie sich in unseren Experimenten herausstellte, scheint sich *E.f.* für equine PBMCs als Supplement zu eignen. Hier spielt es nur eine geringfügige Rolle, ob FBS oder equines Serum verwendet wird, wobei hier in unserem Versuch equines Serum konstantere Werte erzielt hat. In einem Zeitraum von 36h bis 87h bleiben die Zellzahlen in equinem Serum fast linear, wie in der Abbildung 28 graphisch dargestellt wird.

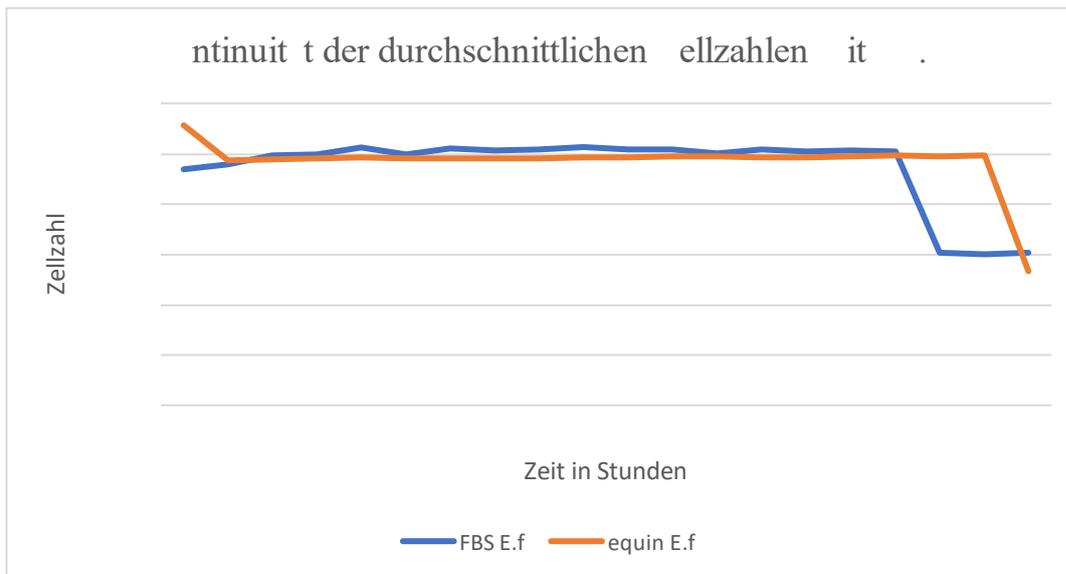


Abbildung 28 Darstellung des fast linearen Verlaufs von PBMCs mit dem Supplement E.f. zwischen Zeitpunkt 36h bis 78h in FBS und equinem Serum.

6.5 Korrelationskoeffizient

Um schlüssige Ergebnisse aus den Kurven zu erhalten, untersuchten wir zudem noch den Korrelationskoeffizienten verschiedener Kurven zueinander mit Hilfe der Funktion „=KORREL“ von Excel. Ziel war es, herauszufinden ob diverse Kurven ähnlich zur jeweiligen Kontrollgruppe sind. Die höchste Korrelation bestand beim equinen Serum mit ConA zur Kontrollgruppe mit 0,97, gefolgt vom equinen Serum mit E.f. zu 0,80. Hier liegt eindeutig eine Korrelation vor. Dies zeigt, dass das equine Serum sowohl mit ConA, als auch mit E.f. im Verlauf der Kontrollgruppe ähnelt und, je nach wissenschaftlicher Fragestellung, als Nährmedium samt Supplement verwendet werden kann.

Die Korrelation von FBS mit ConA zur Kontrollgruppe ergab 0,94 und zeigte somit einen ähnlichen Verlauf. Trotzdem erreichte es zu jedem Zeitpunkt schlechtere Werte als die Kontrollgruppe. FBS mit E.f. korrelierte nur zu 0,58 und zeigte somit, dass kein ähnlicher Verlauf bestand. Das equine Serum und FBS, jeweils mit E.f., korreliert zu 0,78.

6.6 Diskussion der Ergebnisse des Hauptexperimentes

Da der Mediumwechsel scheinbar einen hohen Stressfaktor für die Zellen bedeutete, empfehlen wir für folgende Versuche diesen zu vermeiden. Eine Strategie könnte dafür sein anfangs weniger Zellen auszusäen, da diese dann auch weniger Nährstoffe benötigen und so einen Mediumwechsel nicht dringend notwendig machen.

Der abrupte Zellabfall nach dem Mediumwechsel könnte auch daran liegen, dass Zellen mit dem alten Medium entsorgt wurden. In jedem der Fälle ist zu empfehlen, einen Mediumwechsel zu vermeiden.

Interessant ist auch, dass das equine Serum in der Kontrollgruppe eine fast idente Kurve wie die Proben mit FBS zeigt, aber in den Proben mit ConA oder *E.f.* bessere und stabilere Zellwerte aufweist. Dies unterstützt unsere Theorie, dass equines Serum für equine PBMCs eine valide Alternative zu FBS darstellt, vor allem, wenn mit Immunstimulanzen als Supplementation gearbeitet wird.

Wobei die Kontrollgruppe in beiden Seren schneller höhere Werte erreichten als dort, wo *E.f.* beigemischt wurde, bleiben die Zellzahlen mit *E.f.* im späteren Zeitverlauf stabiler auf einem höheren Wert als ohne. Betrachtet man nur die Ergebnisse der Countess, schneiden die Proben mit *E.f.* in jedem Zeitabschnitt am besten ab. Eine differenzierte Betrachtung je Zeitabschnitt ist hierfür notwendig. Zu betonen ist, dass ab 60h beide Seren mit *E.f.* die Kontrollgruppen in der Zellzahl überholten und lange Zeit eine stabile Population bilden konnten, während die Kontrollgruppen zunehmend Zellverluste erlitten. Die Zellen scheinen im Incucyte® mit *E.f.* eindeutig länger als ohne zu überleben. Diese Erkenntnis kann in Versuchen benötigt werden, in denen Zellen über einen längeren Zeitraum kultiviert werden.

Es scheint, dass die Probiotika eine immunzellfördernde Wirkung haben, zumindest in diesen *in vitro* Versuchen, da mit *E.f.* mehr lebende Zellen gemessen wurden. Eine erhöhte Immunzellzahl kann mit einer erhöhten Immunantwort gleichgesetzt werden, weil so das Immunsystem besser aufgestellt ist und effizienter gegen Antigene jeder Art arbeiten kann. Ein gut aufgestelltes Immunsystem ist für den Körper zwar ein energiekostenreicher Aufwand, resultiert aber meist in einem mildereren Krankheitsverlauf.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass *E.f.* als Supplement equine PBMCs in Kultur unterstützen, länger zu leben. Da es auch günstig ist und in geringen Dosen ausreicht, ist es eine gute Erweiterung zum normalen Nährmedium, vor allem, wenn die Zellen über längere Zeit in Kultur gehalten werden sollen.

Weil hier nur quantitative Versuche zu der Gesamtzellzahl aller lebenden Zellen gemacht wurden, wäre es in folgenden Versuchen interessant, auf die verschiedenen Immunzellarten einzugehen, die hier proliferieren.

Da *Enterococcus faecium* DSM10663/NCIMB 10415 (*E.f.*) und *Lactobacillus acidophilus* CECT 4529 (*L.a.*) in diversen Tierarten und beim Menschen gesundheitsfördernde Wirkungen

haben, ist es naheliegend, dass sie auch beim Pferd positive Auswirkungen auf das Immunsystem besitzen (Saedi et al. 2021). Studien über die erhöhte Nährstoffaufnahme (de Moura et al. 2009)

Die Begleittherapie bei Sandkoliken untermauern diesen Schluss (Landes et al. 2008)

Das Produkt OMNi-BiOTiC® (Institut AllergoSan, Österreich) namens CAT & DOG wirbt damit, die Darmflora von Hauskatzen und Hunden zu stabilisieren. Der aktuelle Fokus der Medizin und Hygienewissenschaften lag die letzten hundert Jahre auf der Elimination von Bakterien und anderen Krankheitserregern, auf Sterilität. Langsam ändert sich die Denkweise und „gute“ Bakterien rücken immer mehr in den Fokus der Wissenschaft, sei es die konservierende Laktobazillen Schicht am rohen Hühnerfleisch oder Probiotika in der Humanmedizin (Teitelbaum 2005). Da bei unseren Haustieren schon viele gute Ergebnisse publiziert wurden, sollte *E.f.* auch als Nahrungsergänzungsmittel für Pferde zugelassen werden. Weil *E.f.* aktuell in der EU noch nicht als Ergänzungsfuttermittel für Pferde zugelassen ist (Schoster et al 2014, 1641) für Haustiere und den Menschen aber schon, soll diese Studie dazu anregen, weitere Forschungen über das equine Immunsystem und Probiotika, mit Fokus auf *Enterococcus faecium* durchzuführen. Im Rahmen meiner Recherche konnte ich keine Literatur finden, die über negative Auswirkungen von Probiotika auf Pferde berichtet hat. Zudem ist das Verfüttern von Probiotika bei Pferden mit keinem hohen Aufwand verbunden, da es einfach in Pulverform über das Futter gestreut werden kann. Die Richtlinie der European Food and Drug Agency (EFSA) sollte überdacht werden und mit *Enterococcus faecium* und *Lactobacillus acidophilus* erweitert werden.

Die Gesundheit des Pferdes als Freizeit und Sportpartner erlangt einen immer höheren Stellenwert in unseren Kulturkreisen. Zeitgleich ist das Forschungsgebiet „equines Immunsystem“ noch lange nicht so gut erforscht wie das menschliche und bietet eine große Bandbreite an weiteren Forschungstätigkeiten für nachfolgende Versuche, die dazu dienen sollten, den Pferden ein möglichst langes und gesundes Leben zu bieten. Diese Pilotstudie soll eine Grundlage für weitere Arbeiten zu diesem Forschungsthema bieten.

7 Zusammenfassung

Das equine Immunsystem ist ein noch relativ unerforschtes Gebiet. Auch der Einfluss von Probiotika auf das equine Immunsystem ist noch wenig wissenschaftlich belegt, wobei bei anderen Spezies schon gute Erfolge beobachtet und dokumentiert wurden. Um Experimente am lebenden Individuum zu minimieren, bietet sich hier die Forschung *in vitro* mit equinen peripheren Blut Monozyten (PBMCs) an, da diese die zelluläre Einheit des Immunsystems darstellen können. Da diese sehr sensibel und nicht immortalisiert sind und somit nicht lange in Kultur leben, ist der Bedarf nach einem optimalen Nährmedium und Kulturbedingungen gegeben. Als Standard Operating Procedure für die Kultivierung von PBMCs wird meist fötales Rinderserum (FBS) verwendet. Da dieses teuer und ethisch fragwürdig ist, versuchten wir als Alternative adultes Pferdeserum. Damit befasst sich das erste Experiment dieser Arbeit. Es unterstützte unsere These, dass auch equines adultes Serum ein adäquater Ersatz für FBS ist. Auch die Abbildung 28 unterstützt unsere These, dass equines adultes Serum für weiterfolgende Experimente in Betracht gezogen werden sollte, da es, genauso wie FBS, eine gewisse Zeit eine fast konstante Zellpopulation erhält. Zudem ist es kostengünstiger und einfach zu erstellen. Im anschließenden zweiten Hauptexperiment wurde der Effekt von Probiotika, im speziellen *Enterococcus faecium* und *Lactobacillus acidophilus*, auf das Zellwachstum von equinen PBMCs untersucht. Dieses Verhalten *in vitro* kann Rückschlüsse auf das Immunsystem des Pferdes *in vivo* geben. Wenn equine PBMCs über einen längeren Zeitraum kultiviert werden, bleiben mit hinzugefügten Probiotika länger mehr Zellen am Leben als in den Versuchen ohne Probiotika. Die Proliferation und Viabilität der Immunzellen ist also verbessert. Das *Enterococcus faecium* und *Lactobacillus acidophilus* immunmodulierende Eigenschaften auf equine Immunzellen zeigen, konnte somit in diesen Experimenten gezeigt werden. Es bräuchte jedoch neben einer quantitativen Analyse noch eine qualitative Analyse, um die genauen Subtypen der Immunzellen zu analysieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Pilotstudie weisen darauf hin, dass Probiotika auch *in vivo* einen positiven Einfluss auf equine Immunzellen haben können, da eine höhere Anzahl an Immunzellen auf eine bessere Immunantwort schließen lässt.

8 Abstract

The equine immune system is still a relatively unexplored area. The influence of probiotics on the equine immune system is also still poorly documented, although good results have already been observed and documented in other species. To minimize experiments on living individuals, research *in vitro* with equine peripheral blood monocytes (PBMCs) are a good alternative, as these represent the cellular unit of the immune system. Since these are very sensitive and non-immortalized, and thus do not live long in culture, there is a need for optimal culture medium and culture conditions. fetal bovine serum (FBS) is most commonly used as the standard operating procedure for culturing PBMCs. Since this is expensive and ethically questionable, we tried adult horse serum as an alternative. This is what the first experiment of this work deals with. It supported our hypothesis that adult equine serum is also an adequate substitute for FBS. In the subsequent second main experiment, the effect of probiotics, specifically *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, on cell growth of equine PBMCs was investigated. When equine PBMCs are cultured for a longer period of time, more cells remain alive and also for longer time period with added probiotics than in the controls without probiotics. Thus, the proliferation and viability of immune cells is enhanced. It could thus be demonstrated in these experiments, that *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus* exhibit immunomodulatory properties on equine immune cells. However, in addition to quantitative analysis, qualitative analysis would be needed to analyze the exact subtypes of immune cells. The results of the present work indicate that probiotics may also have a positive effect on equine immune cells *in vivo*, as a higher number of immune cells suggests a better immune response.

9 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1 Verwandtschaftsbeziehungen der Araber der Familie Mauritsch. Die Stute Diamantina wurde nicht als Spender verwendet, da sie zum Zeitpunkt der Studie nicht mehr lebte. Aldeano ESP 02677 stammt aus einer spanischen Zucht und ist auch im Besitz der Familie Mauritsch (Männer, 2022).</i>	13
<i>Abbildung 2 Cryotube mit Pferdeblut und Histopaque-1077 -Lösung nach Zentrifugation. Die Schichtung ist von oben nach unten gut erkennbar: Plasma (gelb), Zellwolke (weiß) und Zellpellet (dunkel) (Männer 2022).</i>	16
<i>Abbildung 3 Pipetierschema für das Vorexperiment</i>	20
<i>Abbildung 4 Incucyte® Aufnahmen: PBMCs von Hengst Midoun zu den Zeitpunkten 18h, 1d12h, 3d mit porcinem Serum</i>	21
<i>Abbildung 5 Incucyte® Aufnahmen: PBMCs von Hengst Midoun zu den Zeitpunkten 18h, 1d12h, 3d mit equinem Serum</i>	21
<i>Abbildung 6 Incucyte® Aufnahmen: PBMCs von Hengst Midoun zu den Zeitpunkten 18h, 1d12h, 3d mit FBS</i>	21
<i>Abbildung 7 Incucyte® Aufnahmen: PBMCs von Hengst Midoun zu den Zeitpunkten 18h, 1d12h, 3d mit ePL</i>	22
<i>Abbildung 8 Entwicklung der absoluten Zellzahlen in Form von Mittelwerten über alle biologischen Replikate im Verlauf der Zeit mit ConA.</i>	23
<i>Abbildung 9 Entwicklung der absoluten Zellzahlen in Form von Mittelwerten über alle biologischen Replikate im Verlauf der Zeit mit LPS.</i>	24
<i>Abbildung 10 Entwicklung der absoluten Zellzahlen in Form von Mittelwerten über alle biologischen Replikate im Verlauf der Zeit der Kontrollgruppe.</i>	25
<i>Abbildung 11 Ähnlichkeitsfaktor der zeitlichen Verlaufskurve von den PBMCs mit equinem Serum und ConA. FBS als Referenzwert.</i>	26
<i>Abbildung 12 Ähnlichkeitsfaktor der zeitlichen Verlaufskurve von den PBMCs mit equinem Serum und LPS. FBS als Referenzwert.</i>	26
<i>Abbildung 13 r = Korrelationskoeffizient, n = Stichprobengröße, x_i und y_i = Werte der beiden Variablen, x und y, Mittelwerte der beiden Variablen x und y</i>	27
<i>Abbildung 14 Diese Graphik zeigt die unterschiedlichen Zellzahlen als Mittelwert im Lauf der Zeit mit dem Zellstimulans ConA.</i>	28
<i>Abbildung 15 Diese Graphik zeigt die unterschiedlichen Zellzahlen als Mittelwert im Lauf der Zeit mit dem Zellstimulans ConA im equinen Serum.</i>	28
<i>Abbildung 16 Diese Graphik zeigt die unterschiedlichen Zellzahlen als Mittelwert im Lauf der Zeit mit dem Zellstimulans LPS.</i>	29
<i>Abbildung 17 Diese Graphik zeigt die unterschiedlichen Zellzahlen als Mittelwert mit equinem Serum im Lauf der Zeit mit dem Zellstimulans LPS.</i>	30
<i>Abbildung 18 Diese Graphik zeigt die unterschiedlichen Zellzahlen als Mittelwert im Laufe der Zeit der Kontrollgruppe mit FBS.</i>	30
<i>Abbildung 19 Diese Graphik zeigt die unterschiedlichen Zellzahlen als Mittelwert im Laufe der Zeit der Kontrollgruppe mit equinem Serum.</i>	31
<i>Abbildung 20 Mittelwerte alle PBMCs über alle Seren zum Zeitpunkt 24h.</i>	34
<i>Abbildung 21 Mittelwerte aller PBMCs über alle Seren zum Zeitpunkt 48h.</i>	35

<i>Abbildung 22 Mittelwerte aller PBMCs über alle Seren zum Zeitpunkt 72h.</i>	<i>36</i>
<i>Abbildung 23 Pipettierschema Hauptexperiment</i>	<i>36</i>
<i>Abbildung 24 Diese Darstellung bietet eine Übersicht über alle Seren sowie Supplemente als Mittelwerte im zeitlichen Verlauf.....</i>	<i>37</i>
<i>Abbildung 25 Entwicklung der absoluten Zellzahlen in Form von Mittelwerten in der Kontrollgruppe von FBS und equinem Serum.</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 26 Entwicklung der absoluten Zellzahlen in Form von Mittelwerten mit ConA in FBS und equinem Serum.....</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 27 Entwicklung der absoluten Zellzahlen in Form von Mittelwerten über den zeitlichen Verlauf mit E.f. in FBS und equinem Serum.....</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 28 Darstellung des fast linearen Verlaufs von PBMCs mit dem Supplement E.f. zwischen Zeitpunkt 36h bis 78h in FBS und equinem Serum.....</i>	<i>40</i>

10 Quellen

Al Jassim, Rafat A., and Frank M. Andrews. 2009. The Bacterial Community of the Horse Gastrointestinal Tract and Its Relation to Fermentative Acidosis, Laminitis, Colic, and Stomach Ulcers. *Veterinary Clinic: Equine Practice* 25, no. 2 (8): 199-215

Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 2;101(44):15718-23. doi: 10.1073/pnas.0407076101. Epub 2004 Oct 25. PMID: 15505215; PMCID: PMC524219

ardell a i d. . “The In e n t i n f the i c r s c p e .” e t a e t a e t a i l g i c a l c i e t y 75, no. 2 (5): 78-84

Beck CN, McDaniel CD, Wamsley KGS, Kiess AS. The potential for inoculating *Lactobacillus animalis* and *Enterococcus faecium* alone or in combination using commercial in ovo technology without negatively impacting hatch and post-hatch performance. *Poult Sci*. 2019 Dec 1;98(12):7050-7062. doi: 10.3382/ps/pez441. PMID: 31420659; PMCID: PMC8913989

Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A: Probiotic Mechanisms of Action. *Ann Nutr Metab* 2012; 61:160-174. doi: 10.1159/000342079

Castillo-Rojas G, Mazari-Hiriart M, Ponce de León S, Amieva-Fernández RI, Agis-Juárez RA, Huebner J, López-Vidal Y. Comparison of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains isolated from water and clinical samples: antimicrobial susceptibility and genetic relationships. *PLoS One*. 2013;8(4):e59491. doi: 10.1371/journal.pone.0059491. Epub 2013 Apr 1. PMID: 23560050; PMCID: PMC3613387

Cheng H, Ma Y, Liu X, Tian C, Zhong X, Zhao L. A Systematic Review and Meta-Analysis: *Lactobacillus acidophilus* for Treating Acute Gastroenteritis in Children. *Nutrients*. 2022 Feb 6;14(3):682. doi: 10.3390/nu14030682. PMID: 35277042; PMCID: PMC8839062 (Zugriff 12.05.2023)

de Moura R, Eloísa de Oliveira S, Queiroz. de Almeida F, Lana A, Silva V, Carneiro de Rezende A. 2009. Feed efficiency in Mangalarga Marchador foals fed diet supplemented with probiotics or phytase. *Revista Brasileira de Zootecnia* 01/Jun/2009;38(6):1045-50. DOI: 10.1590/S1516-35982009000600011

Du Y, Luo S, Zhou X. *Enterococcus faecium* Regulates Honey Bee Developmental Genes. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 9;22(22):12105. doi: 10.3390/ijms222212105. PMID: 34829986; PMCID: PMC8621553. (Zugriff 12.05.2023)

Edward, Stevens C., and Ian D. Hume. 1998. Contributions of Microbes in Vertebrate Gastrointestinal Tract to Production and Conservation of Nutrients. *Physiological Review*.78: 393–427, 1998

Europäische Union. . “ O N U N G G N r. / U O P I N P A R L A M E N T S U N D D E S R A T E S v o m 22. S e p t e m b e r 2003 ü b e r Z u s a t z s t o f f e z u r V e r w e n d u n g i n d e r T i e r e r n ä h r u n g .

Fusi E, Rizzi R, Polli M, Cannas S, Giardini A, Bruni N, Marelli SP. Effects of *Lactobacillus acidophilus* D2/CSL (CECT 4529) supplementation on healthy cat performance. *Vet Rec Open*. 2019 Dec 20;6(1):e000368. doi: 10.1136/vetreco-2019-000368. PMID: 31897301; PMCID: PMC6924845

Industrie wissenschaftliches Institut er ig W. chneider Peter UPTÁČI , and Klara Fuchsreiter. 2019. Wirtschaftsfaktor Pferd in Österreich

Kreuzer, S., Machnowska, P., Aßmus, J. *et al.* Feeding of the probiotic bacterium *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 differentially affects shedding of enteric viruses in pigs. *Vet Res* 43, 58 (2012).

Kreuzer-Redmer, Susanne. 2021. *Isolation and Cultivation of bovine PBMCs*, Standard Operating Procedure. N.p.: Veterinärmedizinische Universität Wien. Dep.3.: Animal Nutrition and Functional Plant Compound.

Kues, Wilfried. 2020. *Biochemie für die Tiermedizin*. Edited by Wilfried Kues and Maren v. Köckritz-Blickwede. Deutschland: Georg Thieme Verlag. 10.1055/b-005-145219.

Landes, A. D., D. M. Hassel, J. D. Funk, and A. Hill. 2008. Fecal Sand Clearance Is Enhanced with a Product Combining Probiotics, Prebiotics, and Psyllium in Clinically Normal Horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 28, no. 2 (2): 79-84. 10.1016/j.jevs.2008.01.004

Lange, S., and R. Bender. 2007. *Lineare Regression und Korrelation*. 23 (132): 9-11. 10.1055/s-2007-959028 (Zugriff 12.05.2023)

Männer, Sonja. 2022. Etablierung eines Zellkultursystems mit primär kultivierten equinen Immunzellen aus dem Blut zur in vitro Untersuchung von immunmodulatorischen Futtermitteladditiva., Veterinärmedizinische Universität Wien.

Meyer H, Coenen M., Vervuert I., 2019. *Pferdefütterung*. Deutschland: Georg Thieme Verlag. 10.1055/b-006-161670. 17-41

Ozen, M., and E. C. Dinleyici. 2015. The history of probiotics: the untold story. *Beneficial Microbes* 6, no. 2 (1): 159-165

Patel R.S., Tomlinson J.E., Divers T.J., Van de Walle G.R., Rosenberg B.R. 2021. Single-cell resolution landscape of equine peripheral blood mononuclear cells reveals diverse cell types including T-bet+B cells. *BMC Biology* 19(1):13.doi 10.1186/s12915-020-00947-5.

Peng X, Wang R, Hu L, Zhou Q, Liu Y, Yang M, Fang Z, Lin Y, Xu S, Feng B, Li J, Jiang X, Zhuo Y, Li H, Wu D. 2019. Che L. *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 administration improves the intestinal health and immunity in neonatal piglets infected by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *J Anim Sci Biotechnol*. Aug 21;10:72. doi: 10.1186/s40104-019-0376-z. PMID: 31452881; PMCID: PMC6702752

Russell, K. A., Koch T.G.. 2015. Equine platelet lysate as an alternative to fetal bovine serum in equine mesenchymal stromal cell culture – too much of a good thing? *EQUINE VETERINARY JOURNAL* 48, no. 2 (3): 261-264

Saedi E., Hossein M. Yarahmadi, Jafar Fakhraei, Somayeh Mojahedi. 2021. Effect of Feeding Fructooligosaccharides and *Enterococcus faecium* and Their Interaction on Digestibility, Blood, and Immune Parameters of Adult Horses. *Journal of Equine Veterinary Science* , Volume 99 ,103410

Santacroce L , Charitos I, Bottalico L. 2019. A successful history: probiotics and their potential as antimicrobials. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 17, no. 8 (7): 5-645

Schoster, A., J. S. Weese, and L. Guardabassi. 2014. Probiotic Use in Horses – What is the Evidence for Their Clinical Efficacy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28, no. 6 (11): 1633-1891.

Schütt C., Bröcker B. 2011. *Grundwissen Immunologie*. Springer Verlag. 3827426472, 9783827426475. 23-46

Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH. Probiotika - Lexikon der Biologie. Spektrum der Wissenschaft. (Aufgerufen 8.11. 2022)

Suerbaum, Sebastian, Helmut Hahn, Thomas F. Schulz, and Stefan H. Kaufmann, 2008. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer Berlin Heidelberg. 30

Teitelbaum, Jonathan E. MD. Probiotics and the Treatment of Infectious Diarrhea. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 24(3):p 267-268, March 2005. DOI: 10.1097/01.inf.0000156408.17683.a6

Universität Zürich. 2021. Korrelation nach Bravais-Pearson. UZH - Methodenberatung

Vahjen, W., & Männer, K. 2003. The effect of a probiotic *Enterococcus faecium* product in diets of healthy dogs on bacteriological counts of *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Clostridium* spp. in faeces. *Archives of Animal Nutrition*, 57(3), 229–233. doi:10.1080/0003942031000136657

Wehrend, Axel, Walter Brehm, Heidrun Gehlen, and Bernhard Ohnesorge. 2016. *Handbuch Pferdepraxis*. Stuttgart, Deutschland: Enke Verlag. 28

WORLD HEALTH ORGANIZATION and FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION
O T UNIT N TION . . “ Pr bi tics in f d.” d and griculture Organizati n
of the United Nations. <https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>.

Wunderlich P. . raun . u agalli I. ’ puzzo, V., Heim, F., Karly, M., Zeltner, L. 1989. Double-Blind Report on the Efficacy of Lactic Acid-Producing *Enterococcus* SF68 in the Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhoea and in the Treatment of Acute Diarrhoea. *Journal of International Medical Research*, 17(4), 333–338. doi:10.1177/030006058901700405.

Zhou X, Willems RJL, Friedrich AW, Rossen JWA, Bathoorn E. *Enterococcus faecium*: from microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnostics. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2020 Aug 10;9(1):130. doi: 10.1186/s13756-020-00770-1. PMID: 32778149; PMCID: PMC7418317.