



FRIEDRICH-SCHILLER-
UNIVERSITÄT
JENA

 **UNIVERSITÄTS**
KLINIKUM
Jena

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

Modulation der gastrointestinalen Mikrobiota durch probiotische Laktobazillen – Einfluss auf zirkulierende proinflammatorische IL-17 positive Zellen bei Patienten mit Morbus Crohn

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena von

Anne Haupt

geboren am 14.02.1995 in Weimar

Jena, 09.01.2024

GutachterInnen (akademischer Grad, Vor- und Nachname sowie Wirkungsort)

1. **Prof. Dr. med. Andreas Stallmach**, Klinik für Innere Medizin IV, Universitätsklinikum Jena
2. **Prof. Dr. Christina Zielinski**, Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Hans-Knöll-Institut Jena
3. **Prof. Dr. med. Raja Atreya**, Universitätsklinikum Erlangen, Medizinische Klinik 1 – Gastroenterologie, Pneumologie und Endokrinologie

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.01.2025

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	I
2. Zusammenfassung	V
3. Einleitung	- 1 -
3.1 Morbus Crohn	- 1 -
3.1.1 Therapie.....	- 2 -
3.2 Die Darmbarriere	- 3 -
3.3 Gastrointestinale Mikrobiota	- 4 -
3.3.2 Probiotika	- 5 -
3.3.3 Laktobazillen.....	- 6 -
3.4 IL-17	- 7 -
3.4.1 IL-17 Signalweg.....	- 8 -
3.4.2 Differenzierungsschritte von TH17-Zellen	- 9 -
3.4.3 CD161 als Oberflächenmarker.....	- 10 -
4. Ziele der Arbeit.....	- 11 -
5. Material und Methoden	- 13 -
5.1 Auswahl der Patienten	- 13 -
5.2 Ernährungs- und Stuhltagebuch.....	- 14 -
5.3 Untersuchungsmaterialien.....	- 14 -
5.3.1 Chemikalien	- 14 -
5.3.2 Oberflächenmarker und Zytokine	- 15 -
5.3.3 Puffer und Lösungen	- 18 -
5.3.4 Verbrauchsmaterialien	- 19 -
5.3.5 Geräte	- 20 -
5.4 Methoden	- 21 -
5.4.1 PBMC-Isolation	- 21 -
5.4.2 Einfrieren von Zellen	- 21 -
5.4.3 Auftauen von Zellen.....	- 22 -
5.4.4 Bestimmung der Zellzahl	- 22 -

5.4.5 Stimulation mit PMA, IM, BFA	22 -
5.4.6 Unbehandelte PBMCs	23 -
5.4.8 Färbung Oberflächenmarker	24 -
5.4.9 Fixierung der Zellen	24 -
5.4.10 Intrazelluläres Färben der Zytokine	24 -
5.4.11 Durchflusszytometrische Analyse der Zellen	25 -
5.4.12 FlowJo	26 -
5.5 Lebend-Tot-Färbung	31 -
5.6 Mikrobiom-Auswertung	31 -
5.7 Statistische Analyse	32 -
6. Ergebnisse.....	33 -
6.1 Die Bestimmung des Einflusses der OMNi-BiOTiC® 10-Therapie auf die Zusammensetzung und Funktionalität von Zellen des peripheren Blutes	33 -
6.1.1 Kein Einfluss der OMNi-BiOTiC® 10-Therapie auf die Zusammensetzung von Zellpopulationen des peripheren Blutes	33 -
6.1.2 OMNi-BiOTiC® 10-Therapie zeigt keine Veränderungen auf die Expression der Zytokine IL-17A und IL-17F	39 -
6.1.3 OMNi-BiOTiC® 10-Therapie führt zu Veränderungen auf die Expression der Zytokine IL-10, IL-13 und IFN- γ	42 -
6.2 Die Konsequenzen der OMNi-BiOTiC® 10 Behandlung auf die Zusammensetzung des Mikrobioms der Patienten	46 -
6.2.1 Hohe Ähnlichkeit in der Nicht-metrischen multidimensionalen Skalierung (NMDS).....	46 -
6.2.2 Keine Unterschiede in der Analyse der Stämme von OMNi-BiOTiC® im Vorher-Nachher-Vergleich der Probiotika-Einnahme	47 -
6.3 Die Auswirkung der Probiotika-Therapie auf die Stuhlkonsistenz und Stuhlfrequenz der Studienteilnehmenden	49 -
7. Diskussion	52 -
7.1 Zytokine	52 -
7.2 Mikrobiom	56 -

7.3 Stuhltagebuch.....	- 58 -
7.4 Limitationen.....	- 59 -
7.4.1 Auswahl Patienten.....	- 59 -
7.4.2 Methoden.....	- 59 -
7.5 Ausblick	- 60 -
8. Literatur- und Quellenverzeichnis	- 62 -
9. Anhang	- 67 -
9.1 Ehrenwörtliche Erklärung.....	- 67 -
9.2 Tabellenverzeichnis	- 68 -
9.3 Abbildungsverzeichnis.....	- 68 -
9.4 Tabelle Zytokine	- 71 -
9.5 Ernährungstagebuch.....	- 82 -
9.6 Beipackzettel OMNi-BiOTiC® 10	- 85 -
9.7 Danksagung	- 86 -

1. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
AAD	Antibiotika-assoziierten Diarrhö
AMP	antimikrobielle Peptide
BAFF	B-Zell aktivierender Faktor
BFA	Briefeldin A
Bzw.	beziehungsweise
CCL20	Chemokine (C-C motif) Ligand 20
CD3	<i>Cluster of differentiation 3</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i>
CD11b	<i>Cluster of differentiation 11b</i>
CD14	<i>Cluster of differentiation 14</i>
CD20	<i>Cluster of differentiation 20</i>
CD40	<i>Cluster of differentiation 40</i>
CD161	<i>Cluster of differentiation 161</i>
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CTL	C-Type Lectin Rezeptor
CTLA-8	zytotoxisches T-Lymphozyten assoziiertes Protein 8
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1
CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 2
CXCL5	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 5
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> , dt.: phosphatgepufferte Kochsalzlösung
EDTA	Ethylenediaminetetraacetate
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i> , dt.: Durchflusszytometrie
FCS/ FBS	<i>fetal calf serum</i> , dt.: Fetales Rinderserum
FSC	<i>Forward Scatter</i> , dt.: Vorwärtsstreuung
g	Zentrifuge Einheit
GALT	darmassoziiertes lymphatisches Gewebe

GCSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor
GPS	L-Glutamin, Penicillin, Streptomycin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HKI	Hans-Knöll Institut für Infektionsimmunologie in Jena
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig
IFN-γ	Interferon Gamma
IgE	Immunglobulin E
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IL-1β	Interleukin 1 β
IL-2	Interleukin 2
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
IL-9	Interleukin 9
IL-10	Interleukin 10
IL-13	Interleukin 13
IL-17	Interleukin 17
IL-17A	Interleukin 17A
IL-17F	Interleukin 17 F
IL-17RC	Interleukin-17 Rezeptor C
IL-21	Interleukin 21
IL-22	Interleukin 22
IL-23	Interleukin 23
IM	Ionomycin
KIM IV	Klinik für Innere Medizin IV
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i> , dt.: Magnet aktivierte Einzelzellseparation
MAP	<i>mitogen-activated protein</i> , dt.: Mitogen-aktivierendes Protein
MC	Morbus Crohn
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i> , dt.: durchschnittliche Fluoreszenzintensität
mL	Milliliter
mg	Milligramm

mM	mmol/l
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
NMDS	nicht-metrische multidimensionale Skalierung
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear cell</i> ; dt.: mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> ; dt.: Phosphat-gepufferte Salzlösung
PHA	Phytohemagglutinin
PMA	<i>Phorbol myristate acetate</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> , dt.: Mustererkennungsrezeptoren
μL	Mikroliter
rpm	<i>revolutions per minute</i> , dt.: Umdrehungen per Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, Puffermedium welches Glutathion, Biotin, Vitamin B 12, PABA, Inositol, Cholin enthält.
RORγt	RAR-bezogene Orphan-Rezeptor-Gamma
SSC	<i>Side Scatter</i> , dt.: seitliche Streuung
STAT3	Signalüberträger und Aktivator der Transkription 3
SMAD	MAD (engl. <i>mothers against decapentaplegic</i>) und dem Gen für das Protein Sma (engl. <i>small body size</i> ‚kleine Körpergröße‘)
TGF-β	<i>Transforming-Growth-Factor beta</i>
TH1	T-Helfer-Zellen Typ 1
TH2	T-Helfer-Zellen Typ 2
TH17	T-Helfer-Zellen Typ 17
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor Alpha
TNF-β	Tumor Nekrose Faktor Beta
Traf6	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor assoziierter Faktor 6
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel

Der Begriff „Patient“ gilt sowohl für die weibliche als auch die männlichen Teilnehmenden und wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit im nachfolgenden Text verwendet. Die verkürzte Variante für die weibliche Form Patientin und die männliche Form Patient wird einheitlich als „Patient oder Patienten“ beschrieben.

Studienteilnehmerin und Studienteilnehmer werden als „Studienteilnehmende“ und Probandin und Proband als „Probanden“ genannt. Dies geschieht ausschließlich zum einfacheren Lesen, impliziert keine Wertung des Geschlechts und gilt im Sinne der Gleichbehandlung.

2. Zusammenfassung

Hintergrund: Die Prävalenz von Patienten mit Morbus Crohn (MC) nimmt immer mehr zu. Diese chronische Entzündung kann zu Gewebeschäden mit Funktionsverlusten im gesamten Magen-Darm-Trakt führen. In der Pathogenese wird ein Ungleichgewicht pro- und antiinflammatorischer Zellen vermutet. Die gastrointestinale Mikrobiota hat einen starken Einfluss auf dieses immunologische Gleichgewicht. In einer experimentellen Studie wurde beschrieben, dass ein erhöhter Salzkonsum mit der Nahrungsaufnahme das intestinale Mikrobiom, insbesondere die Präsenz von Laktobazillen beeinträchtigt. Es wurde postuliert, dass es durch die salzinduzierte Abnahme der Laktobazillen zu einer verstärkten TH17-Reaktion kommt. Die experimentelle Studie zeigte, dass durch eine Substitution von *Lactobacillus murinus* die TH17-Zell-Aktivierung reduziert wird. Durch die Wechselwirkung zwischen dem gastrointestinalen Mikrobiom und Interleukin-17 (IL-17) wird auf ein neues Forschungskonzept bei Autoimmunerkrankungen hingewiesen (Wilck *et al.* 2017).

Ziel: In dieser Studie soll der Einfluss probiotischer Laktobazillen, die als Nahrungsergänzungsmittel eingenommen werden, auf die Häufigkeit zirkulierender IL-17 positiver Zellen bei Patienten mit MC in Remission untersucht werden. Hierzu wurde den Patienten vor und nach der 3-wöchigen Probiotikaeinnahme (täglich drei Beutel OMNi-BiOTiC® 10 mit 10 Bakterienstämmen mit mindestens 5 Milliarden Keimen pro Beutel) Blut entnommen und der Anteil IL-17-positiver Zellen an peripheren zirkulierenden mononukleären Zellen untersucht. Durch ein besseres Verständnis von pro- und antiinflammatorischen Zellen und deren Modulation durch die Mikrobiota kann das Potential einer Probiotika-vermittelten Entzündungshemmung optimiert und möglicherweise die Therapie der Erkrankung verbessert werden.

Methodik: MC-Patienten in Remission (n=10) nahmen über 3 Wochen täglich drei Beutel à 5 g OMNi-BiOTiC® 10 ein. Den Studienteilnehmenden wurden vor und nach der 3-wöchigen Probiotikaeinnahme jeweils zwei Blutröhrchen mit 9 mL Blut entnommen. Aus dem Blut wurden die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) isoliert und nach der Zellaktivierung erfolgte eine FACS-Analyse (*fluorescence-activated cell sorting*) zur Expression von Zytokinen. Dabei wurden TH17-Zellen durch den Oberflächenmarker CD161 identifiziert. Außerdem wurden drei Stuhlproben pro Patient analysiert, jeweils eine vor der Probiotikaeinnahme, eine nach der 3-wöchigen Einnahme und eine 3 Monaten nach Beendigung der Probiotikaeinnahme. Mit Hilfe von 16S-

Sequenzierung wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Pieper (Helmholtz-Institut für Infektionsforschung in Braunschweig) das intestinale Mikrobiom charakterisiert. Des Weiteren wurde von den Patienten ein Stuhltagebuch über 21 Tage geführt. Dort wurde täglich die Stuhlkonsistenz (flüssig, breiig, fest, anders) und die Stuhlfrequenz erfasst.

Ergebnisse: Bei Patienten mit MC in Remission zeigten sich entgegen der Arbeitshypothese in zirkulierenden PBMCs für die Zytokine IL-17A und IL-17F keine signifikanten Unterschiede vor und nach der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC® 10-Einnahme. Jedoch konnte in den Zellpopulationen der TH-Zellen ($CD3^+CD4^+CD161^-$), der anderen CD161-positive Zellen ($CD3^+CD4^+CD161^+$) und der B-Zellen ($CD20^+CD3^-CD14^-$) ein niedrigerer Anteil an IL-10 produzierenden Zellen nach der Probiotika-Einnahme detektiert werden. In der Gruppe der B-Zellen ($CD20^+CD3^-CD14^-$) zeigte sich eine Abnahme IL-13 produzierender Zellen im Vorher-Nachher-Vergleich bei der Probiotika-Einnahme. Bei der *Mean fluorescence intensity (MFI)* von IFN- γ in der Population andere CD161-positive Zellen ($CD3^+CD4^+CD161^+$) zeigte sich eine Zunahme der Werte nach der Einnahme von OMNi-BiOTiC® 10. Die Zusammensetzung des Darmmikrobioms zeigte keine signifikanten Veränderungen, die auf die Einnahme von OMNi-BiOTiC® 10 zurückgeführt werden konnte. Im parallel geführten Stuhltagebuch zeigten sich in den Mittelwerten eine Abnahme der Stuhlfrequenz. Jedoch wurden in der statistischen Auswertung keine signifikanten Unterschiede dargestellt.

Schlussfolgerung: Die zentrale Hypothese, dass durch die Einnahme von Probiotika mit hohem Anteil von Laktobazillen der Anteil zirkulierender IL-17-positiver Zellen bei Patienten mit MC in Remission reduziert werden kann, konnte nicht belegt werden. Aufgrund der geringen Patientenzahl können die Ergebnisse kleine Veränderungen nicht ausschließen. Überraschenderweise konnte auch kein deutlicher Einfluss von OMNi-BiOTiC® 10 auf die intestinalen Mikrobiota nachgewiesen werden. Möglicherweise war der Einnahmezeitraum zu kurz oder die zugeführte Zahl der Laktobazillen zu niedrig. Nur durch eine größere Studie mit deutlich höheren Patientenzahlen, einer Kontrollgruppe, Veränderungen in der Einnahme der Laktobazillen oder eine spezielle Ernährungsdiät und Einbeziehung von mukösen Immunzellen kann ein möglicher Zusammenhang zwischen dem intestinalen Mikrobiom, insbesondere zwischen den Laktobazillen und IL-17 produzierenden Zellen, erfasst werden.

3. Einleitung

3.1 Morbus Crohn

Der Morbus Crohn zählt zu den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED), die schubweise verläuft. Die jährliche Inzidenz (Neuerkrankungsrate) liegt in Deutschland bei 6,6 Erkrankungsfällen pro 100.000 Einwohner (Stand Jahr 2014) und die Prävalenz liegt bei 100-200 pro 100.000 Einwohner (Preiß *et al.* 2014). Der Häufigkeitsgipfel befindet sich bei dieser Erkrankung zwischen dem 15. und 35. Lebensjahr (Herold *et al.* 2018). Beim MC besteht eine diskontinuierliche, segmental auftretende transmurale Entzündung des gesamten Gastrointestinaltraktes von der Mundhöhle bis zum After. Am häufigsten betroffen ist das terminale Ileum und das Zökum. Die Ätiologie ist sehr vielfältig und wird von mehreren Faktoren beeinflusst. Beitragende Faktoren sind genetische Veränderungen, Umweltfaktoren bei vorhandenen Risikofaktoren, Infektion mit bestimmten Pathobionten und das intestinale Mikrobiom. Beim MC wird eine Störung des Gleichgewichtes der gastrointestinalen Mikrobiota mit Überwiegen proinflammatorischer Taxa vermutet. Diese Elemente tragen alle wesentlich zum Verständnis der Pathogenese bei (Sarmiento 2017; Baumgart und Sandborn 2012).

Die Erkrankung verläuft oft in Schüben und beginnt oft schleichend. Die Krankheitsaktivität kann sehr unterschiedlich sein. Bei den meisten Patienten folgt nach einem akuten Schub ein symptomfreies Intervall, eine sogenannte Remissionsphase. Dieser Wechsel zwischen Schub und Remission ist bei jedem Patienten von individueller Ausprägung, Dauer und Intensität. Der Krankheitsverlauf kann durch Komplikationen wie Stenosen, Fisteln und Abszesse beeinflusst werden. Typische Symptome sind Abdominalschmerzen, Durchfall, Allgemeinbeschwerden und Fieber. Die Beschwerden können sich auch extraintestinal manifestieren, weil MC eine Systemerkrankung ist (Braun *et al.* 2018; Fischer *et al.* 2018).

Unter physiologischen Bedingungen ist ein Gleichgewicht zwischen intestinale Immunsystem und der gastrointestinalen Mikrobiota entscheidend. Bei einer gestörten intestinalen Barrierefunktion oder Schwäche im angeborenen und/ oder erworbenen Immunsystem kann es zu Darmentzündungen kommen. Eine dauerhafte, überschießende Entzündung führt zur Gewebsschädigung mit Funktionsverlusten (Uhlir und Powrie 2009). Die Krankheitsentstehung einer chronischen Darmentzündung ist multifaktoriell. Sie resultiert beispielsweise aus einer dysregulierten Immunantwort oder Veränderungen der gastrointestinalen Mikrobiota und die genetische Veranlagung einer Person kann eine entscheidende Rolle spielen. (Haag und Siegmund 2015).

3.1.1 Therapie

Die Therapie von MC ist sehr komplex und vielfältig. Eine frühzeitige Diagnose und adäquate Behandlung sind entscheidend. Die Behandlung ist abhängig von verschiedenen Faktoren wie zum Beispiel Krankheitsverlauf, Alter des Patienten, Schweregrad der Entzündung oder vorangegangenen Therapien. Die derzeitige Behandlung umfasst umfangreiche Therapiekonzepte (siehe Übersichtsartikel von Sulz *et al.* 2020, Stallmach *et al.* 2023). Konservative Optionen sind der Rauchverzicht und diätetische Modifikationen und vor allem die medikamentöse Therapie. Wichtige Vertreter bei der medikamentösen Therapie sind Sulfasalazin, Kortikosteroide (Budesonid, Prednisolon), Immunsuppressiva wie Thiopurine (Azathioprin, 6-Mercaptopurin) oder Methotrexat und Biologika bzw. die sogenannten „*small molecules*“ (Fischer *et al.* 2018). Alternativ gibt es noch interventionelle Endoskopie z.B. bei narbigen Stenosen oder bei schwerwiegenden Komplikationen die chirurgische Intervention (Herold *et al.* 2018). Zu den chirurgischen Interventionen zählen unter anderem die Segmentresektionen oder Strikturoplastiken (Gionchetti *et al.* 2017).

Es gibt vielfältige Optionen für die Symptomlinderung und Verlaufskontrolle einer MC Erkrankung. Zentrales Ziel der Therapie ist ein Remissionserhalt. Das Problem bei der Biologika-Therapie ist, dass viele Patienten nicht auf die Behandlungen ansprechen bzw. ein Wirkungsverlust auftritt oder die verschiedenen Medikamente schwere Nebenwirkungen auslösen können. In den letzten Jahren wurden immer wieder neue Medikamente entwickelt. Zwei Beispiele sind Vedolizumab und Ustekinumab. Vedolizumab ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen das $\alpha 4\beta 7$ Integrin gerichtet ist. Er eignet sich für die Therapie mittelschwerer bis schwerer Verlaufsformen bei MC und blockiert Integrine, so dass proinflammatorische Zellen nicht aus dem Blut in den Darm einwandern (Sandborn *et al.* 2013). Ustekinumab ist ebenfalls ein monoklonaler Antikörper, welcher sich gegen die p40 Untereinheit von IL-12 und IL-23 richtet. Er zielt auf T-Helferzellen, die die Entzündung im Darm fördern. Auch dieses Medikament ist für mittelschwere bis schwere Verlaufsformen nach Versagen oder Unverträglichkeit der Standardtherapie bei MC zugelassen. Außerdem hat es sich bei der Induktion und Aufrechterhaltung einer Remission als wirksam erwiesen (MacDonald *et al.* 2016).

Das Wissen über MC wurde durch die Forschung in den letzten Jahren deutlich erweitert. Dabei steht aktuell die Ursachenforschung im Vordergrund, um eine rationale Verbesserung der Therapiekonzepte zu erreichen. Die angestrebte Therapie des MC ist

die Hemmung einer überschießenden Entzündung, um eine chronische Schädigung des Gewebes zu verhindern. Ein interessantes Target dafür ist die IL-23-IL-17-Achse, welche auch bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen im Darm eine Rolle spielt. Die Expression von IL-17 wurde in Seren und Zielgeweben von Patienten mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen nachgewiesen und spielt eine bedeutende Rolle für die Pathogenese folgender Erkrankungen: MC, Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose und Psoriasis (Betteli *et al.* 2007). In Studien wurde herausgefunden, dass es eine höhere Expression von IFN- γ und IL-17 in der intestinalen Mukosa bei MC gibt (O'Connor *et al.* 2009).

3.2 Die Darmbarriere

Die Darmbarriere schützt unter physiologischen Bedingungen vor einer bakteriellen Translokation, Infektionen und reguliert die bakterielle Homöostase des Darms. Dabei besteht ein physiologischer Austausch zwischen dem Mikrobiom und dem Epithel. Diese Darmbarriere wird im Wesentlichen von Defensinen, antimikrobiellen Peptiden (AMP) und mikrobiellen Erkennungsrezeptoren (*microbial recognition receptors*) gebildet. Es gibt α - und β -Defensine, wobei es beim MC v.a. zu einer verminderten Expression und Aktivierung von β -Defensinen kommt. Auf dieser Darmbarriere befindet sich eine Schleimschicht, der sogenannte Mukus. Dieser besteht aus polymerisierten Muzinen (Glykoproteinen) und es gibt eine innere und äußere Schicht (Klag und Wehkamp 2019; Haag und Siegmund 2015).

Die antimikrobiellen Peptide sind an der Homöostase der Darmbarriere beteiligt (Salzman *et al.* 2010). Während einer Homöostase wird eine effektive Mukusproduktion gefördert und die mikrobielle Translokation sowie die Produktion proinflammatorischer Zytokine und anderen inflammatorischen Effektorzellen gehemmt und es entsteht eine effektive Barrierefunktion. Dieser Prozess ist bei einer Entzündung gegenläufig. Dabei kommt es zu einer hohen Produktion von Zytokinen, verminderter Mukusproduktion und zu einer ineffektiven Darmbarriere. Eine entzündungsfördernde Folge dieser verminderten antimikrobiellen Abwehr führt zu CED, insbesondere MC. Die Epithelien von Patienten mit MC zeigen auf der Schleimhaut adhärente Bakterien, aktivierte T-Zellen und Antikörper, die nicht auf spezielle Krankheitserreger zielen, sondern auf das reguläre Darmmikrobiom (Ostaff *et al.* 2013). In Abbildung 1 ist der im Text beschriebene Zustand einer effektiven Barriere im Vergleich mit einem Barrieredefekt dargestellt.

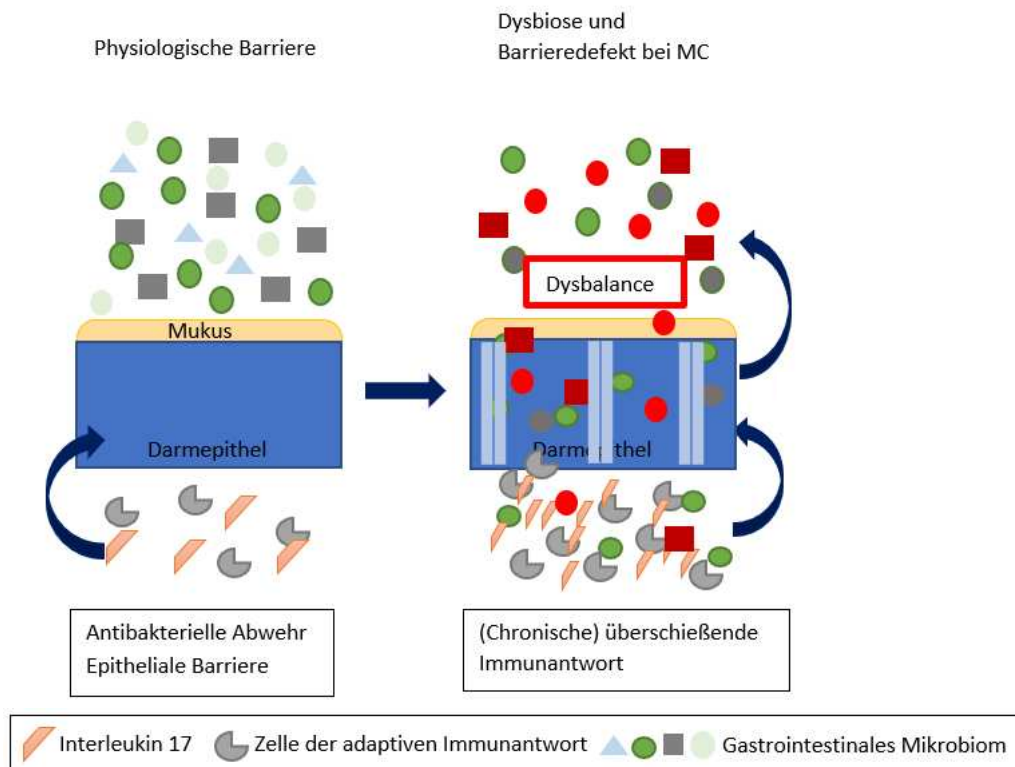


Abbildung 1: Die Darmbarriere im physiologischen und pathologischen Zustand, modifiziert aus Klag, Wehkamp 2019; Ostaff et al. 2013

Auf der linken Seite der Grafik ist die schematische Darstellung der physiologischen Darmbarriere sichtbar. Dort ist ein Gleichgewicht mit einer antibakteriellen Abwehr und einer epithelialen Abwehr vorhanden. Kommt es zu einer chronisch überschießenden Immunantwort entsteht eine Dysbalance und somit ein pathologischer Zustand mit Barrieredefekt, wie zum Beispiel beim MC (rechter Teil der Grafik).

3.3 Gastrointestinale Mikrobiota

Ein weiterer wichtiger Trigger in der Pathogenese des MC ist die gastrointestinale Mikrobiota. Der menschliche Körper ist von einer Vielzahl von Mikroorganismen besiedelt, dazu zählen Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten. Dies wird als gastrointestinales Mikrobiota benannt und ist die genetische Gesamtheit der verschiedenen Mikroorganismen, die den Körper besiedeln. Das Mikrobiom dagegen steht für die Gesamtheit aller Gene dieser Mikroorganismen (Friedrich 2020). Es wird geschätzt, dass das bakterielle Mikrobiota aus fast 1000 verschiedenen Spezies besteht. Das entspricht ungefähr 10^{12} Zellen (Becker *et al.* 2015). Im gesunden Darm wird die Darmflora von Vertretern der Phyla *Bacteroidetes* und *Firmicutes* dominiert, gefolgt von *Actinobacteria* und *Proteobacteria* (MetaHIT Consortium *et al.* 2010). Im Gegensatz dazu sind bei CED *Actinobacteria* und *Proteobacteria* deutlich erhöht und *Firmicutes* und *Bacteroidetes* vermindert (Morgan *et al.* 2012).

Das Mikrobiom wirkt bei der Verdauungsfunktion im Gastrointestinaltrakt mit, hilft bei der Abwehr gegen pathogene Mikroorganismen und trägt zur Entwicklung und Erhaltung des Immunsystems und der Darmbarriere bei.

Dadurch werden lokale und systemische pro- und antiinflammatorische Immunabläufe beeinflusst. Das Immunsystem, sowohl das angeborene als auch das adaptive, wird auf verschiedene Weisen vom humanen Mikrobiom reguliert. Dadurch hat das gastrointestinale Mikrobiota einen großen Einfluss auf Autoimmunerkrankungen. Autoimmunität bedeutet, dass die Toleranz von körpereigenen Antigenstrukturen wegfällt und es zur Bildung von autoreaktiven Antikörpern kommt. Bei diesen Erkrankungen rückt das Mikrobiom immer mehr in den Vordergrund der Forschung und spielt eine entscheidende funktionelle Rolle bei der Aufklärung der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen (Schröder und Ibrahim 2017).

3.3.2 Probiotika

Probiotika sind von der FAO/WHO definiert als „lebende Mikroorganismen, die einen gesundheitlichen positiven Effekt aufweisen, wenn sie in ausreichender Anzahl zugeführt werden“ (FAO/WHO 2002). Der Begriff Probiotika wurde 1960 erstmals von dem griechischen Wort „für das Leben“ (engl.: *for life*) abgeleitet. Probiotika gibt es als Nahrungsergänzungsmittel oder Lebensmittel. Sie enthalten Bakterien und Hefen. Am häufigsten findet man bei den Bakterien die Arten *Lactobacillus* und *Bifidobacterium*, aber auch andere Vertreter wie zum Beispiel *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* Nissle und *Streptococcus thermophilus*. Bei der Hefe ist *Saccharomyces boulardii* der markante Vertreter. Dabei können die Mikroorganismen einzeln oder als Kombination verschiedener Arten auftreten. Probiotika sind in Form von Kapseln, Tabletten, Pulver und in verschiedenen fermentierten Lebensmitteln (z.B. Joghurt) erhältlich (Sanders *et al.* 2018).

Die wichtigste Funktion solcher Probiotika ist die Wiederherstellung des mikrobiellen Gleichgewichts und der physiologischen Darmflora im Magen-Darm-Trakt. Dafür benötigen Probiotika bestimmte Eigenschaften. Sie sollten beispielsweise säureresistent sein, damit sie die Magen-Darm-Passage überwinden können (Williams 2010). *Lactobacillus* und *Bifidobacterium* produzieren Milchsäure. Durch die Produktion von Essigsäure, Milchsäure und Propionsäure wird der intestinale pH herabgesetzt und folglich wird das Wachstum pathogener Bakterien supprimiert (Doron und Gorbach 2006). Des Weiteren stabilisieren Probiotika die Darmflora. Jedoch ist es wichtig, dass Probiotika keine pathogenen bzw. schädigenden Merkmale besitzen (Williams 2010).

Der Nutzen von Probiotika kann durch verschiedene Mechanismen ausgeübt werden. Sie unterbinden die Kolonisierung, Zelladhäsion und Invasion von pathogenen Organismen. Daneben besitzen sie eine direkte antimikrobielle Aktivität und sie modulieren die Immunantwort des Wirts. Der exakte Mechanismus über die Wirkung von Probiotika ist sehr komplex und noch nicht vollständig erforscht (Doron und Gorbach 2006).

Probiotika haben durch ihre Wirksamkeit im Magen-Darm-Trakt einen wichtigen Einfluss auf unser Immunsystem. Die Rotaviren-Gastroenteritis im Kindesalter ist weltweit verbreitet und vor allem mit Gewichtsverlust und einer erhöhten Mortalität assoziiert. Van Niel und seine Kollegen (2002) veröffentlichten eine Metaanalyse zur Beurteilung, ob die Behandlung mit *Lactobacillus* die klinischen Ergebnisse bei Kindern mit akutem infektiösem Durchfall verbessert. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Metaanalyse, dass eine Behandlung mit *Lactobacillus* bei Kindern mit infektiösen Durchfallerkrankungen wirksam ist. Es konnte eine signifikante Verringerung bei der Durchfalldauer nachgewiesen werden (van Niel *et al.* 2002).

Ein weiteres Beispiel für die Wirksamkeit von Probiotika wurde in zwei Metaanalysen gezeigt. Dabei wurde in beiden Metaanalysen untersucht, ob Probiotika als Prävention für die Antibiotika-assoziierten Effekte wirksam sind. In beiden Studien wurde belegt, dass das Risiko von Antibiotika-assoziierten Durchfällen (AAD) durch die Einnahme von Probiotika reduziert wurde (Cremonini *et al.* 2002; D'Souza *et al.* 2002).

Abschließend kann man sagen, dass viele Studien bereits zeigen konnten, dass Probiotika für die Behandlung und Prävention von einer Vielzahl von Infektionen viele potenzielle medizinische Vorteile aufweisen. In Zukunft bedarf es einer weiteren Aufklärung über die genauen Mechanismen. In der Studie von Santosa und Kollegen (2006) wird darauf hingewiesen, dass Probiotika eine Rolle bei der Erhaltung der Remission bei CEDs spielen könnten.

3.3.3 Laktobazillen

Laktobazillen sind gram-positive Milchsäurebakterien. In der Gattung *Lactobacillus* existieren ungefähr 200 verschiedene Arten. *Lactobacillus*-Arten kommen natürlicherweise in der menschlichen Mikrobiota und der vaginalen Mikroflora vor. Außerdem kann man Laktobazillen häufig in der Mundhöhle, im Magen und in der Haut nachweisen (Rossi *et al.* 2016). Laktobazillen bilden als Stoffwechselprodukt Milchsäure. Diese ist eine organische Säure, die einen Schutzfaktor im Darm bildet. Es entsteht ein angesäuertes Darmmilieu, in dem Krankheitserreger keine optimalen

Wachstumsbedingungen haben. Die Darmbarriere spielt im menschlichen Körper eine wichtige Rolle, wie in Kapitel „3.2 Die Darmbarriere“ bereits beschrieben. Sie stellt eine Kontaktfläche zwischen dem menschlichen Gewebe und den Pathogenen dar. Im physiologischen Zustand trägt die Darmbarriere mit zur Erhaltung der Gesundheit bei. Bei einem Defekt in der Darmbarriere können Pathogene ungehindert in den Blutkreislauf eindringen. Solche Störungen findet man häufig im Zusammenhang mit CED wie MC oder Colitis ulcerosa. Laktobazillen helfen dabei humane Barriereproteine zu produzieren. Somit haben sie einen Anteil an der Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung der Darmbarriere. Aufgrund ihrer positiven Eigenschaften findet man Laktobazillen oft in Nahrungsergänzungsmitteln. Sie wirken ansäuernd, antimikrobiell, säuretolerant und gallensäure-resistent. Dadurch überleben Laktobazillen die Magenpassage und sind im Darm in hoher Anzahl nachweisbar und können dort ihre Wirkung entfalten (Lang 2018).

In dieser Studie wurde OMNi-BiOTiC® 10 eingesetzt. Dieses Präparat ist ein Nahrungsergänzungsmittel mit zehn vermehrungsfähigen Bakterienkulturen (*Lactobacillus acidophilus* (W37 und W55), *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*), die natürlich im Darm vorkommen¹. Die Patienten nahmen täglich drei Beutel à 5 g für die Dauer von 21 Tagen ein (Pro Beutel sind mindestens 5 Milliarden Keime enthalten).

3.4 IL-17

Bei der Ausheilung von Krankheiten spielt unser Immunsystem eine entscheidende Rolle. Dabei bestehen zentrale Aufgaben in der Elimination pathogener Erreger. Gleichzeitig muss gegen körpereigene Antigene und apathogene Erreger, z.B. der körpereigenen Mikrobiota, eine Toleranz vermittelt werden.

Dabei sind Zytokine wichtige Elemente bei der Modulation der Immunantwort. In der Literatur sind mehr als 30 Zytokine beschrieben. Man kann diese in Interleukine, Interferone und Wachstumshormone unterteilen (Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 2004). Bei einer Immunantwort werden zunächst die Immunzellen stimuliert, welche anschließend entsprechende Zytokine produzieren. Danach binden diese an spezifische Rezeptoren und induzieren verschiedene Zellreaktionen. Diese sind unter anderem die Aktivierung, Proliferation und

¹ (Zusammensetzung OMNi-BiOTiC® 10 <https://www.omni-biotic.com/de/produkte/omni-biotic-10/>, aufgerufen am 01.02.2023)

Differenzierung der Zytokine, die Vermittlung oder Regulierung der Immunreaktion, die Hemmung des Wachstums von Zellen und die Induktion oder Hemmung auf die Produktion anderer Zytokine. Dabei unterteilt man die Zytokine in entzündungsfördernde und entzündungshemmende. Entscheidend für ein funktionierendes Immunsystem ist ein Gleichgewicht von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen (Trifunovic *et al.* 2014).

Für die Immunantwort sind u.a. CD4⁺-Effektor-T-Zellen entscheidend. Diese teilt man in zwei Untergruppen ein, die T-Helfer Typ 1 (TH1) und T-Helfer Typ 2 (TH2), daneben gibt es eine weitere Untergruppe. IL-17 wurde erstmalig 1995/96 unter dem Namen CTLA-8 als Genprodukt ohne klare Funktion beschrieben (Miossec 2007). Erst 2006 wurde die sogenannte TH17-Untergruppe, die IL-17 produziert, in der Literatur beschrieben (Miossec 2009). IL-17 ist ein zentrales proinflammatorisches Zytokin, welches im Verständnis der Pathogenese von immunologischen Erkrankungen immer mehr an Bedeutung gewinnt.

IL-17 hat unterschiedliche Funktionen. Die Hauptfunktion von IL-17 besteht in der Stimulation der Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- α (Tumor Nekrose Faktor Alpha), Chemokine (CXCL1, CXCL2, CCL20) und Matrix-Metalloproteasen, die für die Gewebeeinfiltration und Gewebeerstörung wichtig sind. Diese Zytokine rekrutieren weitere Monozyten und Neutrophile. Eine andere Aufgabe von IL-17 ist die Beteiligung an der Granulopoese (Betteli *et al.* 2007; Isaiavec *et al.* 2015). IL-17 beeinflusst die Granulopoese, indem es die Produktion und Sekretion von GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), sowie die Expression von GM-CSF-Rezeptoren erhöht. Des Weiteren ist IL-17 an der Proliferation, Reifung und Chemotaxis von Neutrophilen beteiligt (Betteli *et al.* 2007; Isaiavec *et al.* 2015).

Die Expression von IL-17 wurde im Blut und Zielgeweben von Patienten mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen nachgewiesen und spielt eine bedeutende Rolle für die Pathogenese verschiedener Erkrankungen wie MC, Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose und Psoriasis (Betteli *et al.* 2007).

3.4.1 IL-17 Signalweg

Es existieren sechs IL-17 Mitglieder² und fünf Rezeptoren³. Das bekannteste dieser Reihe ist aktuell IL-17A, aber das Interesse an den anderen Familienmitgliedern nimmt in der Forschung immer mehr zu. Hierzu muss ergänzt werden, dass IL-17A und IL-17F die stärkste Homologie in dieser Familie haben. Für die Vermittlung des Signalweges bindet

² IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) und IL-17F

³ IL-17RA, IL-17RB/IL-25R, IL-17RC, IL17RD/SEF und IL-17RE

IL-17A an die Untereinheiten von den Rezeptoren IL-17RA und IL-17RC. Beide Rezeptoren koordinieren ein Signal, das als SEFIR (SEF/IL17R) bekannt ist. Dieses Signal beauftragt Act1 eine Adaptor/Ubiquitin Ligase als eigenes SEFIR-Signal. Act1 ist ein Adapterprotein und rekrutiert das Gerüstprotein Traf6. Dies ist wichtig für die Aktivierung des Transkriptionsfaktor *nuclear factor* (NF)- κ B. Zusätzlich aktiviert Act1 das *CCAAT/Enhancer-Binding-Protein* C/EBP- β , C/EBP- δ und die *Mitogen-aktivierte Protein* (MAP) Kinasen. C/EBP sind Transkriptionsfaktoren. Diese wirken alle zusammen und kontrollieren die transkriptionelle Aktivierung von IL-17A-Zielgenen. Es existiert ein zweiter funktioneller Mechanismus bei dem IL-17 stabilisierend auf die durch TNF- α induzierte CXCL-1, CXCL2, I- κ B ζ und CXCL 5 mRNA wirkt. Dieser Mechanismus basiert auf Act1 und MAP-Kinasen, hierbei ist Traf6 nicht mit involviert (Monin und Gaffen 2018). Ein bemerkenswertes Merkmal von IL-17A ist seine starke kooperative Wirkung mit anderen Zytokinen bei der Regulierung nachgeschalteter Gen- bzw. Proteinexpressionen. IL-17A hat sich als synergistisch mit IL-1 β , IL-22, IFN- γ , TNF- α , Oncostatin M, CD40, BAFF und Vitamin D3 und vielen weiteren Zytokinen erwiesen (Onishi und Gaffen 2009).

3.4.2 Differenzierungsschritte von TH17-Zellen

Die Differenzierung von TH17-Zellen wird von vielen verschiedenen Faktoren kontrolliert. Es werden insgesamt drei Schritte unterschieden. Der erste Schritt ist die Einleitung der Differenzierung von naiven T-Zellen zu TH17-Zellen. IL-6 und TGF- β sind zwei Zytokine mit gegensätzlichem Effekt, aber zusammen induzieren sie die Entwicklung von TH17-Zellen. TGF- β ist ein antiinflammatorisches Zytokin. Das Fehlen bzw. ein Mangel dieses Zytokins geht mit tödlich verlaufenden lymphoproliferativen Krankheiten einher. Im Gegensatz zu TGF- β ist IL-6 ein proinflammatorisches Zytokin und induziert in Zellen des angeborenen Immunsystems spezifische Mustererkennungsrezeptoren, sogenannte *Pattern Recognition Receptor* (PRR) wie *Toll-like Receptor* (TLR) und *C-Type Lectin Receptor* (CTL). Außerdem ist zu erwähnen, dass es für diese Initiation von IL-17 einen alternativen Weg gibt, der durch TGF- β und IL-21 ausgelöst werden kann. IL-21 gehört zu der IL-2 Familie und kann in Anwesenheit von IL-6 die Entwicklung von TH17-Zellen bewirken. Der zweite Schritt ist die Amplifikation von TH17-Zellen. Dies wird über einen positiven Feedbackmechanismus über IL-21 gesteuert. Dieser Mechanismus bedeutet, dass IL-21 von TH17-Zellen produziert wird. Ist genügend IL-21 vorhanden, wird die Amplifikation von IL-17 gehemmt. Im Anschluss folgt der letzte Schritt für die Differenzierung von IL-17. Dieser

Vorgang ist die sogenannte Stabilisierung von TH17-Zellen. IL-23 reguliert in diesem Schritt die Produktion von Zytokinen. Bei allen Differenzierungsschritten spielt STAT3 eine entscheidende Rolle als Signalmolekül (Bettelli *et al.* 2008, Bettelli *et al.* 2007). Die beschriebenen Differenzierungsschritte sind in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt (Abbildung 2)

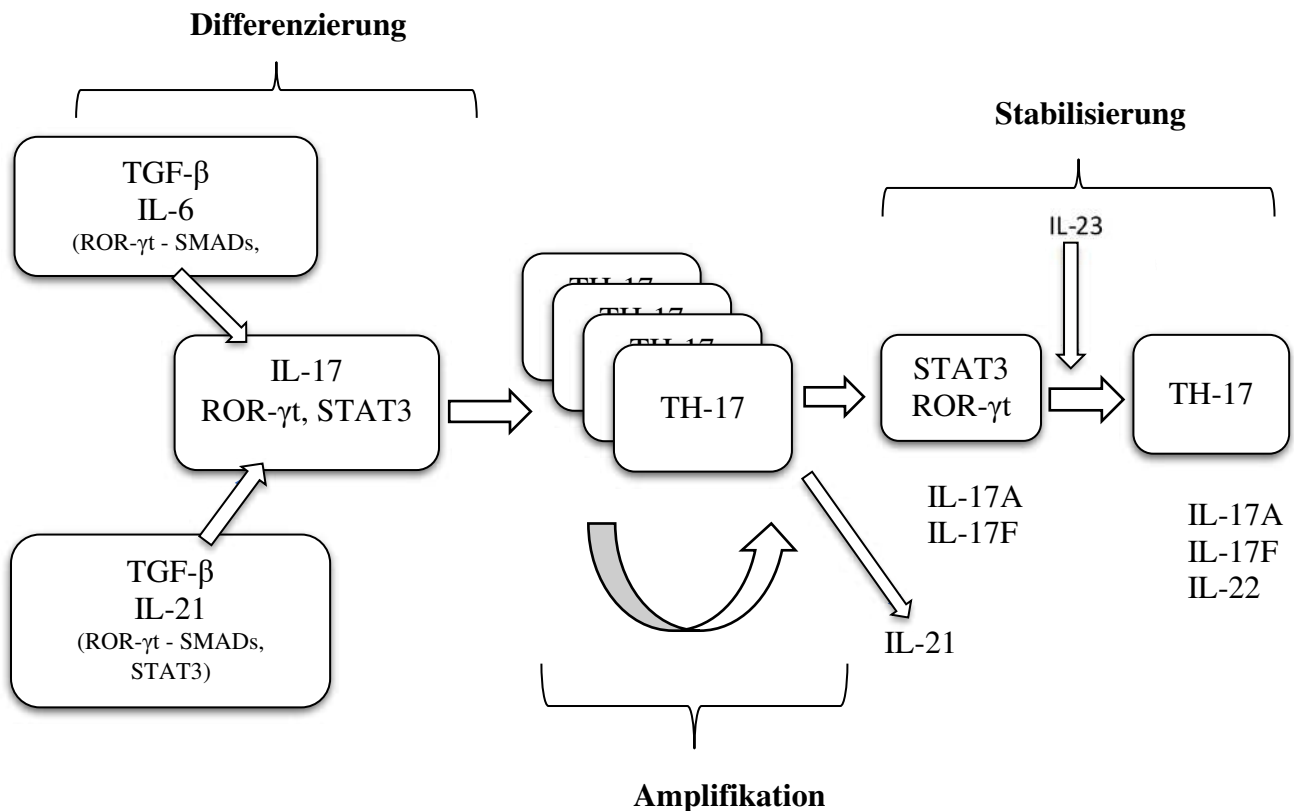


Abbildung 2: Differenzierungsschritte TH17-Zellen, modifiziert aus Bettelli *et al.* 2008

Diese Abbildung zeigt die verschiedenen Differenzierungsschritte von TH17-Zellen. Im linken Teil der Grafik ist die Differenzierung von naiven T-Zellen zu TH17-Zellen dargestellt. Anschließend folgt die Amplifikation von TH17-Zellen gesteuert durch IL-21. Im rechten Teil der Abbildung erfolgt die Stabilisierung von TH17-Zellen was durch IL-23 reguliert wird.

3.4.3 CD161 als Oberflächenmarker

In der Studie von Cosmi *et al.* wurde dargestellt, dass CD161 als hochgradig hochreguliertes Gen in humanen TH17-Zellen enthalten ist. CD161 stammt von einer NKT-CD4⁺-T-Vorläuferzelle. Die Ergebnisse dieser Studie legen CD161 als neuartigen Oberflächenmarker für menschliche TH17-Zellen dar (Cosmi *et al.* 2008).

4. Ziele der Arbeit

In einem Tierexperiment zeigte sich, dass ein erhöhter Salzkonsum mit der Nahrungsaufnahme einen negativen Einfluss auf den Bluthochdruck hat. Durch die erhöhte Salzaufnahme wird das intestinale Mikrobiom, insbesondere die Präsenz von Laktobazillen beeinträchtigt. Es wurde postuliert, dass es durch die salzinduzierte Abnahme der Laktobazillen zu einer verstärkten TH17-Expression mit proinflammatorischen Reaktionen kommt und folglich ein Bluthochdruck entstehen kann. Die experimentelle Studie an Mäusen zeigte, dass durch eine Substitution von *Lactobacillus murinus* eine TH17-Zell Aktivierung reduziert werden kann. Das Zusammenspiel des gastrointestinalen Mikrobioms und IL-17 begründet einen neuen Forschungsansatz bei Autoimmunerkrankungen (Wilck *et al.* 2017). Daher soll in dieser Studie überprüft werden, ob durch die Einnahme von Probiotika (Laktobazillen) über drei Wochen als Nahrungsergänzungsmittel der Anteil zirkulierender IL-17-positiver Zellen bei Patienten mit MC in Remission reduziert werden kann (siehe Abbildung 3).

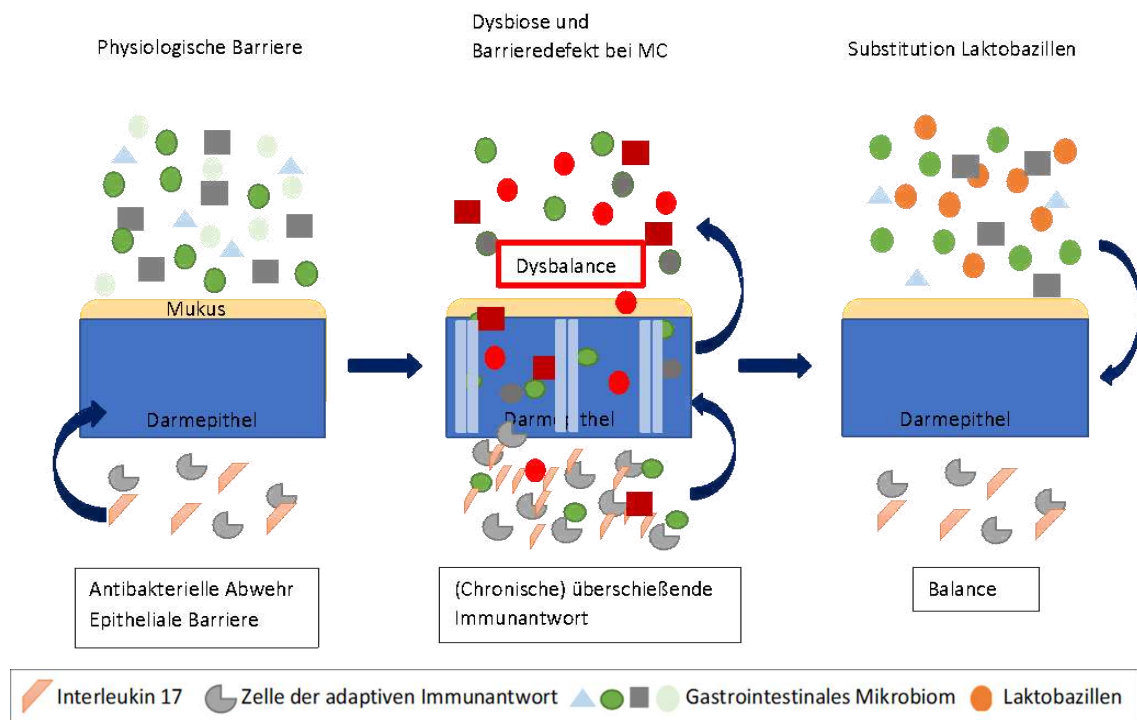


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Darmmukosa im physiologischen und pathologischen Zustand bei MC und mögliche Effekte von Laktobazillen, modifiziert aus Klag und Wehkamp 2019.

Die Abbildung 3 ist eine Fortführung der Abbildung 1. Es wurde im rechten Teil der Abbildung schematisch die Hypothese ergänzt, dass durch die Substitution von Laktobazillen wieder eine Balance in der Darmmukosa bewirkt werden soll.

Zur Überprüfung der Hypothese wurden in dieser Studie folgende Schritte durchgeführt:

1. Zehn Patienten mit MC in Remission nahmen probiotische Laktobazillen (OMNi-BiOTiC® 10) als Nahrungsergänzungsmittel ein. OMNi-BiOTiC® 10 wurde dreimal am Tag à 5 g für 21 Tage eingenommen.
2. Die Patienten führten über diese Zeit ein Tagebuch, welches ihr Befinden und die Zahl der Stuhlentleerungen erfasste.
3. Für die Untersuchung der OMNi-BiOTiC® 10-Effekte auf die im Blut zirkulierenden IL-17 positiven Zellen wurde den Patienten jeweils vor und nach der 3-wöchigen Probiotika-Einnahme Blut entnommen.
4. Parallel dazu wurden Stuhlproben auf das gastrointestinale Mikrobiom untersucht. Damit soll die Hypothese, dass die Einnahme von Laktobazillen das gastrointestinale Mikrobiom bei Patienten mit MC in Remission verändert, überprüft werden.

Die Versuchsplanung und -durchführung wurde in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Zielinski im Hans-Knöll Institut in Jena durchgeführt. Die Mikrobiomanalysen erfolgten in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Pieper im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig.

Durch ein besseres Verständnis pro- und antiinflammatorischer Zellen und deren Regulation durch die Mikrobiota könnte deren Potential der aktiven Entzündungshemmung und -abräumung optimiert und die supportive Therapie bei MC verbessert werden.

5. Material und Methoden

5.1 Auswahl der Patienten

Für diese Studie wurden zehn Patienten rekrutiert, die an einem MC erkrankt waren und sich zum Zeitpunkt der Studie in klinischer Remission befunden hatten. Es wurden sechs Patienten und vier Patientinnen unter Berücksichtigung der unten genannten Kriterien in die Studie eingeschlossen.

Patient	Alter in Jahren	Geschlecht	Erkrankungsdauer MC in Jahren	Raucher
TH17 006	41	Männlich	7	Keine Angabe
TH17 007	70	Weiblich	14	Nein
TH17 008	59	Weiblich	17	Nein
TH17 009	50	Weiblich	18	Nein
TH17 010	77	Männlich	3	Nein
TH17 011	46	Männlich	3	Ja
TH17 012	47	Männlich	8	Nein
TH17 013	53	Weiblich	26	Nein
TH17 014	59	Männlich	10	Nein
TH17 015	58	Männlich	30	Ja

Tabelle 1: Soziodemographische Patientendaten

Für die Studienteilnehmenden galten folgende Ein- und Ausschlusskriterien: Die Patienten mussten ein Mindestalter von 18 Jahren erreicht haben und einen gesicherten MC in Remission haben. Ausschlusskriterien für diese Studie waren die Einnahme von Biologika, Steroiden und Azathioprin. Für die Patientenrekrutierung wurde die Datenbank der KIM IV des Universitätsklinikum Jena unter den oben genannten Ein- und Ausschlusskriterien durchsucht. Danach wurde ein Anschreiben mit Kontaktformular erstellt und an die möglichen Studienteilnehmenden versandt. Bei grundsätzlichem Einverständnis zur Teilnahme an der Studie wurde ein individueller Beratungstermin vereinbart.

Am ersten Termin wurden die Patientinnen und Patienten über den Ablauf der Studie durch einen Arzt verbal und schriftlich aufgeklärt. Eine Zustimmung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller- Universität Jena lag vor (Nr.:2019-1428-Material; Nr.: 4817-06/16). Die Studienteilnehmenden wurden im Vorfeld über Risiken der Blutentnahme aufgeklärt. Beim ersten Termin brachten die

Patienten eine Stuhlprobe mit, die nicht älter als vom Vortag war. Es wurde 18 mL humanes Vollblut mittels Butterfly-Nadeln abgenommen. Die Blutabnahme und die Abgabe einer Stuhlprobe erfolgte weitere Male direkt nach der 3-wöchigen und drei Monaten nach Abschluss der Probiotika-Einnahme.

5.2 Ernährungs- und Stuhltagebuch

Die Patienten erhielten vor Beginn der Probiotika-Einnahme ein vorgefertigtes Ernährungs- und Stuhltagebuch. Die Teilnehmenden sollten für die 3-wöchige Einnahme von OMNi-BiOTiC® 10 ihre Ernährung schriftlich erfassen. Dafür gab es für jeden Tag vier Zeilen für Frühstück, Mittag, Abendbrot und Zwischenmahlzeiten. In diesen Zeilen war Platz zum selbstständigen Eintragen der zu sich genommenen Nahrung. Außerdem gab es für jeden Tag eine extra Spalte zum Stuhlverhalten. In der ersten Zeile gab es vier Auswahlmöglichkeiten zum Ankreuzen für die Stuhlkonsistenz. Diese waren flüssig, breiig, fest und anders. In der nächsten Zeile sollten die Studienteilnehmenden die tägliche Stuhlfrequenz eintragen. Dieses Tagebuch diente der Erfassung der Ernährungsgewohnheiten, Stuhlkonsistenz und Stuhlfrequenz für 21 Tage. Das Tagebuch befindet sich als Vorlage im Anhang.

5.3 Untersuchungsmaterialien

5.3.1 Chemikalien

Chemikalien	Herstellerangaben
2-Mercaptoethanol	Gibco, Lot 2270395
Brefeldin A	Sigma B7651, stock 10 mg/ml in DMSO
Cytofix/Cytoperm™ Plus	BD Biosciences Pharm. 554722
DMSO, Sterile Filtered	ChemCruz
DPBS	gibco, Sigma Lot No. RNBj7480
FBS Standard	PAN Biotech
Ionomycin	Sigma I.0634, stock 1 mg/ml in DMSO, InvivoGen
LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kits invitrogen	ThermoFisher Scientific
Lympholyte®-H	VHbio, (#CL5020 Human)
MACS-Buffer	Sigma DPBS + 1% FCS + 2mM EDTA
Non-Essential Amino Acids	Gibco, Lot 2259240
PBS (Phosphat gepufferte Salinelösung)	Sigma

PermWash	bd Pharm: 554723, dilute 1:10 with a dest
PMA	Sigma P8139, stock 10^{-2} M in DMSO. Use at 2×10^{-7}
RNAlater™ Soln. invitrogen	ThermoFisher Scientific
RPMI 1640 Medium with HEPES	Sigma, Lot RNB7086
RPMI Medium 1640	Gibco, Lot 2242224
Sodium Pyruvate	Gibco, Ref 11360-070
Trypanblau	Gibco™ Trypan Blue Solution, 0.4%, Lot 2283795
Zombie UV Dye	BioLegend, Part: 77474, Lot: B324336
Zombie UV™ Fixable Viability Kit	BioLegends, Lot : B324336

Tabelle 2: Übersicht Chemikalien

5.3.2 Oberflächenmarker und Zytokine

Antigen	fluorophore	Firma	Cat	Lot	Isotype
CD3	BUV615	BD Biosciences	751252	1141106	Mouse BALB/c IgG1, κ
CD4	YG584	Cytekbio	SKU R7-20041		Mouse IgG1, κ
CD11b	PerCP Cy5.5	BioLegend	301328	B328101	Mouse IgG1, κ
CD14	SPARK Blue	BioLegend	367148	B314182	Mouse IgG1, κ
CD20	Alexa Flour 594	BioLegend	302354	B287489	Mouse IgG2b, κ
CD161	Alexa Flour 700	BioLegend	339942	B305171	Mouse IgG1, κ
GM-CSF	PE-CF594	BD Biosciences	562857	1137903	Rat LEW, also known as Lewis IgG2a
IFN- γ	SPARK-NIR685	BioLegend	502552	B314650	Mouse IgG1, κ
IL-4	BV711	BD Biosciences	564112	307148	Rat IgG1
IL-9	Alexa Flour 647	BioLegend	507608	B307800	Mouse IgG2b, κ
IL-10	BB700	BD Biosciences	566568	1125428	Rat IgG2a, κ
IL-13	APC	BioLegend	501907	B335944	Rat IgG1, κ
IL-17A	Pacific Blue	BioLegend	512312	B316020	Mouse IgG1, κ
IL-17F	Alexa flour 488	BioLegend	516604	B277948	Goat Polyclonal Ig
IL-21	PE	BioLegend	513004	B299502	Mouse IgG1, κ
IL-22	PE/Cy7	BioLegend	366708	B280788	Mouse IgG2a, κ
TNF α	BV510	BioLegend	502950	B303609	Mouse IgG1, κ

Tabelle 3: Antigene der Oberflächenmarker und Zytokine

Die Versuchsplanung und -durchführung wurde in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe für Infektionsimmunologie von Frau Prof. Dr. Zielinski im Hans-Knöll Institut (HKI) in Jena durchgeführt. Mit Unterstützung durch Mitglieder der Arbeitsgruppe wurde das *FACS-Panel* auf 17 verschiedene Antikörper etabliert und die entsprechende Kompensation wurde durchgeführt. Die FACS-Analyse wurde immer unter Supervision eines erfahrenen Mitarbeiters der Arbeitsgruppe umgesetzt. Vor der Verwendung der Antigene der Oberflächenmarker und Zytokine (siehe Tabelle 3) wurden die fluoreszierenden Eigenschaften in einem Programm verglichen, damit bei der Auswertung im FACS-Gerät keine Überschneidungen vorliegen und eine genaue Analyse gewährleistet wird. Dabei wurde bei der Auswahl auf die unterschiedlichen Wellenlängen geachtet. Auf der Internetseite von Cytekbio wurde einmal der Vollspektrum-Viewer (Abbildung 4) und der Ähnlichkeits-Index (Abbildung 5 und Abbildung 6) genutzt.

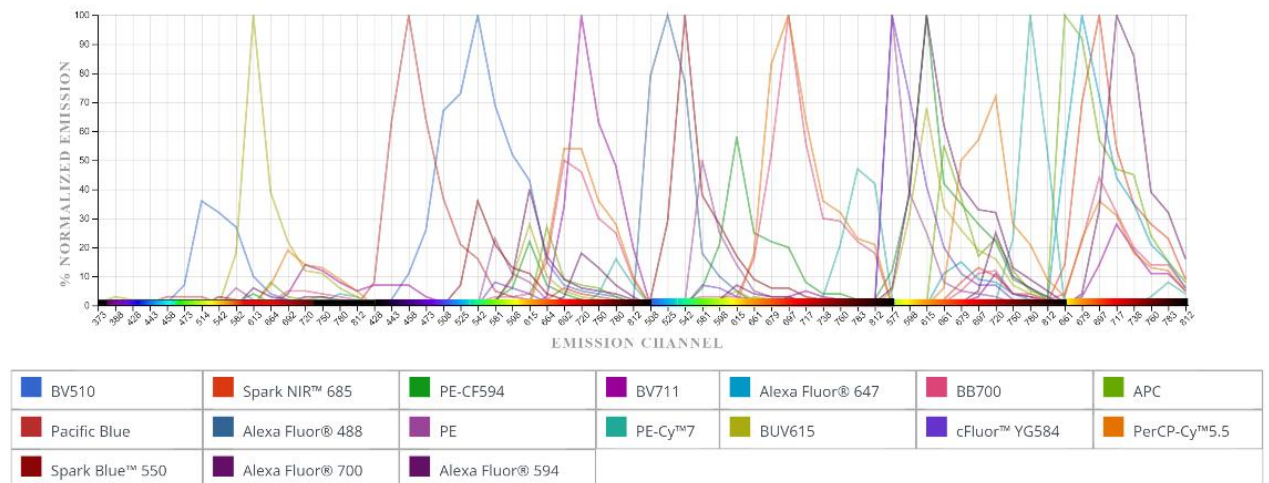


Abbildung 4: Cytek Vollspektrum-Viewer, <https://spectrum.cytexbio.com/> aufgerufen am 03.08.2021, 13:56 Uhr

Configuration:5L 16UV-16V-14B-10YG-8R

Abbildung 5: Ähnlichkeits-Index (Similarity Indices), <https://spectrum.cytekbio.com/> aufgerufen am 03.08.2021, 13:57 Uhr

[illegible]

Abbildung 6: Versteckter Ähnlichkeits-Index (Hide Similarity) Index, <https://spectrum.cytekbio.com/> aufgerufen am 03.08.2021, 13:58 Uhr

5.3.3 Puffer und Lösungen

Einfriermedium

Für das Einfriermedium wurden 25 mL FCS und 2,5 mL DMSO (100 %) verwendet. Das ergab 27,5 mL Einfriermedium. Die verwendeten Substanzen wurden steril filtriert.

MACS-Buffer

Für den MACS-Buffer wurden zu den 500 mL PBS 1 % FCS (5 mL) und 2 mM EDTA (EDTA-Lösung mit 0,5M und pH von 8) hinzupipettiert.

RPMI-Medium

In das RPMI-Medium wurden 1 % GPS und 10 % FCS hinzugefügt.

Wasch-Puffer *PermWash BD bioscience*

Es wurden 45 mL destilliertes Wasser mit 5 ml PermWash vermischt. Es wurde mit einer 1:10 Verdünnung nach Herstellerangaben gearbeitet.

Wasch-Puffer

Für die Herstellung von Wasch-Puffer wurden 500 mL RPMI mit 25 mM HEPES und 1 % FCS (5 mL) zusammen pipettiert.

Complete medium

In das 500 mL RPMI 1640 mit Natriumbikarbonat ohne HEPES wurden hinzugefügt:

- 1 % L-Glutamin 5 mL (Gefrierschrank, -20 °C)
- 1 % Natrium-Pyruvat 5 mL (Kühlschrank, 4°C)
- 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren 5 mL (Kühlschrank, 4°C)
- 1 % Penicillin/Streptomycin 5 mL (Gefrierschrank, -20 °C)
- B-Mercaptoethanol 500 µL (Kühlschrank, 4°C)
- 10 % FCS 50 mL (Gefrierschrank, -20°C)

Alle aliquotierten Lösungen wurden aufgetaut und zu dem RPMI-Medium mit den oben aufgeführten Konzentrationen dazugegeben.

Brefeldin A

Die Herstellung erfolgte nach Herstellerangaben. Dazu wurden 1,8 mL DMSO zu einem Vial hinzupipettiert und gemischt. Danach wurde es aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Das ergab eine Menge von 5,6 mg/mL Vorratslösung.

Brefeldin A (BFA) ist ein kleines hydrophobes, makrozyklisches Lakton. Es blockiert reversibel die intrazelluläre Vesikelbildung und den Proteinaustausch zwischen Endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat, sodass die intrazellulär gebildeten Zytokine die Zelle nicht mehr verlassen können (Chardin und McCormick 1999).

Ionomycin/ PMA

Zur Herstellung von Ionomycin wurde nach Herstellerangaben 100 µL DMSO zu 1 mg Ionomycin hinzugegeben. Für die weitere Verdünnung wurde Endotoxin-freies Wasser genutzt. Das entspricht 10 mg/mL Vorratslösung.

Für die Herstellung von 5 mg/mL PMA (*Phorbol myristate acetate*) wurde 1 mL DMSO hinzugefügt. Die Lösung wurde bis zur kompletten Auflösung durchmischt. Für die weitere Verdünnung wurde Endotoxin-freies Wasser genutzt. Die Herstellung erfolgte nach Herstellerangaben.

Ionomycin ist ein Membran-durchlässiges Calcium-Ionophor und wird von dem Bakterium *Streptomyces conglobatus* produziert. Das Ionophor erleichtert den Transport von Calcium Ionen (Ca^{2+}) in und aus der Zelle. Ionomycin wird in Verbindung mit PMA genutzt, um T-Zellen zu aktivieren (Liu und Hermann 1978). Dabei führt PMA zu einer speziellen Aktivierung der Proteinkinase C und aktiviert daher NF-κB. Dies ist ein Transkriptionsfaktor, welcher eine Vielzahl an physiologischen Prozessen reguliert und bei verschiedenen Pathomechanismen beteiligt ist (Damascena *et al.* 2022).

5.3.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchs-Materialien	Herstellerangaben
96 Well-Platte	Thermo Scientific™ Nunc™ MicroWell™ 96-Well, Nunclon Delta-Treated, Flat-Bottom Microplate
Beutel	Spezialvernichtungsbeutel CPP, nerbe plus, REF 09-302-0020
FACS- Röhrchen	Corning Falcon 5 mL Polystyrene Round-Bottom Tube with Cell-Strainer Cap Product Number 352235
	Corning Falcon 5 mL Polystyrene Round Bottom Tube Product Number 352052
	Röhren Tubes, Sarstedt, 5 ml, (LxØ): 75 x 12 mm, PS Bestellnummer: 55.476
Filterspitzen	ClearLine®, Filter Tips, 10 µl, REF 130340CL, LOT# D23414
	ClearLine®, Filter Tips, 200 µl, REF 017370CL, LOT# B23261
	ClearLine®, Filter Tips, 1000 µl, REF 134000CL, LOT# D23364
Handschuhe	Vasco Nitril white, S, REF 9208410, PZN 08815173
Kryo-Röhrchen	Thermo Scientific Nalogene System 100™

Mehrkanalpipette	Eppendorf Research® plus, 20 – 200 µL, gelb, 8-Kanalpipette
Pasteur-Pipette	VWR, steril, Material: PE, Volumen: 7 ml, einzeln verpackt, graduert bis 3 ml, Katalognummer 612-1747P
Pipetten	PIPETMAN L P2L, 0.2- 2 µL, Metal Ejector, Gilson, SKU: FA10001M
	PIPETMAN L P10L, 1-10 µL, Metal Ejector, Gilson, SKU: FA10002M
	PIPETMAN L P20L, 2-20 µL, Metal Ejector, Gilson, SKU: FA10003M
	PIPETMAN L P200L, 20-200 µL, Metal Ejector, Gilson, SKU: FA10005M
	Eppendorf Research® plus, 0,5 – 10 µL, mittelgrau, Katalog-Nr. 3123000020
	Eppendorf Research® plus, 2 – 20 µL, gelb, Katalog-Nr. 3123000039
	Eppendorf Research® plus, 20 – 200 µL, gelb, Katalog-Nr. 3123000055
	Eppendorf Research® plus, 100 – 1,000 µL, blau, Katalog-Nr. 3123000063
	Transferpipette Brand, 1.000 -10.000 µl blau, Artikelnummer 705884
Pipettierhilfe	PIPETGIRL, Integra-Biosciences, Artikelnummer 155 021
Serologische Pipette, steril	Cellstar, greiner bio-one, 5 ml, LOT F2011387
	Cellstar, greiner bio-one, 10 ml, LOT F201136S
	Cellstar, greiner bio-one, 25 ml, LOT F201033X
SoftStrips Tubes	PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0,2 ml, Biozym Scientific GmbH, farblos, Art.-Nr.: 710970
Zentrifugen-Röhrchen	Centrifuge tube PP with screw cap PE, 15 ml, LOT 15CG002B, REF 02-502-3001
	Centrifuge tube PP with screw cap PE, 50 ml, LOT 15CG001B, REF 02-572-3001

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

5.3.5 Geräte

Geräte	Hersteller
Bench S2010 1.2 (2005)	Holte Lamin Air (Thermo), Seriennummer 305060588
Cytek Aurora	Cytek
Cytoflex	Beckman Coulter, Seriennr. AW35214
Galaxy® 170 R/S CO2 Incubators	New Brunswick
Heracell™ VIOS 250i CO2 Inkubator mit Edelstahlkammer	Thermo Scientific™
Inverses Mikroskop Leica DMI1	Leica
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss inverses Mikroskop Axiovert 25 mit Phasenkontrast
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter, Nalgene®	Thermo Scientific™, Katalognummer: 5100-0001

Neubauer Zählkammer	Marienfeld Superior, Neubauer-improved, Art.Nr. 0640011, Kammertiefe 0,1 mm
Vortex RS-VA 10	Phoenix Instrument
Wasserbad	GFL, Water bath, Bestellnr. 1002, 7 Liter
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
Zentrifuge Rotanta 460 R	Hettich

Tabelle 5: Geräte

5.4 Methoden

5.4.1 PBMC-Isolation

Es wurden zwei Blutentnahmeröhrchen mit je 9 mL Füllmenge abgenommen. Die 9 mL Blut wurden in ein Zentrifugenröhrchen (15 mL) mit 4 mL *Lympholyte®-H* pipettiert. Dies erfolgte zweimal in zwei verschiedene Zentrifugenröhrchen. Für die Erstellung eines Gradienten wurden beide Röhrchen bei 800 g für 20 Minuten zentrifugiert. Nach 30 Minuten wurden mit einer Pasteurpipette vorsichtig die PBMCs entnommen und in ein neues Zentrifugenröhrchen (50 mL) überführt. Nach dem Vereinen der Zellen aus beiden Zentrifugenröhrchen wurden 25 mL PBS (*Phosphate buffered saline*, dt.: Phosphatgepufferte Salzlösung) hinzugefügt. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation mit 800 g für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen, damit die Zellen in dem entstandenen Pellet weiterverwendet werden konnten. Das Pellet wurde in 1 mL PBS gelöst. Es wurden 2 µL der Zellsuspension mit 18 µL Trypanblau (*Gibco™ Trypan Blue Solution*) verdünnt für die Bestimmung der Zellzahl unter dem Mikroskop. Nach der Anfärbung wurden 10 µL der Zelllösung in eine Neubauer-Zählkammer übertragen und anschließend unter dem Mikroskop gezählt. Tote Zellen erscheinen blau, da lebende Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen. Die Zählkammer besteht aus viermal 16 Quadranten. Die vitalen Zellen der vier Blöcke wurden gezählt und aus den daraus erhaltenen vier Zellzahlen der jeweiligen Blöcke wurde der Mittelwert gebildet. Die Zellzahl kann mit folgender Formel (ohne Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors) berechnet werden:

$$\text{Mittelwert der vier Blöcke} = (\text{Zellzahl} \times 10 \text{ Verdünnung} \times 10.000) \times 1 \text{ mL}$$

5.4.2 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden erneut für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 1 mL Einfriermedium gelöst. Anschließend wurden weitere 3 mL Einfriermedium hinzugefügt und die Zellen wurden auf vier Kryo-Röhrchen verteilt. In jedes Röhrchen wurde 1 mL Einfriermedium mit den Zellen hinzugefügt. Die mit der

Zellsuspension gefüllten Röhrchen wurden zuerst in ein *Mr. Frosty*TM Gefrierbehälter (Nalgene®) überführt und anschließend wurden die Röhrchen in den Tiefkühlschrank, bei - 80°C, schonend über Nacht eingefroren. Nach zwei bis drei Tagen wurden die Röhrchen weiter in flüssigem Stickstoff bei -196 °C überführt und dort gelagert.

5.4.3 Auftauen von Zellen

Die eingefrorenen PBMCs wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und auf Eis transportiert. Es wurden pro Patient jeweils zwei Röhrchen mit jeweils 1 mL Lösung eingefrorener Zellen aufgetaut. Das ergab ein Gesamtvolumen von 2 mL pro Patient. Die eingefrorene Zellsuspension wurde für fünf Minuten bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Dann wurden die Zellen, die noch nicht komplett aufgetaut waren, in ein frisches 15 mL Röhrchen mit einer 1 mL Pipette pipettiert. Zu den 2 mL Zellen (zwei Vials pro Patient) wurden erst 5 mL Wasch-Puffer (RPMI mit 1 % FCS) tröpfchenweise hinzugefügt, während das Röhrchen vorsichtig hin und her geschwenkt wurde. Anschließend wurde das Röhrchen mit weiteren 5 mL Wasch-Puffer ergänzt, sodass ein Gesamtvolumen von 12 mL entstand. Daraufhin wurde das Falcon Röhrchen für 5 Minuten zentrifugiert (4 °C und 1500 *rpm* - Rotanta 460 R Hettich). Dieser Ablauf wurde für die weiteren Patientenproben identisch wiederholt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet wurde in Wasch-Puffer gelöst. Danach erfolgt eine abschließende Zentrifugation (5 Minuten, 4°C, 1500 *rpm* - Rotanta 460 R Hettich).

5.4.4 Bestimmung der Zellzahl

Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 10 mL *Complete medium* gelöst. Danach wurden die Zellen gezählt, um zu errechnen wie viel Volumen an Zellen pro Well-Platte benötigt wurde. Es sollten 500.000 Zellen pro Well-Platte hinzugefügt werden. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach den gleichen Arbeitsschritten wie im oben beschriebenen Absatz „5.4.1 PBMC-Isolation mit der Neubauer-Zählkammer“. Nach dem Berechnen des benötigten Volumens, wurde die Lösung mit den Zellen weiterverwendet.

5.4.5 Stimulation mit PMA, IM, BFA

Das errechnete Volumen für 500.000 Zellen pro Well wurde in eine U-förmige 96 Well-Platte hinzugegeben. Die Well-Platte wurde bei 367 *g* für 2 Minuten bei 18 °C zentrifugiert. Danach wurden die Zellen zweimal im Wasch-Puffer (RPMI und 1 % FCS) gewaschen. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Währenddessen wurde der

PMA/Ionomycin Mix vorbereitet. Es wurde ein finales Volumen von 200 μL pro Well kalkuliert. Dazu wurde ein totales Volumen von 5 mL berechnet. PMA wurde in einer finalen Konzentration von 1:50.000 und Ionomycin von 1:1.000 verwendet. Für die finale Konzentration wurde eine Vorverdünnung von PMA von 1:10 hergestellt, das heißt, es wurden 9 μL *Complete medium* und 1 μL PMA zusammen pipettiert. Im nächsten Schritt wurden von der Vorverdünnung 1 μL in 5 mL *complete medium* pipettiert. Es entsteht eine finale Konzentration von 1:50.000. Danach wurden in die 5 mL von 1:50.000 PMA-Verdünnung 5 μL Ionomycin pipettiert. Es entstand eine finale Konzentration von 1:1.000 Ionomycin. Von dem PMA/Ionomycin Mix wurden 200 μL auf das Zellpellet pipettiert. Die stimulierten Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

Nach einer Stunde in der Inkubation wurde Brefeldin A (BFA) vorbereitet. Dazu wurde BFA in *complete medium* 1:100 verdünnt. Anschließend wurden 20 μL pro Well hinzu pipettiert. Die Well-Platte wurde für weitere drei Stunden in den Inkubator gestellt. Insgesamt sollten die Zellen vier Stunden stimuliert werden.

5.4.6 Unbehandelte PBMCs

Während der Stimulation der PBMCs mit PMA/Ionomycin und BFA wurden die aufgetauten unbehandelten PBMCs auf Eis kaltgestellt. Kurz vor Ende der Inkubationszeit der behandelten PBMCs wurden die unbehandelten PBMCs vorbereitet. Das am Beginn des Versuchs errechnete Volumen für 500.000 Zellen pro Well wurde in ein Röhrchen hinein pipettiert, dies entspricht dem gleichen Volumen wie bei den behandelten PBMCs. Die Röhrchen mit den unbehandelten Zellen wurden für 2 Minuten bei 18 °C und bei 367 g zentrifugiert und anschließend mit RPMI und 1 % FCS gewaschen. Dieser Waschvorgang mit RPMI und 1 % FCS wurde einmal wiederholt. Nach Ablauf der 4 Stunden Inkubationszeit wurden die unbehandelten PBMCs in 150 μL PBS gelöst und in die bereits verwendete U-förmige 96 Well-Platte hinzupipettiert.

Die Well-Platte wurde bei 367 g für 2 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurden die Zellen einmal mit 150 μL PBS gewaschen. Für die behandelten und unbehandelten PBMCs wurden die gleichen Schritte durchgeführt.

5.4.7 Lebend-Tot-Färbung

Für die Lebend-Tot-Färbung wurden 20 μL Zombie-UV Verdünnung zu dem Zellpellet auf der Well-Platte hinzu pipettiert. Für die Verdünnung wurde ein Zombie-UV-Mix hergestellt (1:400, 1 μL Zombie UV: 400 μL PBS). Anschließend wurde die Well-Platte für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Hiernach wurden 150 μL MACS-Buffer

hinzu pipettiert, um den Prozess zu stoppen. Die Well-Platte wurde zentrifugiert, mit 150 μ L MACS-Buffer gewaschen und erneut zentrifugiert.

5.4.8 Färbung Oberflächenmarker

Der nächste Schritt beinhaltete die Färbung der Oberflächenmarker mittels Antikörperlösung. Alle verwendeten Oberflächenmarker sind in Tabelle 6 mit der jeweiligen Verdünnung aufgelistet. Die Verdünnung wurde mittels MACS-Buffer hergestellt. Es wurden jeweils 20 μ L vom Oberflächenmarker-Mix auf die unbehandelten und behandelten PBMCs pipettiert. Nachfolgend wurde die Well-Platte für 30 Minuten dunkel in den Kühlschrank bei 4 °C gestellt. Anschließend wurden 150 μ L MACS-Buffer hinzu pipettiert. Die Well-Platte wurde zentrifugiert, erneut mit 150 μ L MACS-Buffer gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Antigen	Verdünnung	200 μ L	250 μ L	300 μ L	400 μ L	Fluorophore
CD3	1_200	1 μ L	1,25 μ L	1,5 μ L	2 μ L	BUV615
CD4	1_200	1 μ L	1,25 μ L	1,5 μ L	2 μ L	YG584
CD11b	1_200	1 μ L	1,25 μ L	1,5 μ L	2 μ L	PerCP Cy5.5
CD14	1_200	1 μ L	1,25 μ L	1,5 μ L	2 μ L	SPARK Blue
CD20	1_200	1 μ L	1,25 μ L	1,5 μ L	2 μ L	Alexa Flour 594
CD161	1_25	8 μ L	10 μ L	12 μ L	16 μ L	Alexa Flour 700

Tabelle 6: Oberflächenmarker mit der jeweiligen Verdünnung

5.4.9 Fixierung der Zellen

Die Zellen wurden in 100 μ L *Cytofix/Cytoperm* resuspendiert und für 20 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit jeweils 150 μ L *BD Perm/Wash™ Puffer* gewaschen, zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. *BD Perm/Wash™ Puffer* wurde in einer 1:10 in destilliertem Wasser Verdünnung verwendet. Nach der Fixierung mittels *Cytofix/Cytoperm* konnten die PBMCs bei 367 g zentrifugiert werden.

5.4.10 Intrazelluläres Färben der Zytokine

Der letzte Schritt vor der FACS-Auswertung beinhaltete die intrazelluläre Färbung mittels zytokinspezifischer Antikörper. Alle verwendeten Antikörper sind in Tabelle 7 mit der jeweiligen Verdünnung aufgelistet. Die Verdünnung wurde mit *BD Perm/Wash™ Puffer* hergestellt. Es wurden jeweils 20 μ L vom Antikörper-Mix auf die unbehandelten

und behandelten PBMCs pipettiert. Dabei wurde jedes Well resuspendiert. Nachfolgend wurde die Well-Platte für 30 Minuten dunkel in den Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 150 µL *BD Perm/Wash™ Puffer* hinzu pipettiert, um den Prozess zu stoppen. Die Well-Platte wurde zentrifugiert, mit 150 µL MACS-Buffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Zur Vorbereitung für die FACS-Auswertung wurde die Zellsuspension aus der Well-Platte in die passenden FACS-Röhrchen überführt. Davor wurden jeweils 200 µL MACS-Buffer in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Im letzten Schritt wurde die Zellsuspension in 200 µL MACS-Buffer aus der Well-Platte aufgenommen und in das passende FACS-Röhrchen überführt. Hiernach konnten die Zellen im FACS gemessen werden.

Antigen	Verdünnung	200 µL	250 µL	300 µL	400 µL	Fluorophore
GM-CSF	1_200	1 µL	1,25 µL	1,5 µL	2 µL	PE-CF594
IFN-γ	1_200	1 µL	1,25 µL	1,5 µL	2 µL	SPARK-NIR685
IL-4	1_200	1 µL	1,25 µL	1,5 µL	2 µL	BV711
IL-9	1_200	1 µL	1,25 µL	1,5 µL	2 µL	Alexa Flour 647
IL-10	1_200	1 µL	1,25 µL	1,5 µL	2 µL	BB700
IL-13	1_200	1 µL	1,25 µL	1,5 µL	2 µL	APC
IL-17A	1_100	2 µL	2,5 µL	3 µL	4 µL	Pacific Blue
IL-17F	1_200	1 µL	1,25 µL	1,5 µL	2 µL	Alexa flour 488
IL-21	1_50	4 µL	5 µL	6 µL	8 µL	PE
IL-22	1_200	1 µL	1,25 µL	1,5 µL	2 µL	PE/Cy7
TNF-α	01_25	8 µL	10 µL	12 µL	16 µL	BV510

Tabelle 7: Antigene mit der jeweiligen Verdünnung

5.4.11 Durchflusszytometrische Analyse der Zellen

Für die durchflusszytometrischen Analyse der Zellen wurde der *Cytek Aurora* als FACS-Gerät benutzt. Mit einem FACS-Gerät können einzelne Zellen bzw. Partikel analysiert werden. Dabei werden die Zellen in einen Kanal geleitet und mit Laserlicht unterschiedlicher Wellenlängen bestrahlt. Es gibt einen *Forward Scatter* (FSC) und einen *Side Scatter* (SSC). Beim *Forward Scatter* wird Licht durch eine Zelle im Strömungskanal gebrochen und das Licht setzt sich im gleichen Lichtweg fort. Die Menge des vorwärts gestreuten Lichts korreliert mit der Größe der Zelle. Beim *Side Scatter* wird die Lichtquelle von den Zellen in eine seitliche Richtung gebrochen, die

außerhalb des ursprünglichen Lichtfades liegt. Dabei kann man die Granularität der Zelle anhand des Lichtfades beurteilen.

Für die Markierung der Antigene wurden im vorherigen oben beschriebenen Schritt die Antikörper gegen die Oberflächenmarker und die Zytokine verwendet, die ein Fluorophor gebunden haben. Dabei wurden unterschiedliche Fluorochrome mit unterschiedlicher Wellenlänge für eine gezielte Analyse der Zellen verwendet. Der Laser aktiviert die Fluorochrome.

5.4.12 FlowJo

Nachdem im vorherigen Abschnitt die Analyse der Zellen beschrieben wurde, werden im Folgenden die weiteren Schritte für die Auswertung der Daten beschrieben. Dabei wurde zur Auswertung der FACS-Daten das Programm FlowJo Version 10.8.0 genutzt.

Die Vorgehensweise und alle Graphen werden anhand der Patienten-Probe TH17008 A dargestellt. Im ersten Schritt wurden die PBMCs markiert (Abbildung 7 links), wobei in der X-Achse der FSC-A und in der Y-Achse SSC-A eingesetzt wurde. Aus den PBMCs wurden die *Single Cells* abgegrenzt siehe rechte Abbildung 7.

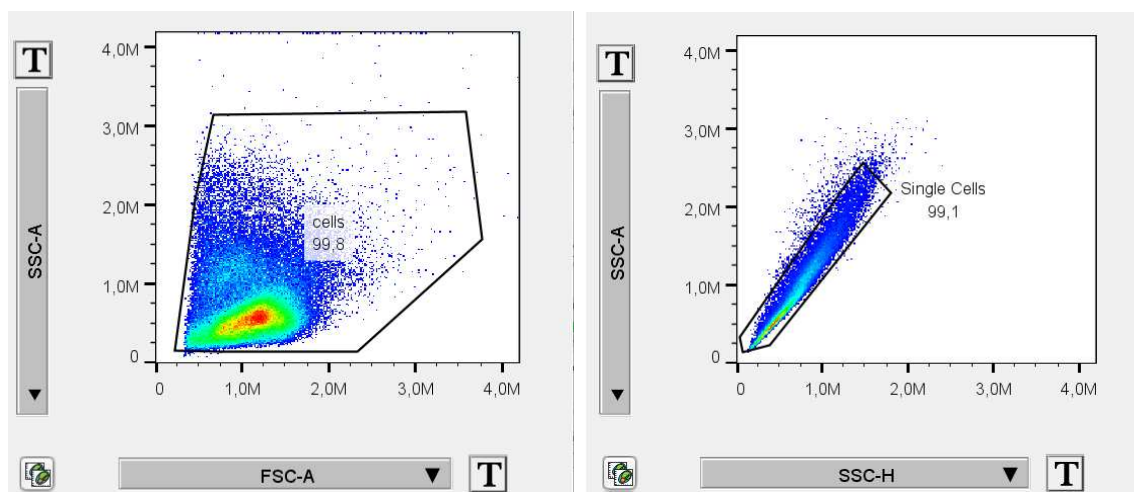


Abbildung 7: Gating der PBMCs (linke Abbildung) und der Single Zellen (rechte Abbildung) mittels FlowJo

In der linken Abbildung wurde mithilfe des SSC (Y-Achse) und FSC (X-Achse) die PBMCs gated. Anschließend wurde in der rechten Abbildung die *Single cells* dargestellt.

Bevor die einzelnen Populationen erstellt werden konnten, mussten zunächst alle toten von den lebenden Zellen abgegrenzt werden. Dafür wurden die Zellen wie oben beschrieben mit dem Zombie UV Farbstoff angefärbt. In Abbildung 8 links sind die lebenden und toten Populationen graphisch dargestellt. Im nächsten Schritt wurde aus den markierten lebenden Zellen die CD3 positiven und negativen Populationen

hervorgehoben. Dabei wurde auf der Y-Achse SSC-A und auf der X-Achse CD3 eingesetzt (Abbildung 8 rechts).

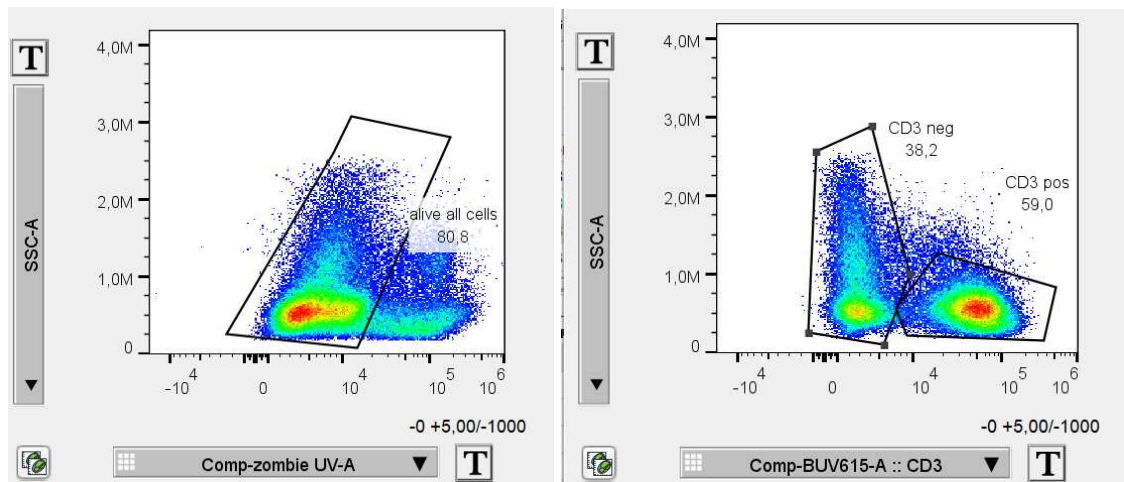


Abbildung 8: Lebend-Tot-Färbung mit Zombie UV Farbstoff (linke Abbildung); CD3 positiv und CD3 negativ (rechte Abbildung) mittels FlowJo

Die linke Grafik zeigt die Lebend-Tot-Färbung mit den lebenden/vitalen Zellen. Aus dieser Population konnte mithilfe des Oberflächenmarkers CD3 zwischen den CD3⁺ und CD3⁻ Zellen unterschieden werden.

Anschließend wurde die Population CD3 negativ genutzt und im Graphen mit CD14 auf der Y-Achse und CD20 auf der X-Achse dargestellt. Somit konnten die Populationen Monozyten und B-Zellen abgebildet werden (Abbildung 9 links). Nachfolgend konnte jeweils für die Monozyten (Abbildung 9 rechts) und B-Zellen (Abbildung 10 links) alle Zytokine im Graphen aufgezeigt werden. Aus dem vorherigen Graphen wurden nun die CD3 positive Population genutzt und mithilfe des Oberflächenmarkers CD4, die CD4 positive und negative Population dargestellt (siehe Abbildung 10 rechts).

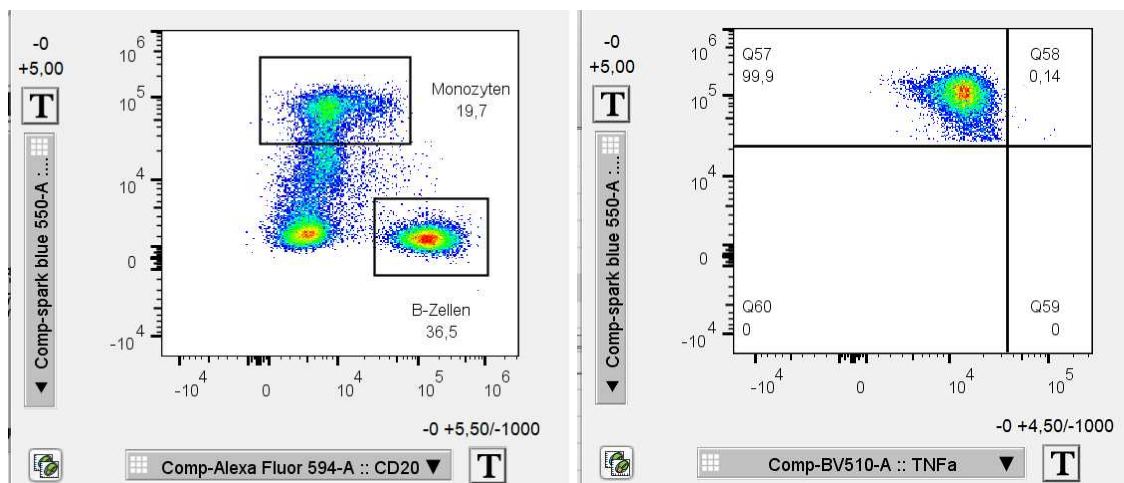


Abbildung 9: Gating der Monozyten und der B-Zellen (links); unbehandelte Monozyten mit Zytokin TNF- α (rechts) mittels FlowJo

Auf der linken Seite wurde in der Abbildung die Monozyten und B-Zellen (Y-Achse CD14 und X-Achse CD20) dargestellt. In der rechten Abbildung wurden die unbehandelten Monozyten präsentiert. Auf der X-Achse wurde das Zytokin TNF- α ausgewählt. Der Anteil an TNF- α ist im oberen rechten Quadranten sichtbar.

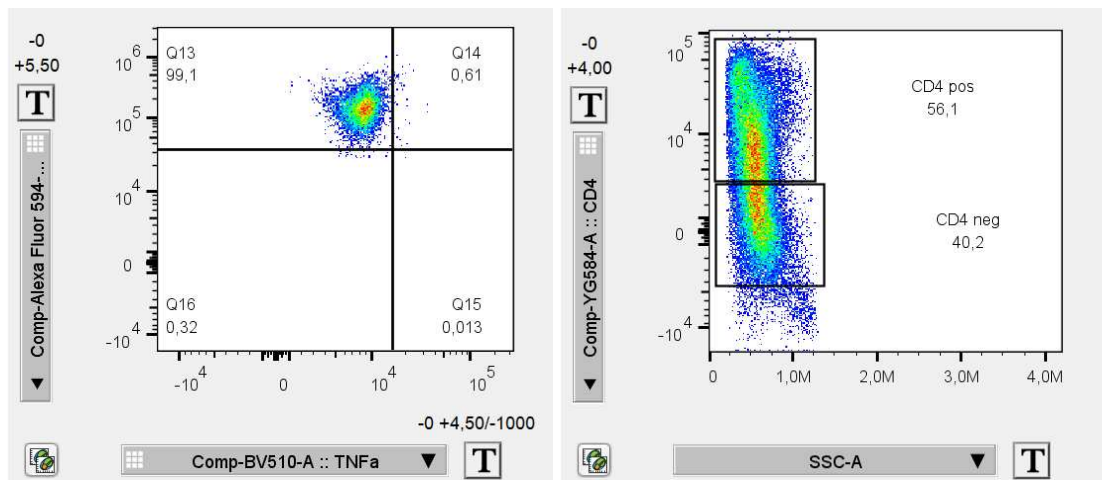


Abbildung 10: Unbehandelte B-Zellen mit Zytokin TNF- α (links); CD4 positive und CD4 negative Populationen (rechts) mittels FlowJo

In der linken Abbildung wurden die unbehandelten B-Zellen mit dem Zytokin TNF- α dargestellt. Der Anteil an TNF- α ist im oberen rechten Quadranten dargestellt. Die rechte Abbildung zeigte die CD4⁺ und CD4⁻ Populationen, die durch den Oberflächenmarker CD4 auf der Y-Achse präsentiert wurde.

Hiernach wurde aus der CD4 positiven Population der Oberflächenmarker CD161 auf der X-Achse eingefügt. Dies wird in Abbildung 12 links dargestellt. Dadurch konnten wieder für die jeweilige Population (CD3⁺CD4⁺CD161⁺) alle Zytokine dargestellt werden (Abbildung 12 rechts). Die gleichen Schritte wurden für die CD4 negative Gruppe genutzt und mit den Zytokinen abgebildet als CD3⁺CD4⁻CD161⁺ (Abbildung 11 rechts).

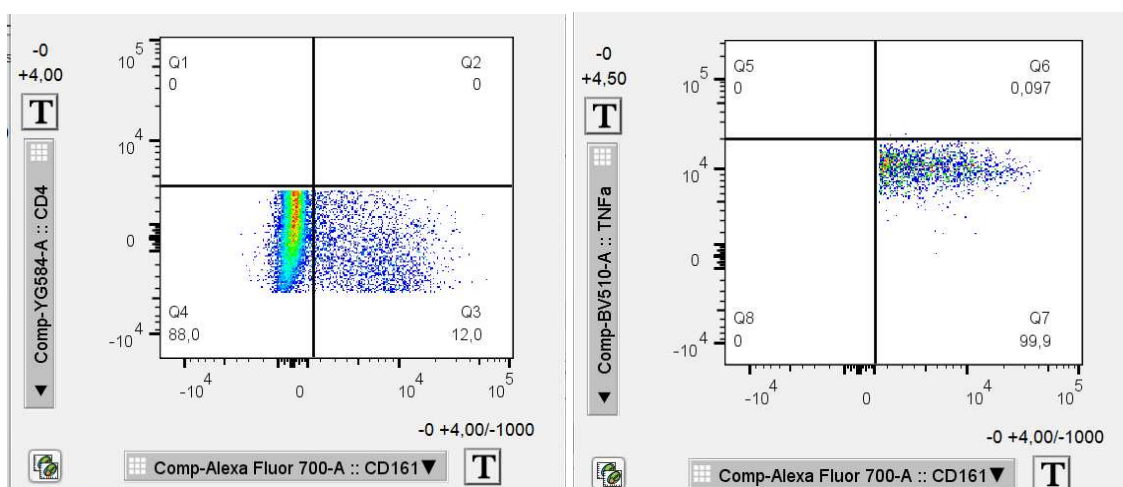


Abbildung 11: CD3⁺CD4⁻ (links); unbehandelt CD3⁺CD4⁺CD161⁺ mit dem Zytokin TNF- α (rechts) mittels FlowJo

Die Abbildung 11 zeigt auf der linken Seite die CD4⁺ Population. Auf der Y-Achse wurde CD4 als Oberflächenmarker und auf der X-Achse CD161 angewendet. In der nebenstehenden Grafik wurden die unbehandelte Population CD3⁺CD4⁺CD161⁺ mit dem Zytokin TNF- α präsentiert, welches in dem linken unteren Quadranten sichtbar ist.

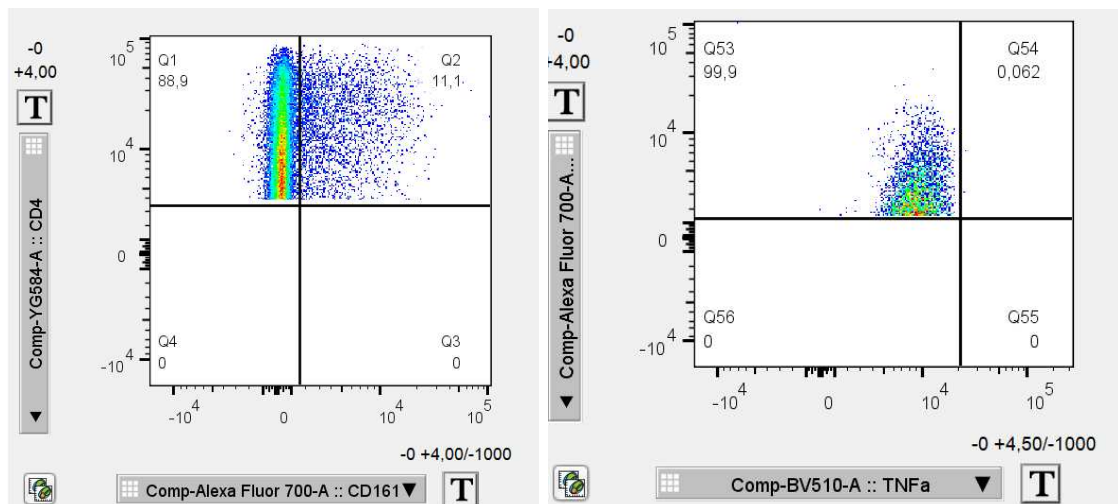


Abbildung 12 CD3⁺CD4⁺ (links); unbehandelt CD3⁺CD4⁺CD161⁺ mit dem Zytokin TNF- α (rechts) mittels FlowJo

Die Abbildung 12 zeigt auf der linken Seite die CD4⁺ Population. Auf der Y-Achse ist CD4 als Oberflächenmarker und auf der X-Achse CD161 dargestellt. In der nebenstehenden Grafik zeigen sich die unbehandelte Population CD3⁺CD4⁺CD161⁺ mit dem Zytokin TNF- α , welches in dem rechten oberen Quadranten mit 0,062 % sichtbar ist.

In den beiden Abbildung 13 und Abbildung 14 wurde der Ablauf für die Darstellung der Zytokine aufgezeigt. Dabei ist die Herangehensweise für alle Populationen mit den jeweiligen Zytokinen die gleiche. Dafür wurde als erstes der Graphen für die unbehandelten Zellen genutzt und anschließend das Gate passend gesetzt (siehe Abbildung 13 links und Abbildung 14 links). Danach wurden im Programm FlowJo die Gruppen miteinander verknüpft. Somit wurden die unbehandelten Zellen mit den behandelten Zellen kombiniert und das Gate an der gleichen Stelle gesetzt. Am Ende wurde bei den behandelten Zellen (Abbildung 13 rechts und Abbildung 14 rechts) das Ergebnis dargestellt.

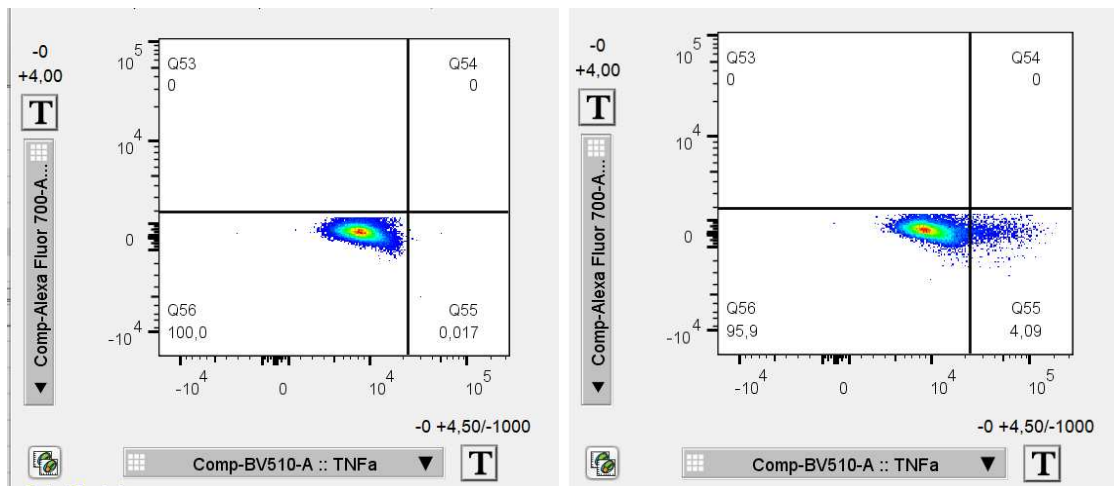


Abbildung 13: Unbehandelte Population $CD3^+CD4^+CD161^-$ mit dem Zytokin $TNF-\alpha$ (links); behandelt Population $CD3^+CD4^+CD161^-$ mit Zytokin $TNF-\alpha$ (rechts) mittels FlowJo

In der linken Grafik stellt sich die unbehandelte Population $CD3^+CD4^+CD161^-$ mit dem Zytokin $TNF-\alpha$ dar. Der Anteil an $TNF-\alpha$ kann im rechten unteren Quadranten abgelesen werden und beträgt 0,017 %. In der rechten Abbildung ist die verknüpfte Darstellung der behandelt Population $CD3^+CD4^+CD161^-$ mit Zytokin $TNF-\alpha$. Der Anteil an $TNF-\alpha$ kann im rechten unteren Quadranten abgelesen werden und stieg auf 4,09 %.

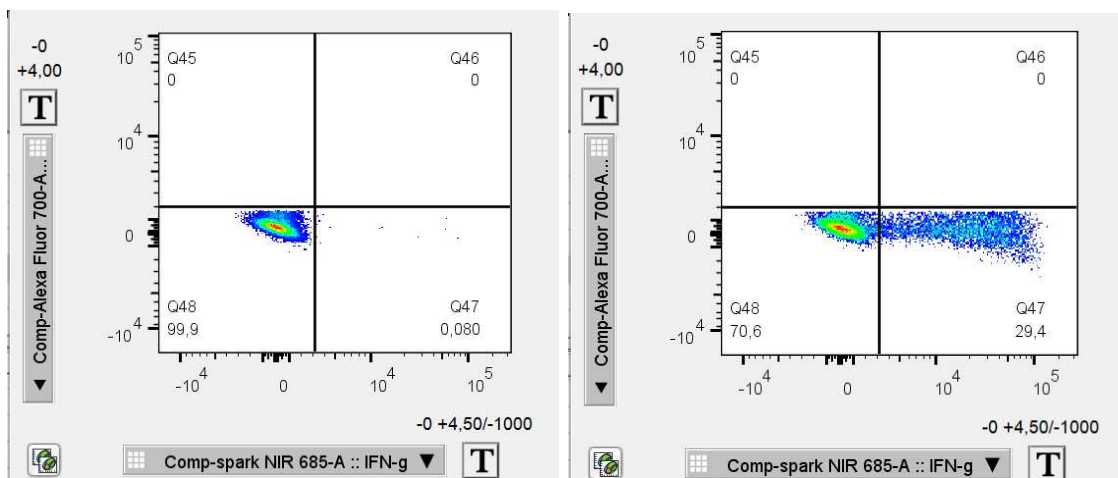


Abbildung 14: Unbehandelte PBMCs (links) und behandelte PBMCs (rechts) für die Population $CD3^+CD4^+CD161^-$ $IFN-\gamma$ mittels FlowJo

Ähnlich wie in Abbildung 13 sind links die unbehandelten PBMCs von der Population $CD3^+CD4^+CD161^-$ mit dem Zytokin $IFN-\gamma$ dargestellt. Der Anteil an $IFN-\gamma$ kann im rechten unteren Quadranten abgelesen werden und beträgt 0,08 %. In der rechten Abbildung ist die verknüpfte Darstellung der behandelt Population $CD3^+CD4^+CD161^-$ mit Zytokin $IFN-\gamma$. Der Anteil an $TNF-\alpha$ kann im rechten unteren Quadranten abgelesen werden und stieg durch die Stimulierung auf 29,4 %.

5.5 Lebend-Tot-Färbung

Für die Qualitätssicherung der Arbeit wurde eine Lebend-Tot-Färbung durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Zellen vital sind. Durch die Lebend-Tot-Färbung der Zellen konnte gezeigt werden, dass vor der Behandlung im Mittelwert 83,7 % und nach der Behandlung mit OMNi-BiOTiC® 10 im Mittelwert 83,62 % der vitalen Zellen erhalten blieben (siehe Tabelle 8). Es gab zwei Ausnahmen. Die Patientenprobe TH17011 zeigte überdurchschnittliche hohe Werte mit 95,3 % vor (A) und 97 % nach (B) der Behandlung mit OMNi-BiOTiC® 10. Im Gegensatz dazu zeigte die Probe TH17014 niedrigere Werte mit 70,4 % bei A und 70,7 % bei B.

Patientenprobe	Lebende Zellen Vorher (A) [%]	Lebende Zellen Nachher (B) [%]
TH17006	84,1	85,5
TH17007	81,5	86
TH17008	80,8	85,3
TH17009	83,4	77,2
TH17010	88	83,7
TH17011	95,3	97
TH17012	85,5	85,7
TH17013	86	90,2
TH17014	70,4	70,7
TH17015	82	74,9
Mittelwert	83,7	83,62

Tabelle 8: Prozentualer Anteil an Lebenden Zellen vor (A) und nach (B) der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC® 10 Einnahme

5.6 Mikrobiom-Auswertung

Die Auswertung der Stuhlproben erfolgte in einem externen Labor im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig. Es gab zu jedem Patienten drei Stuhlproben, die an unterschiedlichen Zeitpunkten erworben wurden. Der erste Zeitpunkt zur Abnahme der Stuhlprobe erfolgte vor dem Beginn der OMNi-BiOTiC® 10-Behandlung. Dieser wird in den weiteren Kapiteln mit dem Patienten Kürzel A (Beispiel TH17... A) gekennzeichnet. Die zweite Stuhlprobe wurde nach der 3-wöchigen Omnibiotic-Therapie abgegeben und hat die Kennzeichnung B. Die letzte Probe ist mit einem C markiert und stellt den Zeitpunkt drei Monate nach der Behandlung dar. Dafür wurden die Stuhlproben mit einem RNAlater versetzt und eingefroren. Das

gastrointestinale Mikrobiom wurde mittels bakterieller 16S rRNA-Technik analysiert. Diese Sequenzanalyse erlaubte eine präzise Selektion bakterieller DNA (The NIH HMP Working Group *et al.* 2009). Die Analyse und Durchführung der Auswertung erfolgte von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Pieper im HZI in Braunschweig.

Das Präparat OMNi-BiOTiC® 10 setzt sich aus den unten aufgeführten Stämmen mit der jeweiligen Identifizierung zusammen (siehe Tabelle 9).

Name Stamm (die zum Zeitpunkt ihrer Isolierung in Gebrauch waren)	derzeit zugelassenen und gültig veröffentlichten Artnamen
<i>Lactobacillus acidophilus</i> W55 and W37	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i> W72	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> W71	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
<i>Enterococcus faecium</i> W54	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lactobacillus salivarius</i> W24	<i>Ligilactobacillus salivarius</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i> W62	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i> W23	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>Bifidobacterium lactis</i> W18	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>
<i>Bifidobacterium longum</i> W51	<i>Bifidobacterium longum</i>

Tabelle 9: Bestandteile OMNi-BiOTiC® 10 mit jeweiliger Identifizierung

5.7 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse der Zytokine wurden die Programme Microsoft Excel, Prism 5 und Prism 9.4.1 genutzt. Dafür wurden folgende statistische Tests verwendet: T-Test (parametrisch und verbunden), Wilcoxon-Analyse (nicht-parametrisch) und multipler T-Test (doppelter T-Test). Alle Unterschiede für $p < 0,05$ wurden als signifikant erachtet. Für die Auswertung des Stuhltagebuches wurde ein Mann-Whitney U-Test angewendet. Die Auswertung des gastrointestinalen Mikrobiota erfolgte durch die Arbeitsgruppe vom HZI in Braunschweig mittels umfangreicher R-Analyse.

6. Ergebnisse

6.1 Die Bestimmung des Einflusses der OMNi-BiOTiC® 10-Therapie auf die Zusammensetzung und Funktionalität von Zellen des peripheren Blutes

6.1.1 Kein Einfluss der OMNi-BiOTiC® 10-Therapie auf die Zusammensetzung von Zellpopulationen des peripheren Blutes

In einem ersten Ansatz wurde die Zusammensetzung der PBMCs im peripheren Blut analysiert. Dieser Ergebnisteil zeigt eine Übersicht über die Zellpopulationen, die mit dem jeweiligen Vergleich vor und nach der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC® 10-Einnahme untersucht wurden. Bei den Zellpopulationen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede vor und nach der Probiotika Behandlung mit OMNi-BiOTiC® 10 (T-Test $p > 0,05$). In Tabelle 10 sind die Zellpopulationen, die für die Auswertung zu den Zytokinen von besonderem Interesse waren, nochmals dargestellt.

Zellpopulation	Zellgruppe
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD161 ⁺	TH17-ähnliche Zellen
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD161 ⁻	TH-Zellen
CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD161 ⁺	Andere CD161 positive Zellen
CD20 ⁺ CD3 ⁻ CD14 ⁻	B-Zellen
CD14 ⁺ CD3 ⁻ CD20 ⁻	Monozyten

Tabelle 10: Zuordnung der Zellpopulationen

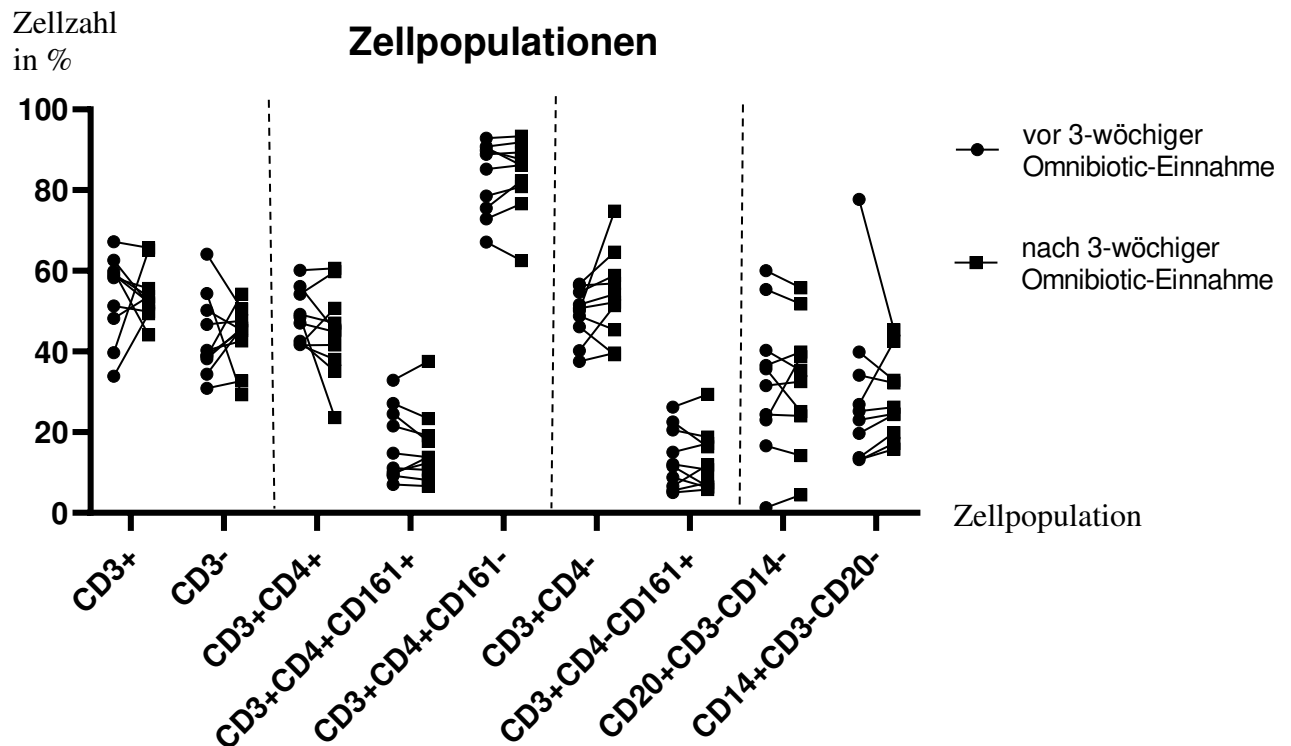


Abbildung 15: Übersicht der durchflusszytometrischen Analyse der Zellpopulationen vor (A) und nach (B) der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC® 10-Einnahme

Die Abbildung 15 zeigt eine Übersicht über die Analyse der Zellpopulationen mit dem Vergleich vor und nach der Probiotika-Einnahme. Dabei stellt die Y-Achse die Zellzahl in Prozent der lebenden Zellen und die X-Achse die verschiedenen Populationen dar. In der verbundenen Analyse sind für jede Zellpopulation die Ergebnisse von den Patienten im Vorher-Nachher-Vergleich dargestellt. In der statistischen Auswertung mittels T-Test ergab sich für die Populationen $p > 0,05$. $n = 10$.

Im Folgenden wird die Herangehensweise für die Darstellung der einzelnen Zellpopulationen beschrieben. Alle folgenden Abbildungen sind Ausschnitte aus der oben dargestellten Übersichtsabbildung (Abbildung 15) und dienen der besseren Ansicht und einer detaillierteren Erklärung.

T-Zellen

In einer ersten Analyse wurde die Gesamtanzahl aller im peripheren Blut vorkommenden T-Zellen untersucht. Hierfür wurde der prozentuale Anteil der CD3⁺-Zellen an der Gesamtpopulation der lebenden Zellen untersucht. Somit wurden aus den PBMCs die CD3⁺- und CD3⁻-Zellen typisiert (Abbildung 16). In dieser Abbildung sind beide Populationen im Vorher-Nachher-Vergleich grafisch dargestellt.

Im Mittel betrug die Anzahl der CD3⁺-Zellen (Anteil CD3⁺-Zellen an lebenden Zellen) vor der Behandlung 53,9 % (Standardabweichung: $\pm 10,0$ %) und nach der Behandlung 54,1 % (Standardabweichung: $\pm 6,4$ %). Ähnlich verhielten sich die Mittelwerte für die

CD3⁻-Zellen vor der Behandlung 43,7 % (Standardabweichung: +- 9,6 %) und nach der Behandlung 43,9 % (Standardabweichung: +- 7,2 %).

Zusammenfassend kann keine signifikante Zu- oder Abnahme der Populationen nach der Therapie festgestellt werden (T-Test CD3⁺ p=0.966, T-Test CD3⁻ p=0,959).

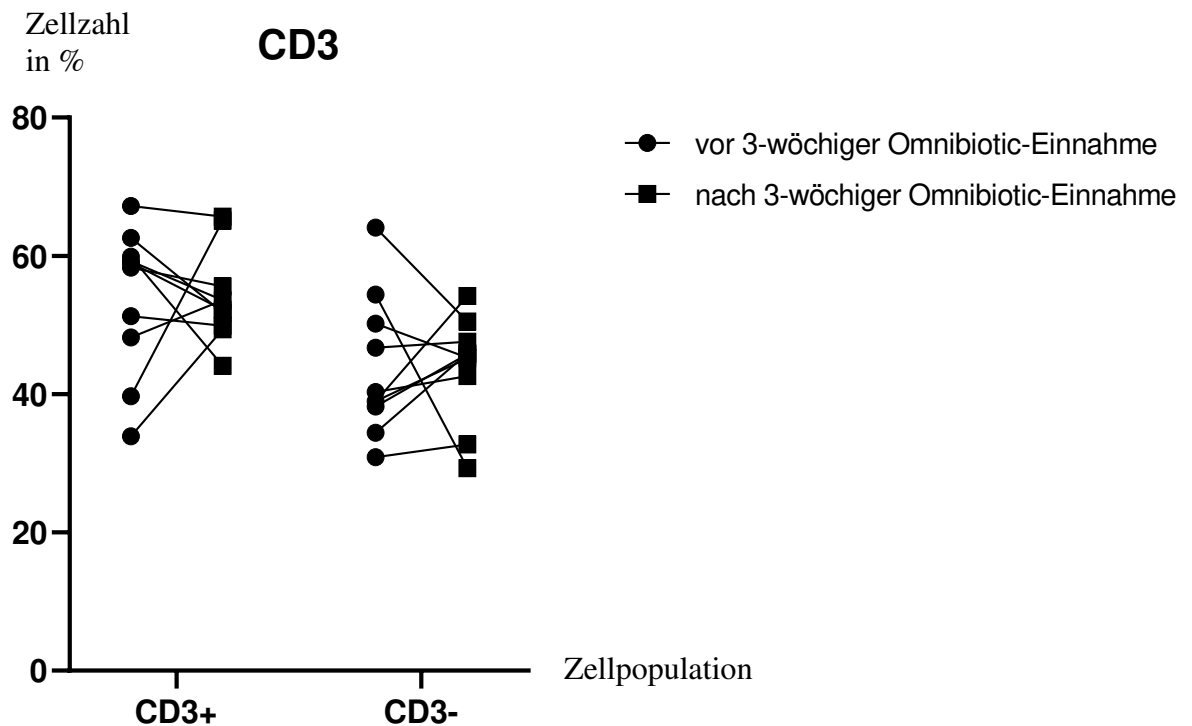


Abbildung 16: Durchflusszytometrische Analyse der CD3⁺- und CD3⁻-Zellen im Vorher-Nachher-Vergleich in Prozent

Diese Grafik stellt in der Y-Achse die Zellzahl der lebenden Zellen in Prozent und in der X-Achse die Zellpopulation CD3⁺ (links) und CD3⁻ (rechts) dar. Es erfolgte eine verbundene Darstellung der Ergebnisse vor und nach der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC® 10-Einnahme. Bei den CD3⁺-Zellen lagen die Werte vor der Probiotika-Einnahme (A) zwischen 33,9 % und 67,2 % und nach der Probiotika-Einnahme (B) zwischen 44,1 % und 65,7 %. Die CD3⁻-Population hat ähnliche Werte bei A zwischen 34,4 % und 64,1 % und bei B zwischen 29,3 % und 54,2 %. In der statistischen Auswertung mittels T-Test ergab sich für die Populationen p>0,05. n=10.

TH17-ähnliche Zellen und TH-Zellen

Die nächste Analyse fokussierte sich auf die CD3⁺CD4⁺- und CD3⁺CD4⁻-Zellen. Bei der Population CD3⁺CD4⁺-Zellen lagen die Mittelwerte vor der Probiotika-Einnahme (A) bei 48,2 % (Standardabweichung: +- 6,4 %) und nach der Probiotika-Einnahme (B) bei 44,7 % (Standardabweichung: +- 10,5 %). In einem weiteren Zwischenschritt wurde der Oberflächenmarker CD161 ergänzt und TH17-ähnliche Zellen (CD3⁺CD4⁺CD161⁺) und

TH-Zellen ($CD3^+CD4^+161^-$) identifiziert. Die Gruppe $CD3^+CD4^+CD161^+$ zeigte ähnliche Mittelwerte vor Einnahme mit 16,8 % (Standardabweichung: $\pm 8,6$ %) und nach der Einnahme bei 16,3 % (Standardabweichung: $\pm 8,5$ %). In der dritten Population der $CD3^+CD4^+161^-$ -Zellen ergaben sich vorher die Mittelwerte bei 83,2 % (Standardabweichung: $\pm 8,6$ %) und nachher bei 83,7 % (Standardabweichung: $\pm 8,5$ %).

Insgesamt lässt sich keine Zu- oder Abnahme vor und nach der Einnahme von OMNi-BiOTiC® 10 für die beschriebenen Populationen in dem statistischen T-Test ($CD3^+CD4^+$ $p=0,259$, $CD3^+CD4^+CD161^+$ $p=0,689$ und $CD3^+CD4^+161^-$ $p=0,683$) erkennen.

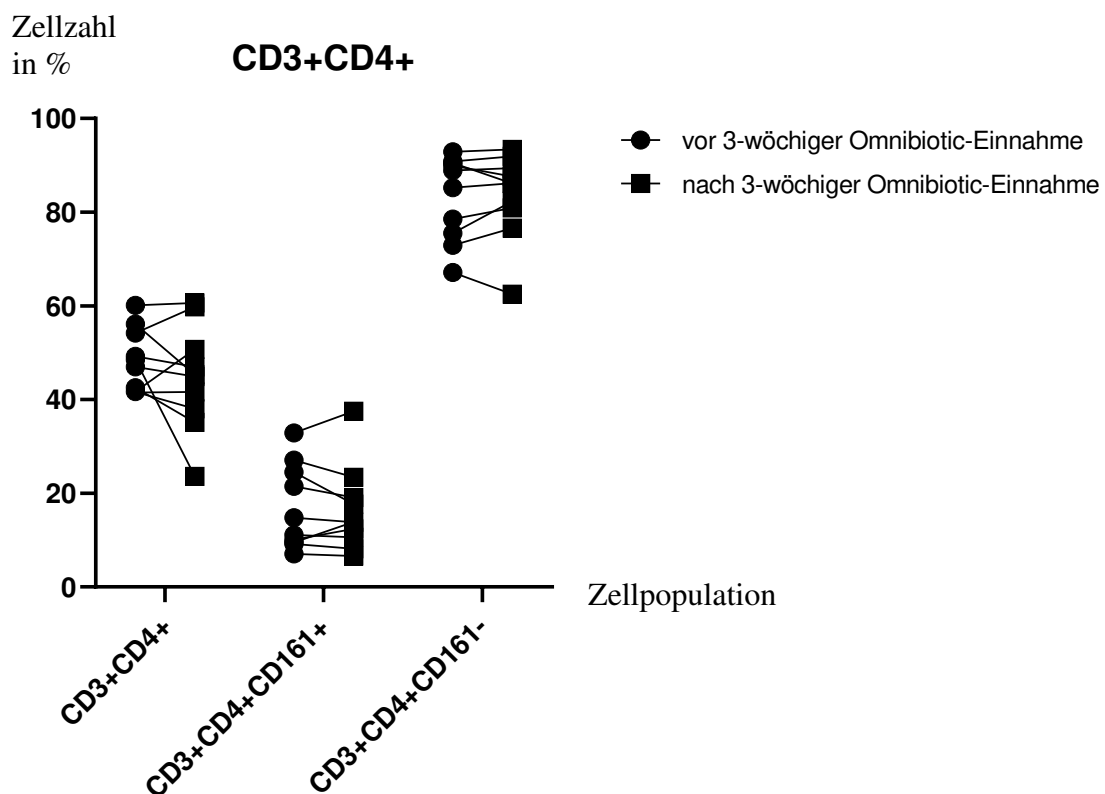


Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse von $CD3^+CD4^+$ Population und $CD3^+CD4^+$ mit dem Oberflächenmarker CD161 im Vorher-Nachher-Vergleich in Prozent

In der Abbildung 17 wurde in der Y-Achse die Zellzahl in Prozent und in der X-Achse die Zellpopulation $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD4^+161^+$ und $CD3^+CD4^+161^-$ dargestellt. Es erfolgte eine verbundene Darstellung der Ergebnisse vor und nach der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC® 10-Einnahme. Die $CD3^+CD4^+$ Zellen sind in der Abbildung 17 im linken Teil der Grafik dargestellt. Die Ergebnisse zeigten ähnliche Prozentwerte bei A und B zwischen 38 % und 60,6 %. Ausgehend von der Population $CD3^+CD4^+$ wurde mit dem Oberflächenmarker CD161 gearbeitet und zwischen $CD3^+CD4^+CD161^+$ und $CD3^+CD4^+CD161^-$ unterschieden. Bei diesen Gruppen präsentierten sich die Werte ebenfalls ähnlich. Innerhalb der

CD3⁺CD4⁺CD161⁺ erstreckten sich die Prozentzahlen von A und B zwischen 6,61 % und 37,5 %. Während die Werte bei CD3⁺CD4⁺CD161⁻ vor und nach der Behandlung mit OMNi-BiOTiC® 10 zwischen 62,5 % und 93,4 % lagen. In der statistischen Auswertung mittels T-Test ergab sich für die Populationen $p > 0,05$. $n=10$.

Andere CD161 positive Zellen

Die oben beschriebene Vorgehensweise wurde ebenfalls mit CD4⁻ Zellen durchgeführt und es entstand die Population CD3⁺CD4⁻ (siehe Abbildung 18). Die Mittelwerte lagen vor der Probiotika-Einnahme (A) bei 49,3 % (Standardabweichung: $\pm 6,1$ %) und nach der Probiotika-Einnahme (B) bei 53,7 % (Standardabweichung: $\pm 10,4$ %). Die Gruppe CD3⁺CD4⁻CD161⁺ (rechte Seite der Abbildung) zeigte ebenfalls ähnliche Mittelwerte bei A 13,4 % (Standardabweichung: $\pm 7,1$ %) und bei B 13,0 % (Standardabweichung: $\pm 7,1$ %).

Auch bei diesen Ergebnissen wurden keine signifikanten Veränderungen vor und nach der Behandlung mit OMNi-BiOTiC® 10 sichtbar (T-Test CD3⁺CD4⁻ $p=0,144$ und CD3⁺CD4⁻CD161⁺ $p=0,785$).

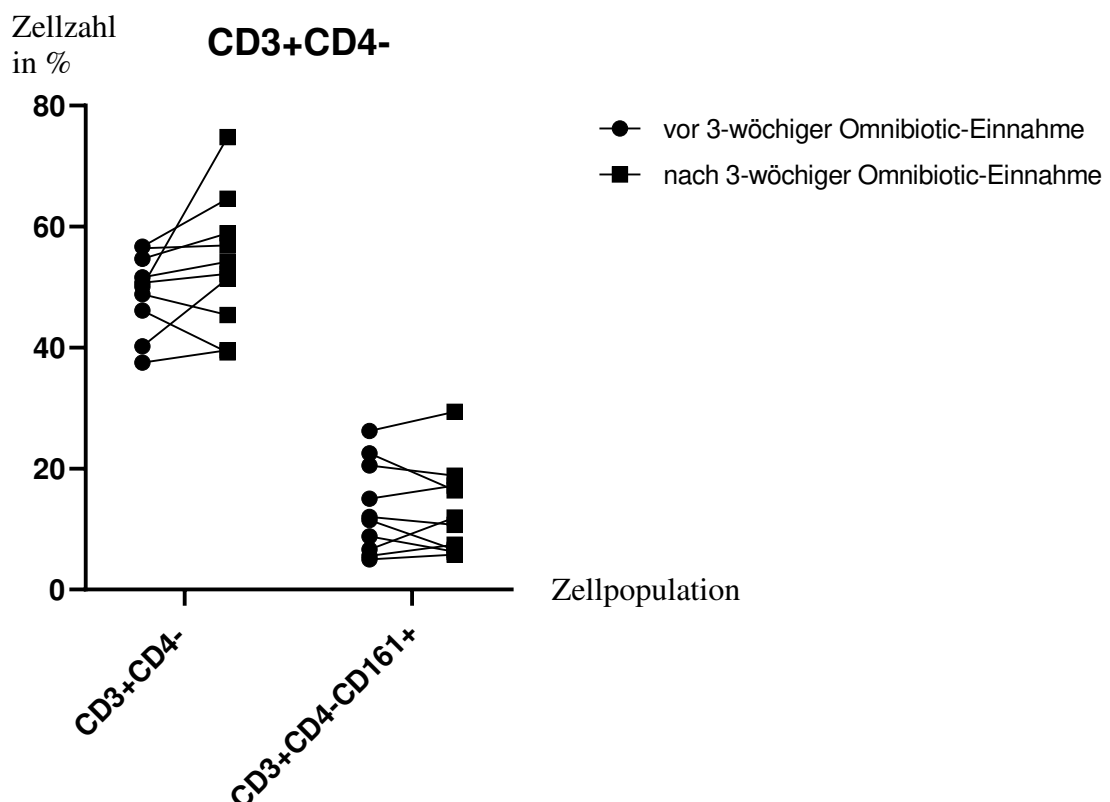


Abbildung 18: Durchflusszytometrische Analyse von CD3⁺CD4⁻ Population und CD3⁺CD4⁻CD161⁺ vor und nach 3-wöchiger Omnibiotic-Einnahme in Prozent

Es erfolgte eine verbundene Darstellung der Ergebnisse vor und nach der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC® 10-Einnahme. Diese Grafik stellt in der Y-Achse die Zellzahl in Prozent und in der X-Achse die Zellpopulation

CD3⁺CD4⁻ und CD3⁺CD4⁻161⁺ dar. Die Population CD3⁺CD4⁻ präsentiert sich in der Abbildung 18 auf der linken Seite. Bei dieser Gruppe befanden sich die Werte für A zwischen 37,5 % und 56,7 % und bei B zwischen 39,2 % und 74,8 %. Anschließend wurde mit dem Oberflächenmarker CD161 gearbeitet und es resultierte die Population CD3⁺CD4⁻CD161⁻ (Abbildung 18). Auch bei dieser Gruppe fanden sich ähnliche Zahlenwerte, die bei A und B zwischen 5,0 % und 29,4 % lagen. In der statistischen Auswertung mittels T-Test ergab sich für die Populationen $p > 0,05$. $n=10$.

B-Zellen und Monozyten

Neben T-Zellen wurden auch mögliche Veränderungen durch die Einnahme von OMNi-BiOTiC® 10 in der Zusammensetzung von B-Zellen (CD20⁺CD3⁻CD14⁻) und Monozyten (CD14⁺CD3⁻CD20⁻) untersucht. Dort wurde ebenfalls ein Vorher-Nachher-Vergleich in Bezug auf die Einnahme von OMNi-BiOTiC® 10 durchgeführt. Bei der Population CD20⁺CD3⁻CD14⁻ lagen die Mittelwerte vor der Probiotika-Einnahme (A) bei 32,5 % (Standardabweichung: $\pm 16,6$ %) und nach der Probiotika-Einnahme (B) bei 32,2 % (Standardabweichung: $\pm 15,0$ %). Die Gruppe CD14⁺CD3⁻CD20⁻ zeigte ähnliche Mittelwerte bei A 28,6 % (Standardabweichung: $\pm 18,4$ %) und bei B 28,1 % (Standardabweichung: $\pm 9,6$ %).

Alles in allem wurde auch in diesen beiden Gruppen keine signifikante Zu- oder Abnahme im statistischen T-Test (CD20⁺CD3⁻CD14⁻ $p=0,899$ und CD14⁺CD3⁻CD20⁻ $p=0,895$) zwischen den verschiedenen Einnahmezeitpunkten von OMNi-BiOTiC® 10 gemessen.

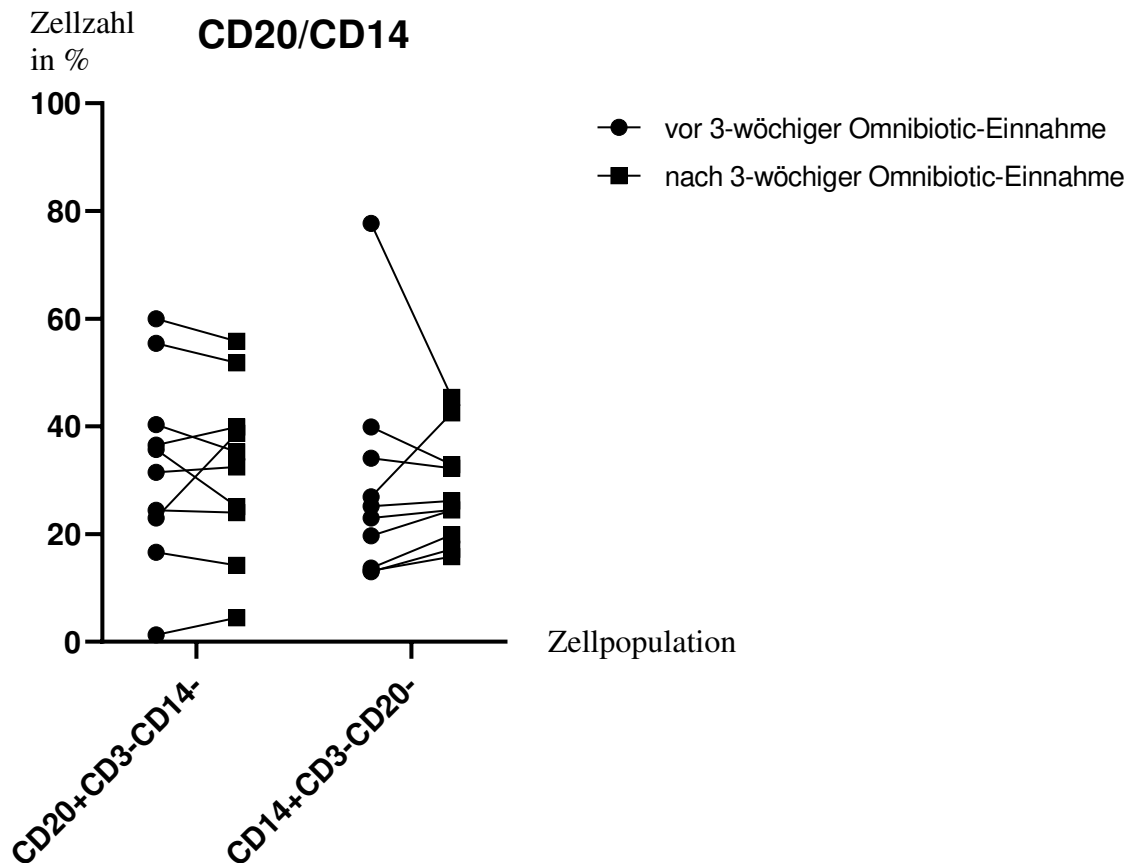


Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse von B-Zellen ($CD20^+CD3^-CD14^-$) und Monozyten ($CD14^+CD3^-CD20^-$) vor und nach 3-wöchiger OMNi-BiOTiC[®] 10-Einnahme in Prozent

Die Abbildung 19 zeigt eine Übersicht über die Untersuchung der Zellpopulationen mit dem Vergleich vor und nach der Probiotika-Einnahme. Dabei stellt die Y-Achse die Zellzahl in Prozent der lebenden Zellen und die X-Achse die Populationen $CD20^+CD3^-CD14^-$ und $CD14^+CD3^-CD20^-$ dar. In den Ergebnissen zeigten sich Prozentzahlen für die B-Zellen vor und nach der Probiotika Behandlung zwischen 1,3 % und 55,8 %. Innerhalb der Monozyten präsentierten sich die Werte vor der Behandlung zwischen 13 % und 77,7 %, dabei ist der letzte Wert als Ausreißer zu betrachten. Die anderen Werte zeigten sich hauptsächlich zwischen 13 % und 39,9 %. Nach der Behandlung lagen die Zahlenwerte zwischen 15,8 % und 45,4 %. Dies wird in Abbildung 19 grafisch dargestellt. In der statistischen Auswertung mittels T-Test ergab sich für die Populationen $p > 0,05$, $n = 10$.

6.1.2 OMNi-BiOTiC[®] 10-Therapie zeigt keine Veränderungen auf die Expression der Zytokine IL-17A und IL-17F

Für die Fragestellung ist die Zytokinexpression vor und nach Einnahme von OMNi-BiOTiC[®] 10 von besonderem Interesse. In allen in Tabelle 10 beschriebenen Zellpopulationen wurde mittels der Antikörper gegen verschiedene Zytokine (Tabelle 7) Analysen durchgeführt. Hierbei wurde der Schwerpunkt auf IL-17A und IL-17F gelegt.

Untersuchung von IL-17A und IL-17F in TH17-ähnlichen Zellen (CD3⁺CD4⁺CD161⁺)

Für die TH17-ähnlichen Zellen erfolgte wieder ein Vorher-Nachher-Vergleich mit zwei verschiedenen Angaben, einmal die Angabe in Prozent als Maß für die Häufigkeit der Zellen und außerdem die *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) als Parameter für den Zytokingehalt der Zellen.

Die Mittelwerte von IL-17A lagen vor der Probiotika-Einnahme (A) bei 2,6 % (Standardabweichung: +- 1,9 %) und nach der Probiotika-Einnahme (B) bei 2,9 % (Standardabweichung: +- 1,9 %). IL-17F zeigten ebenfalls ähnliche Mittelwerte vorher mit 0,9 % (Standardabweichung: +- 0,6 %) und nachher mit 0,8 % (Standardabweichung: +- 0,8 %).

Bei der anderen Angabe als MFI lagen die Mittelwerte für IL-17A vor der Probiotika-Einnahme (A) bei 4057 (Standardabweichung: +- 4694) und nach der Probiotika-Einnahme (B) bei 5398 (Standardabweichung: +- 8497). Die IL-17F MFI zeigte ähnliche Mittelwerte bei A 224 (Standardabweichung: +- 178) und bei B 249 (Standardabweichung: +- 229).

	IL-17A Prozent	IL-17F Prozent	IL-17A MFI	IL-17F MFI
Wilcoxon-Test p-Wert	0,625	0,922	0,770	0,432

Tabelle 11: Durchgeführter Wilcoxontest mit dem jeweiligem p-Wert für IL-17A und IL-17F

Zusammenfassend zeigte sich bei den Vergleichen von IL-17A und IL-17F keine signifikante Veränderung durch die Einnahme von OMNi-BiOTiC® 10.

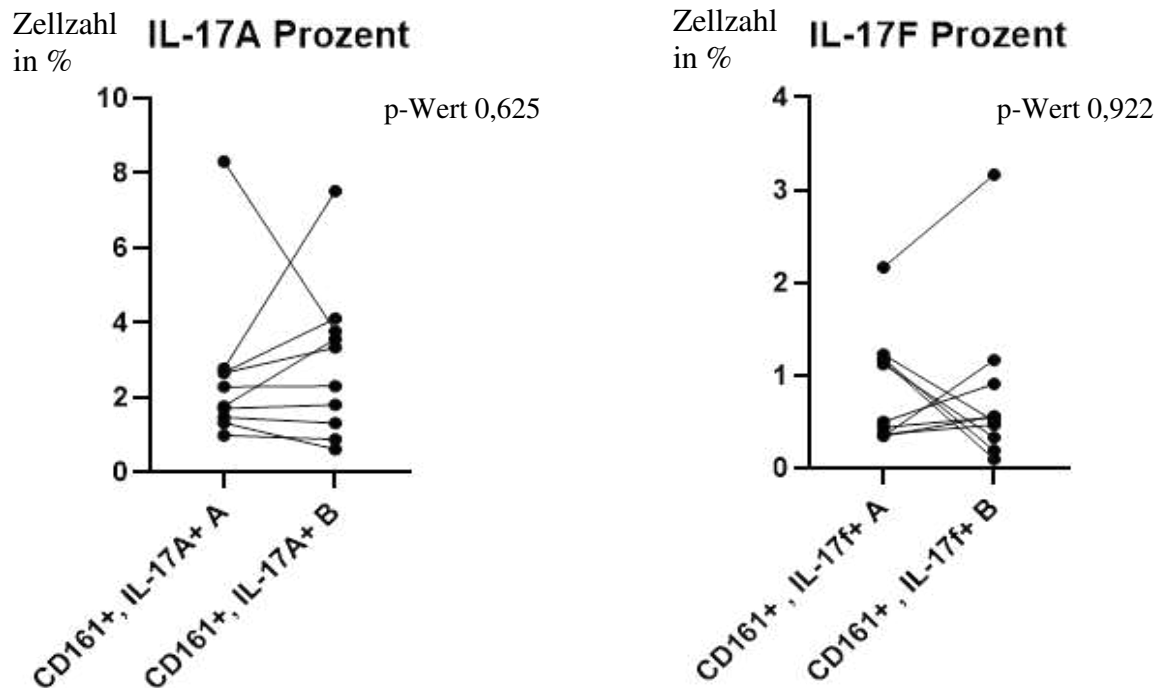


Abbildung 20: Durchflusszytometrische Analyse von IL-17A und IL-17F Prozent vor (A) und nach (B) der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC® 10-Einnahme in Prozent

In Abbildung 20 wurde die durchflusszytometrische Analyse von IL-17A und IL-17F in einer verbundenen Analyse vor und nach der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC® 10-Einnahme dargestellt. Auf der Y-Achse sind die Zahlenwerte in Prozent angegeben. Die X-Achse präsentiert die Zellpopulationen im Vorher-Nachher-Vergleich. Dabei zeigt die linke Abbildung die Werte für IL-17A und die rechte Abbildung für IL-17F. Bei den Prozentzahlen für IL-17A und IL-17F zeigten sich die Werte zwischen 0 % und 8,31 % vor (A) und nach (B) der OMNi-BiOTiC® 10-Einnahme. Wilcoxon-Test $p > 0,05$. $n = 10$.

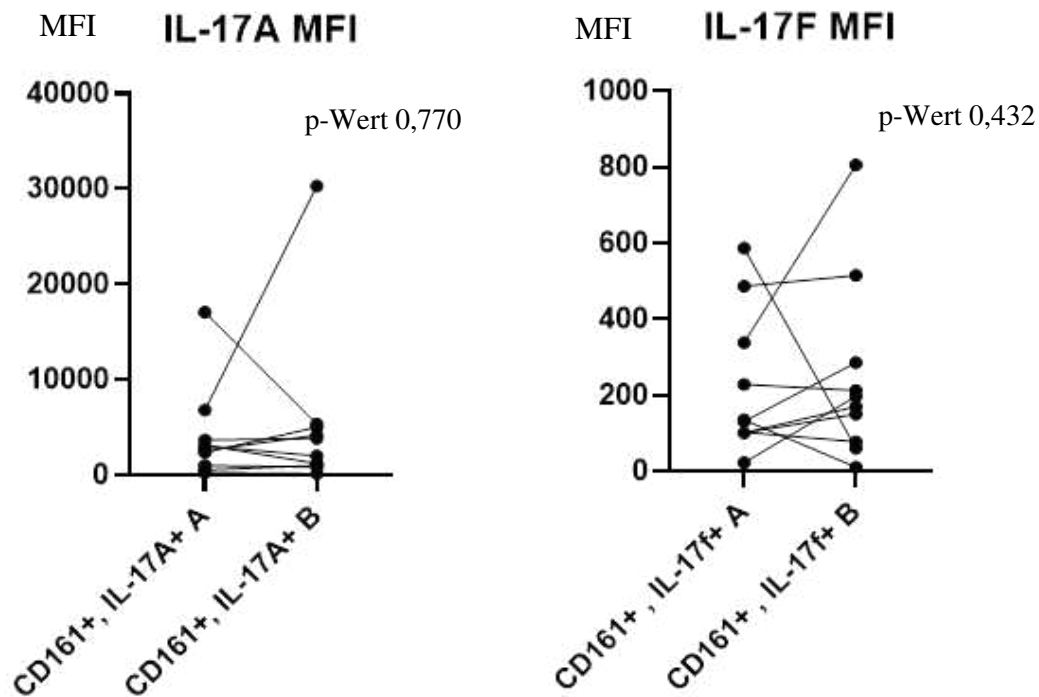


Abbildung 21: Durchflusszytometrische Analyse IL-17A und IL-17F MFI vor (A) und nach (B) der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC® 10-Einnahme, Angabe in MFI

Die Abbildung 21 präsentiert die grafische Darstellung für die Durchflusszytometrische Analyse von IL-17A (linke Abbildung) und IL-17F (rechte Abbildung) MFI vor (A) und nach (B) der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC® 10-Einnahme. Auf der Y-Achse sind die Zahlenwerte in MFI angegeben. Die X-Achse präsentiert die Zellpopulationen in einer verbundenen Analyse. Bei IL-17A MFI lagen die Werte für A zwischen 249 MFI und 17.077 MFI und für B zwischen 160 MFI und 30.329 MFI. Gleichzeitig erstreckten sich die Werte bei IL-17F MFI zwischen 11 MFI und 806 MFI. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Wilcoxon-Test ($p > 0,05$). $n=10$.

6.1.3 OMNi-BiOTiC® 10-Therapie führt zu Veränderungen auf die Expression der Zytokine IL-10, IL-13 und IFN- γ

Im Zentrum der Fragestellung stand der Einfluss von Laktobazillen auf die Zytokine IL-17A und IL-17F. Wie in dem Kapitel Methoden in Tabelle 3 dargestellt wurde, wurden die Zytokine erweitert. Hier werden aus den umfangreichen Datensätzen die signifikanten Ergebnisse dargestellt (siehe Abbildung 22, Abbildung 24 und Abbildung 23). Die hier nicht aufgeführten Daten befinden sich im Anhang.

Untersuchung von IL-10

Für das Zytokin IL-10 konnte in allen drei Populationen $CD3^+CD4^+CD161^-$ ($p=0,013$), $CD3^+CD4^+CD161^+$ ($p=0,027$) und $CD20^+CD3^-CD14^-$ ($p=0,039$) ein signifikanter Unterschied im Wilcoxon-Test nachgewiesen werden.

Im Mittel betrug die Anzahl von IL-10 in der Population $CD3^+CD4^+CD161^-$ vor der Behandlung 0,17 % (Standardabweichung: $\pm 0,097$ %) und nach der Behandlung 0,07 % (Standardabweichung: $\pm 0,04$ %). Ähnlich verhielten sich die Mittelwerte für die IL-10 in der Gruppe $CD3^+CD4^+CD161^+$ vor der Behandlung 2,07 % (Standardabweichung: $\pm 1,29$ %) und nach der Behandlung 0,82 % (Standardabweichung: $\pm 0,53$ %). Die Mittelwerte von IL-10 in der Population $CD20^+CD3^-CD14^-$ lagen vor der Probiotika-Einnahme (A) bei 1,62 % (Standardabweichung: $\pm 4,53$ %) und nach der Probiotika-Einnahme (B) 0,33 % (Standardabweichung: 0,79 %).

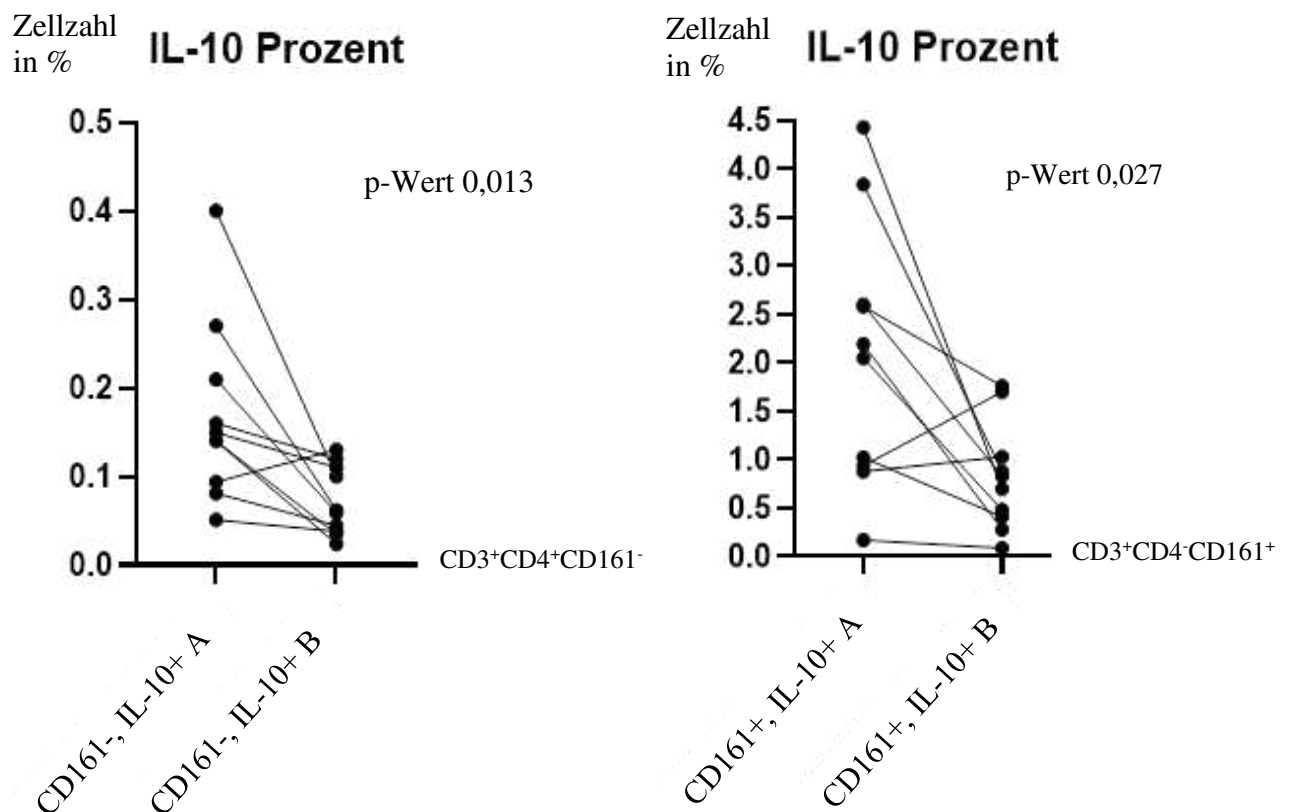


Abbildung 22: Durchflusszytometrische Analyse von $CD3^+CD4^+CD161^-$ IL-10 in Prozent (linke Abbildung); $CD3^+CD4^+CD161^+$ IL-10 in Prozent (rechte Abbildung), vor (A) und nach (B) der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC® 10-Einnahme

In Abbildung 22 wurde die durchflusszytometrische Analyse von IL-10 in den Populationen $CD3^+CD4^+CD161^-$ (linke Abbildung) und $CD3^+CD4^+CD161^+$ (rechte Abbildung) vor (A) und nach (B) der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC® 10-Einnahme dargestellt. Dabei stellt die X-Achse die verbundene Analyse der Population im Vorher-Nachher-Vergleich dar. Die Y-Achse zeigte die Zellzahl in Prozent. In der Gruppe $CD3^+CD4^+CD161^-$ präsentierten sich die Werte von IL-10 vor der Probiotika-Einnahme zwischen 0 % und 0,4 % (A) und nach der Einnahme zwischen 0 % und 0,13 % (B). Es wurde ein Absinken der Werte nach der 3-wöchigen Einnahme von OMNi-BiOTiC® 10 sichtbar. Der dazugehörige p-Wert im Wilcoxon-Test lag bei 0,013. Die Werte für IL-10 bei $CD3^+CD4^+CD161^+$ zeigten ebenfalls eine Abnahme

im Wilcoxon-Test ($p=0,027$) im Vorher-Nachher-Vergleich. Die Werte lagen hier zwischen 0 % und 4,43 % (A) vor und zwischen 0 % und 1,76 % (B) nach der Einnahme von OMNi-BiOTiC® 10. $n=10$.

Zellzahl in
%

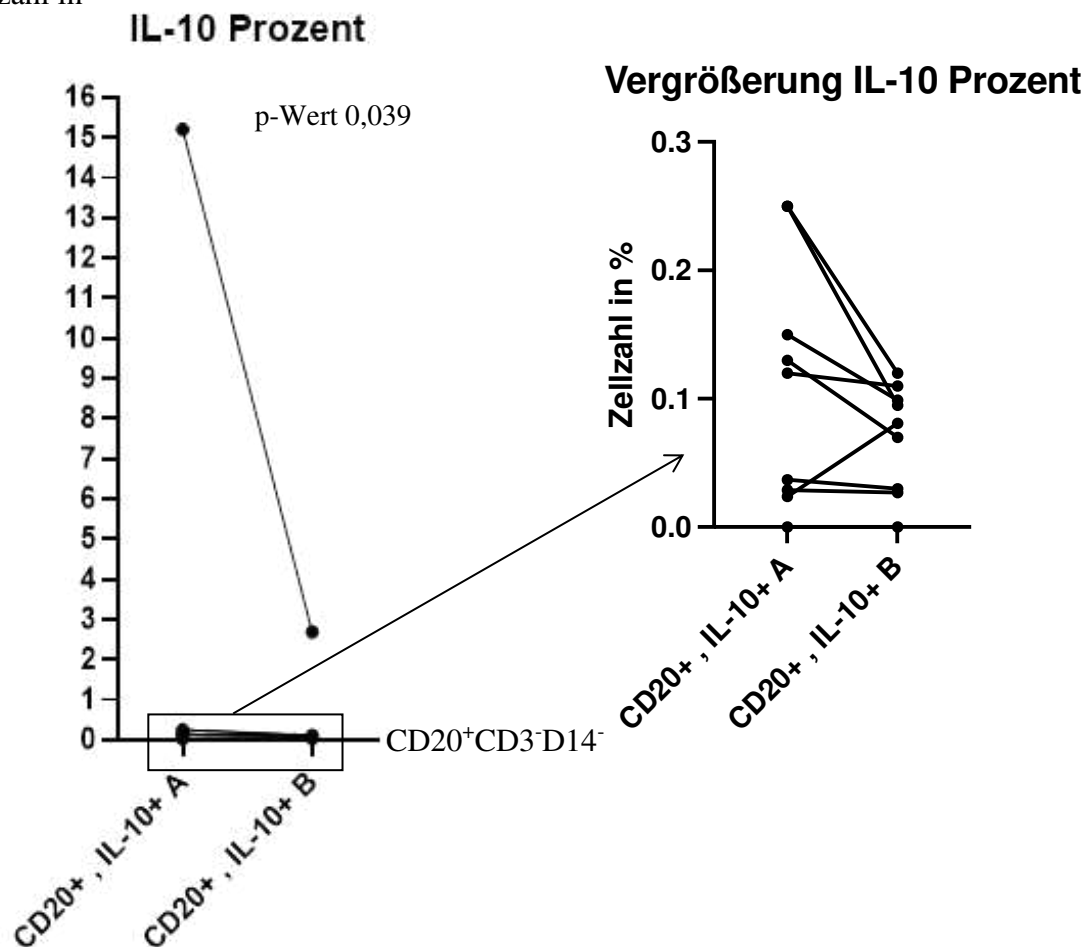


Abbildung 23: Durchflusszytometrische Quantifizierung von IL-10 positiven B-Zellen in Prozent, vor (A) und nach (B) der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC® 10-Einnahme

Die Abbildung 23 stellt die durchflusszytometrische Quantifizierung von IL-10 positiven B-Zellen in Prozent vor (A) und nach (B) der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC® 10-Einnahme dar. In der letzten Gruppe $CD20^+CD3^+CD14^-$ zeigte sich bei IL-10 in Prozent ein Patient als Ausreißer mit 15,2 % (A) vor und mit 2,69 % (B) nach der Einnahme von OMNi-BiOTiC® 10. Die restlichen Werte befanden sich vorher zwischen 0 % und 0,25 % und nachher zwischen 0 % und 0,12 %. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme und der dazugehörige p-Wert im Wilcoxon-Test lag bei 0,039. $n=10$.

Untersuchung von IFN- γ

Auch für IFN- γ konnte bezüglich der MFI in der Zellpopulation $CD3^+CD4^+CD161^+$ (andere CD161 positive Zellen) ein signifikanter Unterschied im Wilcoxon-Test (p-Wert 0,049) nachgewiesen werden.

Im Mittel betrug die Anzahl von IFN- γ 6668 MFI in der Population CD3⁺CD4⁺CD161⁺ vor der Behandlung (Standardabweichung: $\pm$ 3465) und nach der Behandlung 8979 (Standardabweichung: $\pm$ 3769).

Untersuchung von IL-13

Zudem zeigte sich in der Gruppe der B-Zellen das Zytokin IL-13 in Prozent ebenfalls mit einem signifikanten Unterschied im Wilcoxon-Test (p-Wert 0.014). Bei der Population CD20⁺CD3⁺CD14⁺ lagen die Mittelwerte von IL-13 vor der Probiotika-Einnahme (A) bei 0,98 % (Standardabweichung: $\pm$ 1,66 %) und nach der Probiotika-Einnahme (B) bei 0,31 % (Standardabweichung: $\pm$ 0,26 %).

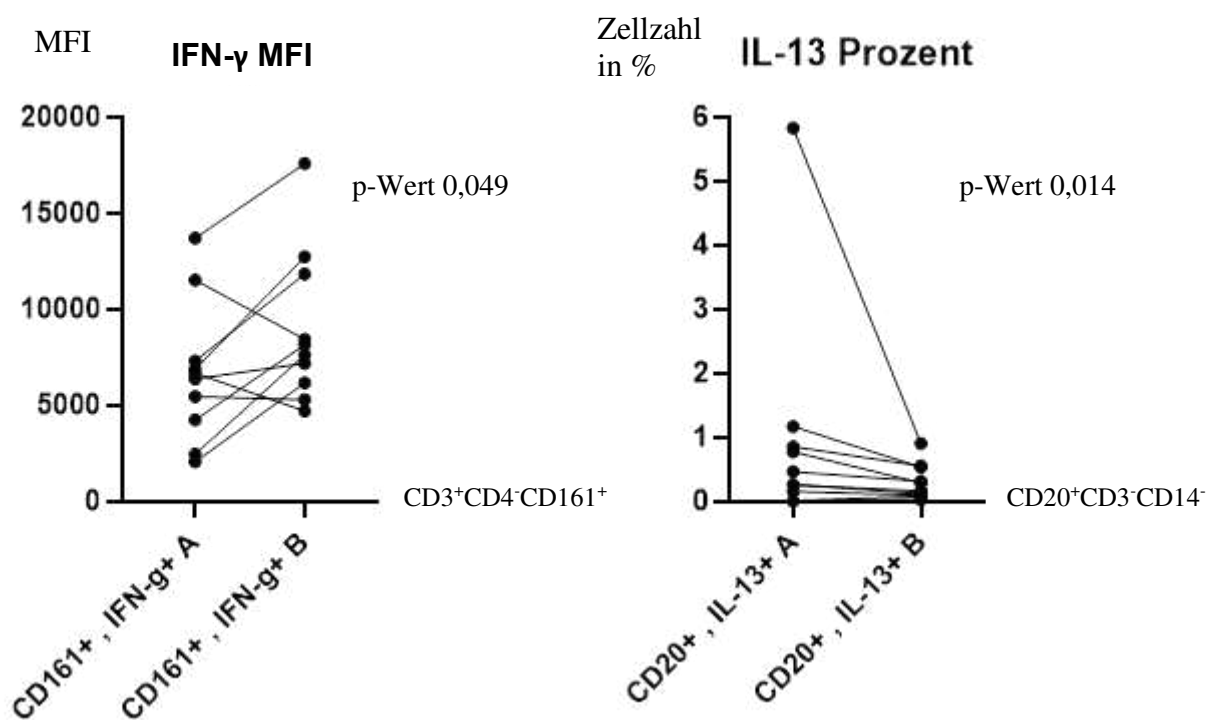


Abbildung 24: Durchflusszytometrische Bestimmung der IFN- γ Expressionsstärke (MFI) in CD3⁺CD4⁺CD161⁺ Zellen (linke Abbildung) und IL-13 in B-Zellen in Prozent (rechte Abbildung) vor-(A) und nach (B) der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC® 10-Einnahme

Die Abbildung 24 stellt die durchflusszytometrische Bestimmung der IFN- γ Expressionsstärke (MFI) in CD3⁺CD4⁺CD161⁺ Zellen (linke Abbildung) und B-Zellen IL-13 (rechte Abbildung) vor-(A) und nach (B) der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC® 10-Einnahme dar. Die Y-Achse präsentiert die Zellzahl in MFI (linke Abbildung) und Prozent (rechte Abbildung) und die X-Achse zeigt die verbundene Analyse der Zellpopulationen im Vorher-Nachher-Vergleich. Bei der Population CD3⁺CD4⁺CD161⁺ zeigten die Werte bei IFN- γ einen Anstieg vor und nach der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC® 10-Einnahme mit einem p-Wert von 0,049 im Wilcoxon-Test. Dabei lagen die Werte von IFN- γ zwischen 2.065 MFI und 13.713 MFI vor (A) der Probiotika-Einnahme und zwischen 4.715 MFI und 17.589 MFI nach (B) der Probiotika-Einnahme. In der Population der B-Zellen präsentierte sich bei IL-10 ein Ausreißer bei A mit 5,83 %. Die restlichen

Werte lagen bei 0 % bis 1,17 % (A). Während bei B alle Werte zwischen 0 % und 0,9 % lagen. Insgesamt wurde bei dieser Gruppe ein Absinken im Vorher-Nachher-Vergleich sichtbar. Der p-Wert im Wilcoxon-Test lag bei 0,014. n=10.

In allen drei Populationen ($CD3^+CD4^+CD161^-$, $CD3^+CD4^+CD161^+$, $CD20^+CD3^-CD14^-$) für das Zytokin IL-10 und bei den B-Zellen für das Zytokin IL-13 zeigte sich eine signifikante Abnahme der Mittelwerte nach der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC® 10-Therapie.

Zudem konnte eine signifikante Zunahme für die Gruppe der anderen CD161 positive Zellen ($CD3^+CD4^+CD161^+$) für das Zytokin IFN- γ MFI für den Zeitraum der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC® 10-Therapie gezeigt werden.

6.2 Die Konsequenzen der OMNi-BiOTiC® 10 Behandlung auf die Zusammensetzung des Mikrobioms der Patienten

Die Darstellung und Auswertung der Mikrobiomanalyse erfolgte durch enge Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Pieper aus dem HZI in Braunschweig.

6.2.1 Hohe Ähnlichkeit in der Nicht-metrischen multidimensionalen Skalierung (NMDS)

Mittels nicht-metrischer multidimensionale Skalierung (NMDS) wurde gezeigt, wie sich die Proben zu den unterschiedlichen Abnahmezeitpunkten zueinander darstellen. Die NMDS der Stichproben unter Verwendung ihrer Bray-Curtis-Dissimilaritätsabstände zeigte eine ähnliche Beziehung zwischen den Stichproben. Die Abbildung 25 zeigt eine räumliche Darstellung in Form einer multidimensionalen Skalierung für die Darstellung der Abstände zwischen den verschiedenen Patientenproben. In der Abbildung ist zu erkennen, dass die drei Proben eines Patienten eine große Ähnlichkeit zueinander haben.

Insgesamt zeigten sich somit keine Veränderungen der Proben durch die Einnahme von OMNi-BiOTiC® 10.

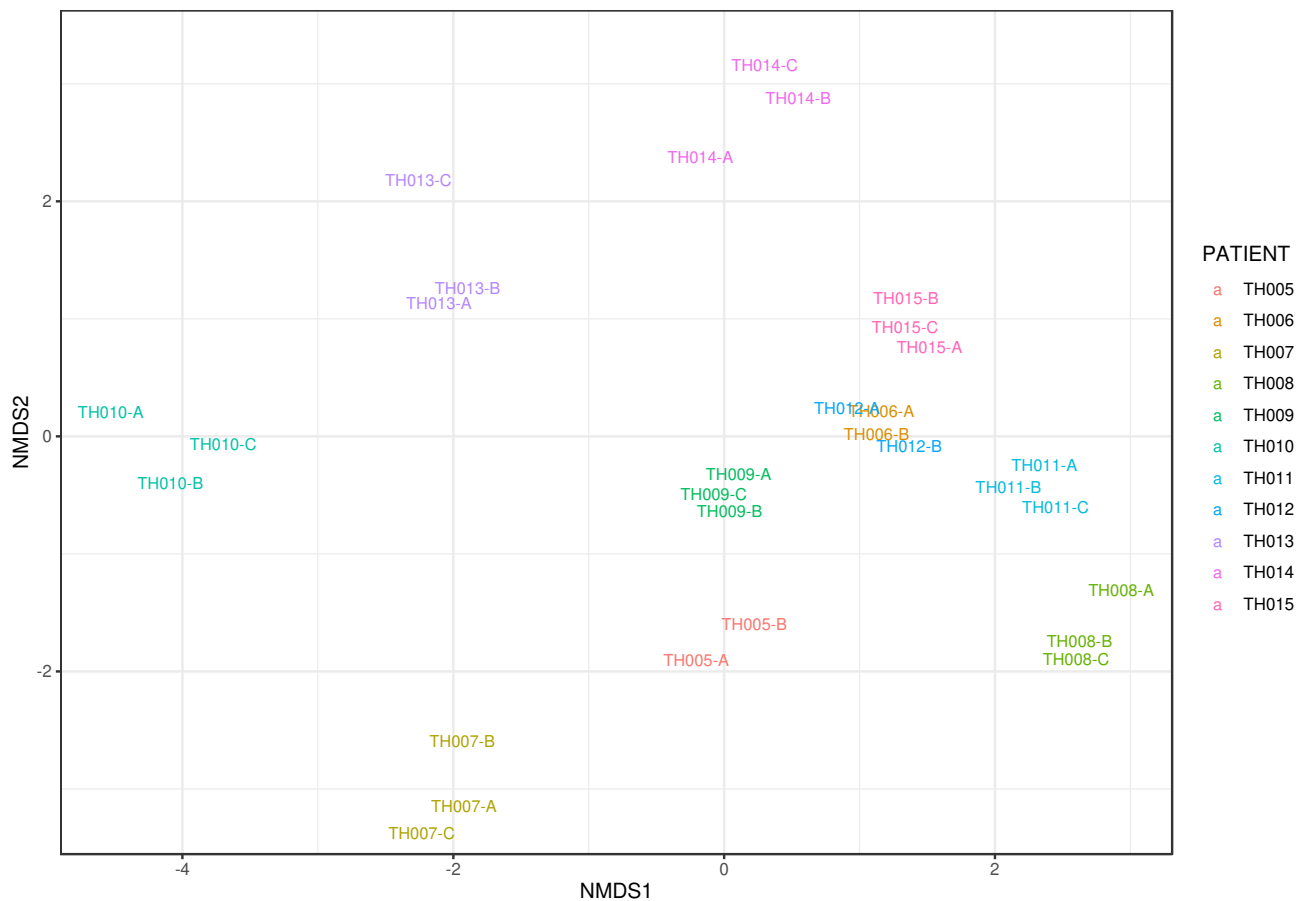


Abbildung 25: Mikrobiomanalyse mittels nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS)

Diese Abbildung zeigte die Ähnlichkeit der Patientenprobe mittels NMDS. Die Patientenproben mit den unterschiedlichen Abnahmezeitpunkten (A- vor Probiotika-Einnahme, B- nach der 3-wöchigen Probiotika-Einnahme, C- 3 Monate nach der Probiotika-Einnahme) zeigen sich alle auf einer ähnlichen Position und haben somit eine große Ähnlichkeit.

6.2.2 Keine Unterschiede in der Analyse der Stämme von OMNi-BiOTiC® im Vorher-Nachher-Vergleich der Probiotika-Einnahme

Spezies/Probe	THI7006 A	THI7006 B	THI7006 C	THI7007 A	THI7007 B	THI7007 C	THI7008 A	THI7008 B	THI7008 C	THI7009 A	THI7009 B	THI7009 C	THI7010 A	THI7010 B	THI7010 C
<i>Bifidobacterium longum</i>	0,126	0,085	-	0	0	0,266	0,197	0,185	0,04	1,228	1,526	2,689	0	0	0
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	0	0	-	0	0,095	0	0	0	0	0	0	0	0	0,006	0,017
<i>Bifidobacterium animalis</i>	0	0	-	0	0,147	0	0	0,02	0	0	0	0,027	0	0	0
<i>Ligilactobacillus salivarius</i>	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0,067	0	0	0	0	0
<i>Lactocaseibacillus casei/paracasei</i>	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecium</i>	0	0	-	0,148	0	0,537	0,104	0,09	0,126	0	0	0	0	0	0

Spezie/Probe	TH17011 A	TH17011 B	TH17011 C	TH17012 A	TH17012 B	TH17012 C	TH17013 A	TH17013 B	TH17013 C	TH17014 A	TH17014 B	TH17014 C	TH17015 A	TH17015 B	TH17015 C
<i>Bifidobacterium longum</i>	0,778	0,845	0,229	0,585	0,302	-	0,189	2,309	0,672	0,947	3,647	2,128	0,016	0,019	0
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	0,992	0,279	0,117	0	0	-	0,015	0	0	1,191	7,833	6,442	0,031	0,051	0
<i>Bifidobacterium animalis</i>	0	0,11	0	0	0,184	-	0	0,135	0	0	0	0	0	0,004	0
<i>Ligilactobacillus salivarius</i>	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0,081	0	0,076	0	0	0
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactocaseibacillus casei/paracasei</i>	0,021	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0	0	0	0	0	-	0	0,017	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecium</i>	0	0,021	0	0,476	1,544	-	0	0	0	0,283	0,221	0	0,436	0,889	0,42

Abbildung 26: Übersicht über die in OMNi-BiOTiC® 10 enthaltenen Stämme und ihr Nachweis in den entsprechenden Patienten-Stuhlproben in Prozent.

In dieser Abbildung befinden sich in der linken Spalte die in OMNi-BiOTiC® 10 enthaltenen Stämme. In der oberen Spalte sind die jeweiligen Patientenproben mit den drei unterschiedlichen Abnahmezeitpunkten (A- vor Probiotika-Einnahme, B- nach der 3-wöchigen Probiotika-Einnahme, C- 3 Monate nach der Probiotika-Einnahme) dargestellt. Der Nachweis der Stämme kann in der Tabelle als Prozentwert abgelesen werden. Zwei der Studienteilnehmenden (TH17006 C und TH17012 C) haben nach drei Monaten keine Stuhlprobe abgegeben.

Die Ergebnisse stellen den Nachweis der in OMNi-BiOTiC® 10 enthaltenen Stämme in den Patientenproben dar. In Abbildung 26 sind tabellarisch die OMNi-BiOTiC® 10 Stämme als Prozentwerte für die jeweilige Patientenprobe dargestellt. Die Verfolgung der Spezies (relative Prozentwerte) zeigte, dass *B. longum*, *B. bifidum* und *E. faecium* in einigen Fällen in den Stuhlproben der Patienten vor der Behandlung vorhanden sind (0,01 % - 0,1 %). Diese drei Spezies waren die einzigen, die mit einer Häufigkeit von über 0,5 % nachgewiesen werden konnten. Jedoch wurde nach der Behandlung mit OMNi-BiOTiC® 10 kein nennenswerter Anstieg beobachtet. Jeder Patient wies in den Stuhlproben eine andere Gruppe von omnibiotischen Spezies auf.

Bei der Patientenprobe TH17014 wurde eine Zunahme der Häufigkeit von *B. longum* und *B. bifidum* festgestellt. Allerdings waren diese Arten bereits vor der Behandlung vorhanden.

Die Spezies *Bifidobacterium animalis* wurde vor der Behandlung nicht in den Stuhlproben nachgewiesen. Bei 7 von 11 Patienten war *Bifidobacterium animalis* aber nach der Behandlung in sehr geringer Menge nachweisbar. Es blieb jedoch bei der Kontrolle nach drei Monaten nicht erhalten.

Andere omnibiotische Spezies wurden in den Stuhlproben nur selten nachgewiesen. *L. acidophilus* erschien nach der Behandlung in nur einer Probe.

Insgesamt zeigte die Analyse keine signifikanten Veränderungen in der Zusammensetzung der Mikrobiota, die auf die Verabreichung von OMNi-BiOTiC® 10 zurückgeführt werden könnte. Es ist unwahrscheinlich, dass eine gesundheitliche/physiologische Wirkung auf eine Kolonisierung durch die OMNi-BiOTiC® 10 zurückzuführen ist.

6.3 Die Auswirkung der Probiotika-Therapie auf die Stuhlkonsistenz und Stuhlfrequenz der Studienteilnehmenden

Die Patienten haben für die Dauer der Einnahme von OMNi-BiOTiC® 10 ein Stuhltagebuch geführt. Dabei wurde täglich die Stuhlfrequenz und die Stuhlkonsistenz angegeben. Bei der Stuhlkonsistenz konnte zwischen flüssig, breiig und fest ausgewählt werden. Außerdem gab es eine zusätzliche Spalte für besondere Auffälligkeiten.

Bei der Berechnung der täglichen Stuhlfrequenz zeigte sich eine abnehmende Tendenz im Vergleich der Mittelwerte von Tag 1 und Tag 21. Am ersten Tag zeigten sich die Werte zwischen 0- bis 6-mal täglich (Mittelwert 2,67 und Standardabweichung +- 2,0). An Tag 21 gaben die Patienten zwischen 0 und 5 Stuhlentleerungen mit einem Mittelwert von 1,556 (Standardabweichung +- 1,7) an.

Im statistischen Test mittels Mann-Whitney-U-Test zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Stuhltagebuch.

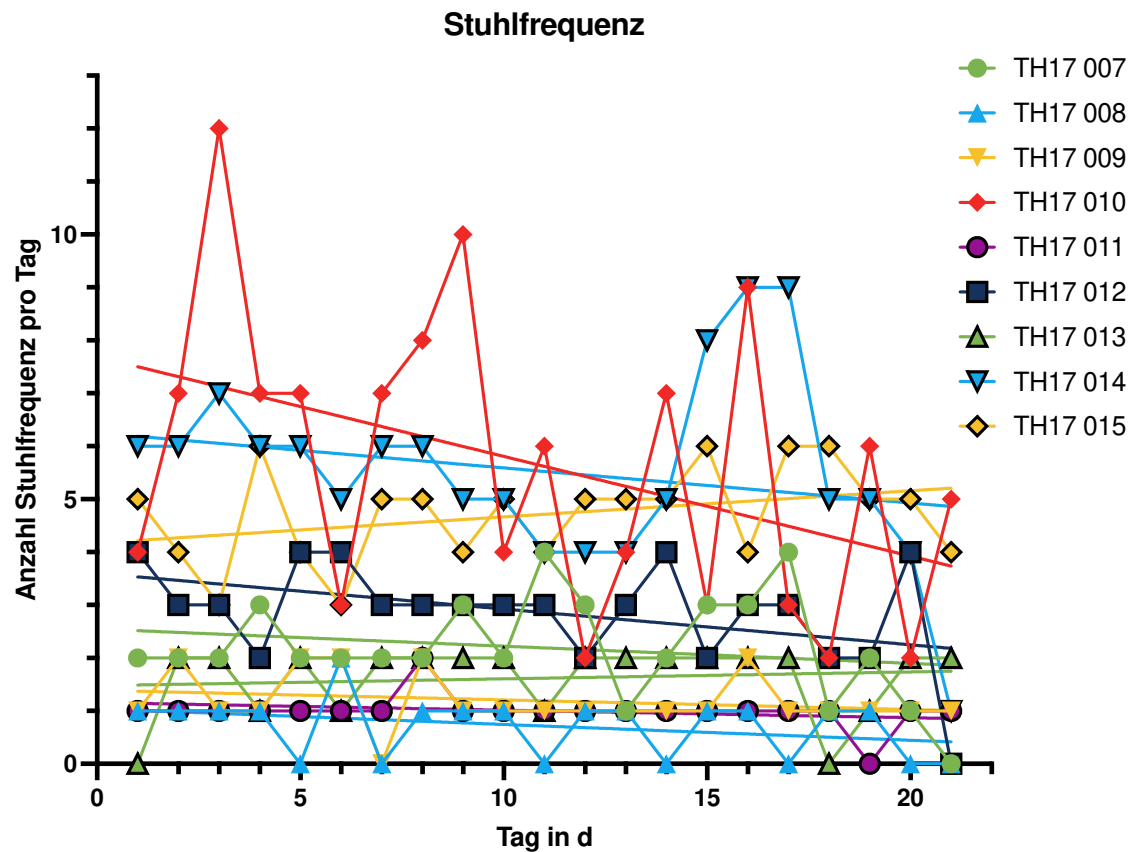


Abbildung 27: Anzahl der täglichen Stuhlfrequenz über die Dauer von 21 Tagen während der Einnahme von OMNi-BiOTiC® 10

In der Abbildung 27 wurde die tägliche Stuhlfrequenz der Patienten über die Dauer von 21 Tagen aufgezeigt. Auf der Y-Achse wurde die Anzahl der Stuhlfrequenz pro Tag dargestellt. Auf der X-Achse wurde der Verlauf über 21 Tage präsentiert. Die verschiedenen Patientenproben sind mit unterschiedlichen Farben markiert (siehe Legende). Dabei ist zu erwähnen, dass ein Proband kein Stuhltagebuch abgegeben hat. Somit sind in der Grafik nur neun von den insgesamt zehn Patienten aufgeführt. n=9.

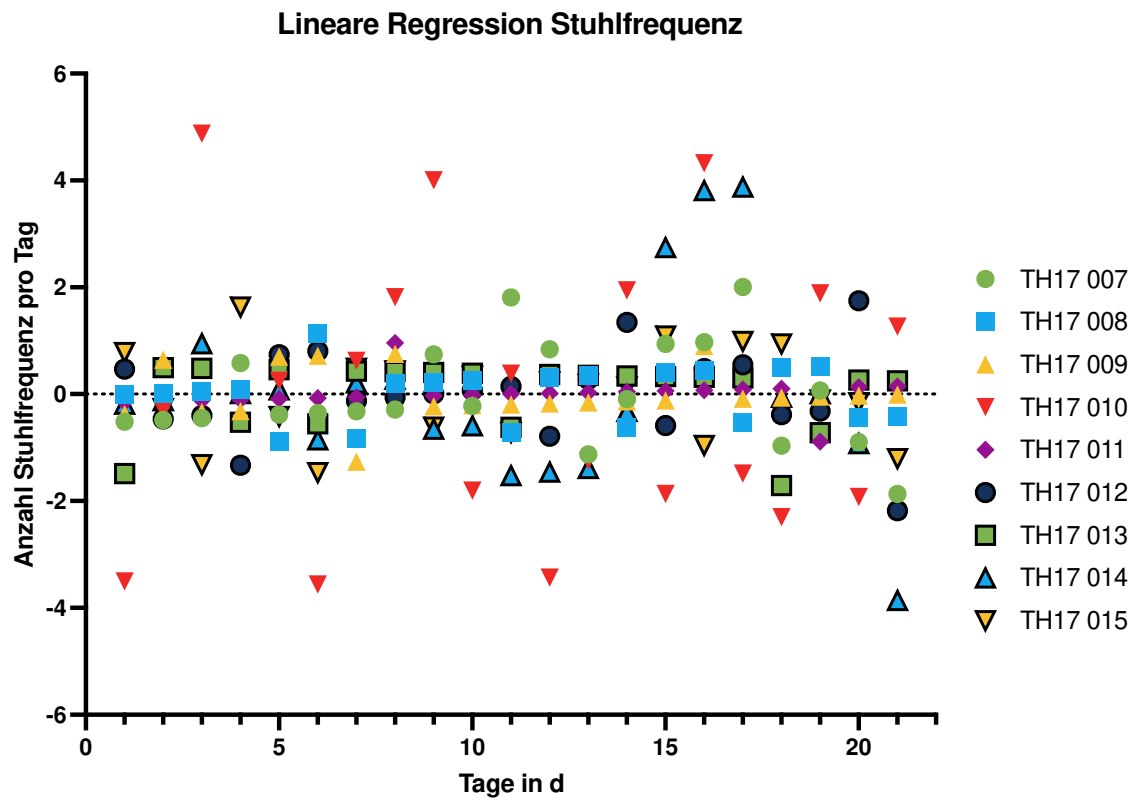


Abbildung 28: Die lineare Regression für die Anzahl der täglichen Stuhlfrequenz über die Dauer von 21 Tagen während der Einnahme von OMNi-BiOTiC® 10

In der Abbildung 28 wurde die lineare Regression für die tägliche Stuhlfrequenz der Patienten über die Dauer von 21 Tagen aufgezeigt. Auf der Y-Achse wurde die Anzahl der Stuhlfrequenz pro Tag dargestellt. Auf der X-Achse wurde der Verlauf über 21 Tage dargestellt. Die verschiedenen Patientenproben sind mit unterschiedlichen Farben markiert (siehe Legende). Die gestrichelte Linie stellt die lineare Regression dar. n=9.

7. Diskussion

7.1 Zytokine

Unter physiologischen Bedingungen hat IL-17 u.a. eine wichtige Bedeutung bei entzündlichen Prozessen. Dabei vermitteln TH17-Zellen neben anderen Funktionen die Proliferation und Reifung von Lymphozyten, Makrophagen und Neutrophilen. Eine überschießende Vermehrung von TH17-Zellen, z.B. bei einer Dysregulation des Immunsystems, kann eine pathologische entzündliche Immunreaktion erzeugen und somit die Entwicklung verschiedener Autoimmunkrankheiten oder chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. CED, befördern (Jiang *et al.* 2022).

In einer bahnbrechenden Studie von Wilck *et al.* wurde im Tiermodell gezeigt, dass durch eine Substitution von *Lactobacillus murinus* eine TH17-Zellaktivierung reduziert werden kann (Wilck *et al.* 2017). Vor diesem Hintergrund sollte überprüft werden, ob durch das Laktobazillen-reiche Probiotikum OMNi-BiOTiC® 10 bei Patienten mit MC in Remission die Häufigkeit IL-17 produzierender Zellen in der Zirkulation beeinflusst werden kann.

Entgegen der Hypothese zeigten die Ergebnisse dieser Untersuchung keine signifikanten Unterschiede in der Gruppe IL-17 positiver Zellen aus PBMCs nach der Einnahme von Laktobazillen.

In einer Studie von Safari *et al.* wurde der Zusammenhang zwischen IL-17 und CED betrachtet. Dabei wurde untersucht, ob die Genexpression der IL-17-Familie zur Früherkennung subklinischer Entzündungen bei CED-Patienten geeignet ist. Dafür wurden CED-Patienten in eine aktive und inaktive Gruppe eingeteilt. Anschließend wurde die mRNA-Expression von IL-17F und IL-17B untersucht. Insgesamt ergab die Analyse keinen signifikanten Unterschied zwischen den aktiven und inaktiven CED-Patienten. Laut dieser Studie eignen sich IL17-B und IL-17F nicht als Frühmarker einer entzündlichen Reaktion bei CED-Patienten (Safari *et al.* 2017).

Jedoch zeigen andere Studie wie die von Calderón-Gómez *et al.*, dass ein Zusammenhang zwischen T-Zellen und MC besteht. Hier wurde die Antigenspezifität von T-Zellen bei Patienten mit MC untersucht. Dafür wurden PBMCs von MC-Patienten und gesunden Patienten isoliert und die Auswirkung der T-Zell-Reaktivität auf die mikrobiellen Antigene analysiert. Ein größerer Anteil von MC-Patienten hat einen höheren Anteil an spezifischen T-Zellen. Diese Zellen können die Entzündung bei MC-Patienten beeinflussen und für die Behandlung von MC entscheidend sein. Die Ergebnisse dieser

klinischen Studien unterstreichen die wichtige Rolle von IL-17 bei CED-Patienten (Calderón-Gómez *et al.* 2016).

Zwei Erklärungsansätze für die nicht signifikanten Ergebnisse dieser Arbeit bieten sich an. Zum einen waren die Patienten in einer klinischen Remission und somit könnte der Gehalt an IL-17 positiven Zellen in der Darmmukosa normal sein. Parallele Analysen zur Expression von IL-17 im Darm bei diesen Patienten liegen nicht vor. Zum anderen müssen die zirkulierenden Zellen im peripheren Blut nicht zwangsläufig Veränderungen im Darm bei entzündlichem Prozess widerspiegeln.

Auf die Analyse von Darmbiopsien konzentrierte sich die Studie von Rovedatti *et al.* Dort wurden aus entzündlicher Mukosa Darmbiopsien in-vitro kultiviert. Es zeigte sich im Vergleich zu Proben aus nicht- entzündlicher Mukosa und zu Kontrollen mit gesunder Mukosa eine erhöhte Konzentration von IL-17 bei den Proben von CED-Patienten. Somit wurde aufgezeigt, dass in der entzündlich-veränderten Mukosa von Patienten mit CED eine vermehrte Produktion von IL-17 nachgewiesen werden kann (Rovedatti *et al.* 2009). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die entzündlich veränderte Schleimhaut bei Patienten mit MC eine pathologische Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung aufweist und es einen Zusammenhang mit dem Schweregrad der Krankheitsaktivität gibt. Unter anderem wurde in der Studie von Ma *et al.* die Kausalität zwischen der intestinalen bakteriellen Zusammensetzung und dem Ausmaß der Entzündung untersucht. Dafür wurden fäkale Proben von Patienten mit MC und gesunden Patienten gesammelt und analysiert. Es wurde festgestellt, dass die Häufigkeit von IFN- γ und IL-17 exprimierenden CD4-T-Zellen nach der Stimulation mit Bakterien von MC-Patienten signifikant höher war als nach der Stimulation mit der gesunden Probe. Außerdem nahm die Expression von IL-4 und IL-10 exprimierenden CD-4-T-Zellen bei Bakterien eines MC erkrankten Patienten signifikant ab. Insgesamt konnte die Studie von Ma *et al.* zeigen, dass die intestinalen Bakterien von MC-Patienten die TH/TH17-Entzündung beeinflussen. (Ma *et al.* 2017). In zukünftigen Studien könnten neben der Entnahme von PBMCs aus Blutproben zusätzlich Darmbiopsien analysiert werden; der invasive Charakter der Studien ist aufgrund der dafür notwendigen Endoskopien mit Gewebeentnahme aber ungleich höher. Möglicherweise erlauben die Charakterisierung von Darmbiopsien genauere Ergebnisse, da die Zellen im lokalen entzündlichen Gewebe einer anderen Regulation unterliegen als im Blut.

Zusätzlich ist in den oben beschriebenen Arbeiten (Calderón-Gómez *et al.* 2016, Ma *et al.* 2017, Rovedatti *et al.* 2009) ein weiterer wichtiger Aspekt beschrieben, der darauf hinweist, dass in den Untersuchungen mit einer Kontrollgruppe gearbeitet wurde. Diese

Gruppe erlaubt eine bessere Aussagekraft, da durch die Kontrollgruppe Referenzwerte entstehen. Somit entwickelt sich eine höhere Validität der Ergebnisse und bietet einen Vorteil gegenüber dieser Studie.

Im ersten Studiendesign dieser Arbeit war die Analyse von IL-17 positiven Zellen geplant. Bei der Durchführung wurde das Zytokin-Panel erweitert, um eine umfangreichere Analyse zu erhalten. Es wurden folgende Zytokine ergänzt: TNF- α , GM-CSF, IFN- γ , IL-4, IL9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21 und IL-22. Diese Zytokine sind relevant für die Modulation des Immunsystems bei der Bewältigung von Erkrankungen und im Zusammenspiel mit TH17-Zellen. Insgesamt zeigte sich bei den Ergebnissen der Studie kein einheitliches Bild der Zytokinausschüttung. Eine mögliche Erklärung ist, dass eine unselektive supramaximale Stimulierung durchgeführt wurde. Jedoch wiesen folgende Zytokine aus den vorliegenden Untersuchungen signifikante Ergebnisse im Vorher-Nachher-Vergleich auf:

- Anstieg von IFN- γ MFI – Population CD3⁺CD4⁻CD161⁺
- Abnahme von IL-10 in Prozent – Population CD3⁺CD4⁺CD16⁻
- Abnahme von IL-10 in Prozent – Population CD3⁺CD4⁻CD16⁺
- Abnahme von IL-10 in Prozent – Population CD20⁺CD3⁻CD14⁻
- Abnahme von IL-13 in Prozent – Population CD20⁺CD3⁻CD14⁻

Da die Stichprobenmenge sehr klein ist, werden die signifikanten Ergebnisse als Trend gedeutet. Die Erhöhung der Stichprobenmenge würde eine höhere Aussagekraft haben und verlässlichere Aussagen liefern. Wie oben bereits beschrieben ergab die Studie von Ma *et al.* den Nachweis, dass IL-10 und IFN- γ Einfluss auf die TH/TH17-Entzündungen bei Patienten mit MC haben.

IL-10 ist ein vielseitiges Zytokin mit entzündungshemmenden Eigenschaften. Das Zytokin reguliert die Funktion verschiedener Immunzellen, besonders vermindert es in Monozyten und Makrophagen die Produktion von Entzündungsmediatoren. In Monozyten/Makrophagen vermittelt IL-10 dabei drei wichtige Aufgaben: die Freisetzung von Immunmediatoren, die Antigenpräsentation und die Phagozytose. Zusätzlich hemmt IL-10 die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren aus Monozyten/Makrophagen und hemmt die Lipopolysaccharide (LPS)- und IFN- γ -induzierte Sekretion von TNF- α , IL-1b, IL-6, IL-8, G-CSF und GM-CSF. Des Weiteren steigert es die Freisetzung entzündungshemmender Mediatoren wie IL-1-Rezeptor-Antagonisten und löslichen TNF- α Rezeptoren (Sabat *et al.* 2010). Somit ist IL-10 ein

entzündungshemmendes Zytokin und nimmt in dieser Studie bei Morbus Crohn Patienten ab, das spricht für die hohen Entzündungsmarker bei eben diesen Patienten.

Ein weiteres wichtiges Zytokin ist IFN- γ , welches in den Ergebnissen von der Population CD3⁺CD4⁺CD161⁺ einen interessanten Anstieg der Ergebnisse lieferte. Dieses zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen und besitzt eine weitreichende zelluläre Funktion (McLaren *et al.* 2009). IFN- γ kann bei schädlichen Entzündungen vor allem bei TH1-assoziierten Autoimmunkrankheiten entgegenwirken. Die wichtigste Funktion ist die Rekrutierung von Makrophagen und die regulatorische Beteiligung bei TH1-Reaktionen. Zudem wurde in der Literatur IFN- γ sowohl mit entzündungsfördernden und entzündungshemmenden Eigenschaften charakterisiert. In der Arbeit von McLaren *et al.* wurden diese beiden gegensätzlichen Eigenschaften mit nachweislichem Einfluss bei Atherosklerose beschrieben (McLaren *et al.* 2009). Diese Studie zeigt die Vielfältigkeit und Wichtigkeit dieses Zytokins. Dies bestätigt auch die Arbeit von Kelchtermans *et al.* Dort wird beschrieben, dass IFN- γ eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von TH17-Zellen einnimmt. Dabei hemmt IFN- γ die Entwicklung von TH17-Zellen aus naiven Vorläuferzellen (Kelchtermans *et al.* 2008). Dies stellt eine Verbindung zu dieser Studie dar, dass IFN- γ durch seinen Einfluss auf TH17-Zellen eine mögliche Auswirkung auf den Anstieg der IFN- γ Werte nach der Einnahme von OMNi-BiOTiC® 10 haben könnte. Das dritte Zytokin welches in dieser Studie eine signifikante Änderung aufwies war IL-13, welches von TH-Zellen Typ 2 produziert wird. Das Zytokin ist assoziiert mit verschiedenen Krankheiten wie z.B. Asthma, Allergien und der Inhibierung von Autoimmunkrankheiten. Es wird beschrieben, dass IL-13 die Hypersensitivität der Atemwege, die Hypersekretion von Mukus und die TH-2 vermittelte Entzündung im Darm reguliert (Kelly-Welch *et al.* 2003). IL-13 zeigte in diesen Untersuchungen eine signifikante Veränderung nach der Probiotika-Einnahme, was aufgrund seiner eben beschriebenen Wirkung auf Entzündungsprozesse im Darm zurückzuführen ist. Hauptsächlich wird IL-13 in der Literatur als zentraler Regulator bei der Pathogenese von Asthma beschrieben. Dabei sind die wichtigsten Funktionen von IL-13 die Steigerung der Differenzierung von Becherzellen, Aktivierung von Fibroblasten, Erhöhung der bronchialen Hyperreaktivität und die Umstellung der B-Zell-Antikörperproduktion von Immunglobulin M (IgM) auf Immunglobulin (IgE). Darüber hinaus sind bereits therapeutische Ansätze mit einer Antikörper-Therapie über IL-13 (Lebrikizumab) entstanden (Corren 2013).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass in dieser Studie die Einnahme von OMNi-BiOTiC® 10 einen Einfluss auf die Zytokine IL-10, IL-13 und IFN- γ bei Patienten

mit MC hat. Insgesamt sollten die Ergebnisse kritisch betrachtet werden, da die Studie nur einen Trend nachweist.

7.2 Mikrobiom

In der vorliegenden Studie wurde die Hypothese geprüft, ob die Einnahme von Laktobazillen das gastrointestinale Mikrobiom bei Patienten mit MC in Remission verändert. Dabei wurden täglich drei Beutel der Laktobazillen in Form von OMNi-BiOTiC® 10 für drei Wochen eingenommen. In der Arbeit von Kienesberger *et al.* wurde das Nahrungsergänzungsmittel OMNi-BiOTiC® 10 charakterisiert und in einem Mausmodell untersucht. Dabei konnten positive Effekte aufgezeigt werden, beispielsweise die Förderung des Wachstums von nützlichen Bakterien. Gleichzeitig wird darauf verwiesen, dass zukünftige Studien weitere Untersuchungen und Analysen am gesunden Menschen und bei Krankheiten untersucht werden sollen (Kienesberger *et al.* 2022). Die Untersuchungen des Mikrobioms in dieser Arbeit zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede vor und nach der Probiotika-Einnahme auf. Somit konnte unsere oben beschriebene Hypothese nicht belegt werden.

Ein Erklärungsansatz könnte sein, dass der Einnahmezeitraum von OMNi-BiOTiC® 10 zu kurz war und/oder die Probiotika-Dosierung zu niedrig angesetzt war. Zusätzlich sollte die Compliance der Patienten kritisch betrachtet werden. Die Patienten haben die OMNi-BiOTiC® 10 Beutel für 21 Tage bei der ersten Blutentnahme bekommen und wurden aufgefordert, diese selbständig nach vorgegebenem Schema einzunehmen. Dabei wurden keine Kontrollen durchgeführt, ob die Einnahme vollständig nach dem vorgegebenen Plan umgesetzt wurde.

Darüber hinaus sollten externe Faktoren, die mögliche Einflüsse auf das intestinale Mikrobiom haben, mitberücksichtigt werden. Dazu zählt die Ernährung der Patienten, die anhand des Ernährungstagebuches dokumentiert wurde. Aufgrund der großen Datenmenge dieser Arbeit wurden diese Angaben nicht statistisch ausgewertet. Außerdem haben die Patienten keine einheitliche Ernährungsstrategie für den Einnahmezeitraum von OMNi-BiOTiC® 10 erhalten. Jedoch sollte die Ernährung einen hohen Stellenwert bei solchen Studien haben, da die Ernährung einen wesentlichen Einfluss auf die Zusammensetzung des Mikrobioms hat. Die mikrobielle Besiedlung beginnt bereits weit vor der Geburt, da die mikrobielle Flora des Fruchtwassers, der Plazenta und des mütterlichen Darms die pränatale Mikrobiota unterstützen (Indrio *et al.* 2017). Pränatale und postnatale Faktoren sind für die Modulation des gastrointestinales Mikrobioms entscheidend und werden im Laufe der Entwicklung durch die Ernährung

weiter beeinflusst. Bereits wenige Tage nach einer Umstellung der Ernährungsgewohnheiten kann sich die Zusammensetzung des Darmmikrobioms verändern (Bosch 2022).

Ebenfalls wurde in der bereits oben beschriebenen Arbeit von Wilck *et al.* eine explorative Pilotstudie an gesunden männlichen Probanden gestartet. Hintergrund ist, dass in der westlichen Gesellschaft die Ernährung mit einer hohen Salzzufuhr verbunden ist. Das kann die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen fördern. Deswegen haben die Studienteilnehmenden für 14 Tage vermehrt Salz mit der Ernährung zu sich genommen. Die Ergebnisse zeigen, dass eine hohe Salzbelastung bei den gesunden Probanden zu einem Anstieg des Blutdruckes und der TH17-Zellen, sowie zu einer Reduktion der *Lactobacillus* im Darm führt. Insgesamt ist die Aussagekraft der Studie begrenzt aufgrund der wenigen Teilnehmer. Interessanterweise weisen Neugeborene die größte *Lactobacillus*- Häufigkeit auf, die mit der Zeit abnimmt. Eine weitere Theorie der Studie ist, dass eine erhöhte Salzzufuhr in jungen Jahren bereits zu einem Verlust von *Laktobazillen* im Mikrobiom führt und möglicherweise die Entwicklung von arterieller Hypertonie und Autoimmunerkrankungen begünstigt.

In der vorliegenden Arbeit nahmen die Patienten über 21 Tagen OMNi-BiOTiC® 10 zu sich und hielten keine spezielle Diät ein. Insbesondere wurde der Salzkonsum nicht problematisiert. Dieses könnte beispielsweise ein Ansatzpunkt für weitere Studien sein, bei der die Probanden eine spezielle salzarme Diät durchführen und parallel ein Probiotikum einnehmen.

Zudem können genetische Veranlagungen, Infektionen, Veränderungen in der Ernährung und die Einnahme von Antibiotika eine mikrobiotische Dysbiose verursachen. Es gibt auch Wirkstoffe, wie z.B. Medikamente, die die Magensäure unterdrücken oder Krebsmedikamente, die einen Einfluss auf das gastrointestinale Mikrobiota haben (Honda und Littman 2016).

Des Weiteren konnte bei einer Vielzahl anderer Erkrankungen bereits ein gestörtes Gleichgewicht der gastrointestinalen Mikrobiota festgestellt werden. Das metabolische Syndrom mit Adipositas und Diabetes Typ 2 führt zu einer chronischen Entzündung und einer erhöhten Expression von PRRs im Fettgewebe, Muskelgewebe und in den zirkulierenden Monozyten. Dies beeinflusst die mikrobielle Zusammensetzung des Darms und kann ebenfalls zu einer mikrobiotischen Dysbiose führen (Thaiss *et al.* 2016). In einer anderen Studie wurde die fäkale Mikrobiota von Patienten mit Rheumatoider Arthritis untersucht. Dort wurde ein erhöhter Nachweis von *Prevotella copri* gefunden (Scher *et al.* 2013). *Prevotella copri* zählt nicht zu den häufig vorkommenden Vertretern

einer gesunden Darmflora. Dort dominieren die Vertreter der Phyla *Bacteroidetes* und *Firmicutes*, gefolgt von *Actinobacteria* und *Proteobacteria* (MetaHIT Consortium *et al.* 2010).

Diese Studien weisen darauf hin, dass andere externe Einflussfaktoren entscheidend für die Zusammensetzung der gastrointestinalen Mikrobiota sind. In dieser Studie wurden vor Beginn Patienten mit einer Medikamenteneinnahme von Biologika, Steroiden und Azathioprin ausgeschlossen. Andere oben genannte Faktoren wurden nicht berücksichtigt, wie weitere Vorerkrankungen oder die Einnahme anderer Medikamente. Dies könnte ein weiterer Ansatzpunkt sein, diese Aspekte in weiteren Studien mit einfließen zu lassen.

7.3 Stuhltagebuch

Während der Einnahme von OMNi-BiOTiC® 10 über drei Wochen haben die Patienten ein Tagebuch über die Stuhlfrequenz und -konsistenz geführt. Insgesamt sollten die Ergebnisse vom Stuhltagebuch kritisch betrachtet werden, da die Dokumentation individuell und subjektiv ist. Jeder Patient interpretiert seine Stuhlkonsistenz anders oder ist beim Ausfüllen des Tagebuches mehr oder weniger konsequent. Jedoch konnten die Daten für einen Patienten über die Dauer von 3 Wochen individuell verglichen werden. In der Studie von Vasilev *et al.* wurde die Wirkung von OMNi-BiOTiC® 10 auf die Intensität des Durchfalls bei Patienten mit akuter infektiöser Diarrhö untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass nach den ersten Tagen der Behandlung die Stuhlgangfrequenz reduziert und die Stuhlkonsistenz verbessert wurde (Vasilev *et al.* 2017).

Eine weitere Arbeit hat sich mit der Fragestellung beschäftigt, ob Probiotika zur Vorbeugung von Antibiotika-assoziierten Diarrhö (AAD) führt. Dabei wurden Patienten in Pflegeheimen in die Studie eingeschlossen. Zu Beginn der Antibiotikabehandlung wurde zusätzlich mit dem Probiotika begonnen. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von Probiotika die Episoden von AAD deutlich geringer waren als ohne Probiotika. Diese Studie zeigte, dass der Einsatz von Probiotika zur Prävention von AAD genutzt werden kann (van Wietmarschen *et al.* 2020).

Die beiden Studien zeigen, dass durch die Probiotika-Einnahme die Stuhlfrequenz reduziert werden kann. Möglicherweise sind die Veränderungen in den Mittelwerten im Vergleich von Tag 1 und 21 auf die Behandlung mit OMNi-BiOTiC® 10 zurückzuführen. Somit könnten die Ergebnisse als ähnlicher Trend wie bei den anderen beiden Studien gedeutet werden.

Ein anderer Erklärungsansatz für die nicht signifikanten Ergebnisse dieser Arbeit könnte sein, dass in der Studie von Vasilev *et al.* eine Erkrankung im akuten Stadium mit Laktobazillen behandelt wurde und dort größere Effekte sichtbar waren. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Studie MC in Remission mit Laktobazillen behandelt und möglicherweise sind dadurch keine großen Effekte in den Ergebnissen ersichtlich.

7.4 Limitationen

7.4.1 Auswahl Patienten

Die Patienten, die an der Studie teilgenommen haben, waren zwischen 41 und 77 Jahre alt. Bei den Studienteilnehmenden musste ein Mindestalter von 18 Jahren und die gesicherte Diagnose MC in Remission vorliegen. Ausschlusskriterien für diese Studie waren die Einnahme von Biologika, Steroiden und Azathioprin. Die meisten Patienten, die einen gesicherten MC haben, sind bereits medikamentös eingestellt. Somit war es schwierig eine große Patientengruppe zu rekrutieren, die an einem gesicherten MC erkrankt ist und nicht bereits mit den oben genannten Medikamenten therapiert wird. Für die Patientenrekrutierung wurde die Datenbank der KIM IV des Universitätsklinikum Jena unter den oben genannten Ein- und Ausschlusskriterien durchsucht. Insgesamt nahmen 10 Patienten an der Studie teil. Die rekrutierte Patientenzahl ist sehr klein und war durch die oben genannten Ein- und Ausschlusskriterien schwierig zu erhöhen. Zukünftige Studien sollten eine größere Personengruppe rekrutieren. Dies könnte erreicht werden indem z.B. andere Kliniken mit einbezogen werden.

7.4.2 Methoden

Eine andere Überlegung deutet darauf hin, dass durch das Einfrieren der Zellen bis auf -196 Grad in Stickstoff die Zellen zu stark beschädigt wurden. Wie im Methodenteil bereits beschrieben (Tabelle 8) zeigten die Proben ähnliche Mittelwerte vor und nach der Probiotika-Einnahme. Demzufolge wurden beide Proben gleich und parallel behandelt. Die Ergebnisse sollten zuverlässig und aussagekräftig sein, da die Zellen in beiden Proben einen gleichen Mittelwert an lebenden Zellen beinhalten und im Mittelwert über 80 % waren. Lediglich der Zustand der lebenden Zellen kann nicht beurteilt werden, da dies in der vorliegenden Studie nicht untersucht wurde.

Für die durchflusszytometrische Bestimmung intrazellulärer Zytokine wurde IM und PMA zur Aktivierung der T-Zellen genutzt. Dieser Schritt war wichtig für den Nachweis der Zytokine, weil unstimulierte T-Zellen aus dem peripheren Blut spontan wenig bis gar

keine Zytokine produzieren. Jedoch führt die Stimulierung mit diesen Substanzen zu einer Veränderung der Zellmorphologie und der Membranexpression von CD4. Dies kann dazu führen, dass Zellen absterben. Bei der durchflusszytometrischen Zytokinmessung können abgestorbene Zellen Artefakte verursachen. Diesen Effekt kann man umgehen, indem man beispielsweise eine andere Substanz zur Stimulation einsetzt, z.B. Phytohemagglutinin (PHA). PHA bewirkt keine Herabregulierung der Oberflächenmarker und verursacht keine Veränderungen in der durchflusszytometrischen Analyse. Außerdem stimuliert PHA TNF- β und IL-10, was in dieser Studie bei PMA und Ionomycin nicht beobachtet wurde (Baran *et al.* 2001). Durch die starke Wirkung von PMA und Ionomycin auf die Zellen, ist zu überlegen bei den nächsten Untersuchungen eine schonendere Substanz für die Bestimmung intrazellulärer Zytokine zu verwenden.

Eine weitere Limitation der Arbeit könnte sein, dass der Einnahmezeitraum von OMNi-BiOTiC® 10 über drei Wochen zu kurz war. Dadurch kam es möglicherweise zu keinem nachweisbaren Effekt auf die Immunzellen. Die Angaben vom Hersteller zur Einnahme von OMNi-BiOTiC® 10 beinhalten die Empfehlung zur zweimal täglichen Einnahme eines Beutels für die gesamte Dauer der Antibiotika-Therapie (Beipackzettel siehe Anhang). Nach Beendigung der Antibiotika-Therapie sollte die Einnahme auf einmal täglich für zwei weitere Wochen reduziert werden. In der vorliegenden Studie ist die tägliche Dosierung (3-mal täglich) höher als vom Hersteller empfohlen. Auch dürfte der Zeitraum mit 21 Tagen etwa der oben genannten Empfehlung entsprechen.

7.5 Ausblick

Die Gruppe der IL-17 Zytokine sollte weiterhin einen hohen Stellenwert in der aktuellen Forschung haben, da die vorher beschriebenen Arbeiten darauf hinweisen, dass Effekte bei autoimmunen Krankheiten oder Prozessen zu beobachten sind. Für aussagekräftigere Ergebnisse sollten für zukünftige Studien andere Aspekte mitberücksichtigt werden, wie beispielsweise eine höhere Patientenrekrutierung, eine Kontrollgruppe, Veränderung der Einnahme der Laktobazillen oder eine spezielle Ernährungsdiät. Dies könnte weitere Informationen im Zusammenhang von IL-17 und MC liefern. Außerdem gibt es vielfältige Verbindungen von anderen Zytokinen in Verbindung mit TH17 positiven Zellen, die noch nicht ausreichend untersucht sind. IL-6, IL-21, IL-23 und TGF- β sind Beispiele für Zytokine, die Einfluss auf die Differenzierungsschritte haben (Bettelli *et al.* 2008, Bettelli *et al.* 2007). Das wurde bereits in der Einleitung genauer beschrieben (siehe

Abbildung 2). Deswegen sollten diese ebenfalls einen wichtigen Stellenwert in weiteren Forschungsarbeiten haben.

Ein wichtiger Ansatz für weitere Studien vor allem bei CED sollte das Wechselspiel von pro- und antiinflammatorischen Zellen und dem gastrointestinalen Mikrobiom darstellen, da dies einen starken Einfluss auf das immunologische Gleichgewicht haben könnte.

8. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Baran J et al. 2001. Three-Color Flow Cytometry Detection of Intracellular Cytokines in Peripheral Blood Mononuclear Cells: Comparative Analysis of Phorbol Myristate Acetate-Ionomycin and Phytohemagglutinin Stimulation. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(2): 303–13.
- Baumgart DC, Sandborn WJ. 2012. Crohn's Disease. *The Lancet*, 380(9853): 1590–1605.
- Becker C, Markus FN, Wirtz S. 2015. The Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *ILAR Journal*, 56(2): 192-204.
- Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. 2007. Th17: The Third Member of the Effector T Cell Trilogy. *Current Opinion in Immunology*, 19(6): 652–57.
- Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. 2007. TH-17 Cells in the Circle of Immunity and Autoimmunity. *Nature Immunology*, 8(4): 345–50.
- Bettelli E et al. 2008. Induction and Effector Functions of TH17 Cells. *Nature*, 453(7198): 1051–57.
- Bosch TCG. 2022. Die Unentbehrlichen - Mikroben, des Körpers verborgene Helfer: Warum sind so viele Menschen krank? Antworten aus der Mikrobiomforschung. *Springer Berlin Heidelberg*, Seite 139-142. <https://link.springer.com/10.1007/978-3-662-65083-7> (6. Februar 2023).
- Borchers AT et al. 2009. Probiotics and Immunity. *Journal of Gastroenterology*, 44(1): 26–46.
- Braun et al. 2018. Basislehrbuch Innere Medizin. Sechste Aufl. München: *Elsevier*, ISBN 978-3-437-41115-1, 551-559.
- Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz. 2004. Bedeutung von Zytokinbestimmungen in der umweltmedizinischen Praxis: Mitteilung der Kommission, Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin. 47(1): 73–79.
- Calderón-Gómez E et al. 2016. Commensal-Specific CD4⁺ Cells From Patients With Crohn's Disease Have a T-Helper 17 Inflammatory Profile. *Gastroenterology*, 151(3): 489-500.e3.
- Chardin P, McCormick F. 1999. Brefeldin A: The Advantage of Being Uncompetitive. *Cell*, Vol. 97, 153–155.
- Chen L et al. 2015. Lactobacillus Acidophilus Suppresses Colitis-Associated Activation of the IL 23/Th17 Axis. *Journal of Immunology Research*, 2015: 1–10.
- Corren J. 2013. Role of Interleukin-13 in Asthma. *Current Allergy and Asthma Reports*, 13(5): 415–20.

- Cosmi L et al. 2008. Human Interleukin 17–Producing Cells Originate from a CD161+CD4+ T Cell Precursor. *Journal of Experimental Medicine*, 205(8): 1903–16.
- Cremonini F et al. 2002. Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic associated diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther*, 16(8): 1461–1467.
- Damascena HL et al. 2022. Neutrophil Activated by the Famous and Potent PMA (Phorbol Myristate Acetate). *Cells*, 11(18): 2889.
- Doron S, Gorbach SL. 2006. Probiotics: Their Role in the Treatment and Prevention of Disease. *Expert Rev. Anti Infect, Ther.*: 15.
- D’Souza AL et al. 2002. Probiotics in Prevention of Antibiotic Associated Diarrhoea: Meta-Analysis. *BMJ*, 324(7350): 1361–1361.
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf (18. November 2020).
- Fischer S, Rath T, Neurath MF. 2018. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen: Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. *Der Internist*, 59(7): 681–93.
- Friedrich A. 2020. Ratgeber Multiple Sklerose: Antworten auf die häufigsten Fragen MS-Betroffener. Berlin, Heidelberg: *Springer Berlin Heidelberg*, 163. <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-61663-5> (4. Februar 2023).
- Gionchetti P et al. 2017. 3rd European Evidence-Based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn’s Disease 2016: Part 2: Surgical Management and Special Situations. *Journal of Crohn’s and Colitis*, 11(2): 135–49.
- Haag LM, Siegmund B. 2015. Intestinal Microbiota and the Innate Immune System – A Crosstalk in Crohn’s Disease Pathogenesis. *Frontiers in Immunology*, 6(489):1-13
- Herold. 2018. „Innere Medizin 2019“. Köln: *Eigenverlag*, ISBN: 978-3-9814660-8-9, 477-480.
- Honda K, Littman DR. 2016. The Microbiota in Adaptive Immune Homeostasis and Disease. *Nature*, 535(7610): 75–84.
- Indrio F et al. 2017. Epigenetic Matters: The Link between Early Nutrition, Microbiome, and Long-Term Health Development. *Frontiers in Pediatrics*, 5: 178.
- Isailovic N et al. 2015. Interleukin-17 and Innate Immunity in Infections and Chronic Inflammation. *Journal of Autoimmunity*, 60: 1–11.
- Jan RL et al. 2012. Lactobacillus Gasseri Suppresses Th17 pro-Inflammatory Response and Attenuates Allergen-Induced Airway Inflammation in a Mouse Model of Allergic Asthma. *British Journal of Nutrition*, 108(1): 130–39.

- Jiang P et al. 2022. The Involvement of TH17 Cells in the Pathogenesis of IBD. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, S1359610122000533.
- Kelly-Welch AE et al. 2003. Interleukin-4 and Interleukin-13 Signaling Connections Maps. *Science*, 300(5625): 1527–28.
- Kelchtermans H et al. 2008. How Interferon- γ Keeps Autoimmune Diseases in Check. *Trends in Immunology*, 29(10): 479–86.
- Kienesberger B et al. 2022. Insights into the Composition of a Co-Culture of 10 Probiotic Strains (OMNi BiOTiC® AAD10) and Effects of Its Postbiotic Culture Supernatant. *Nutrients*, 14(6): 1194.
- Klag T, Wehkamp J. 2019. Mikrobiom und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen: Einblicke in ein neues Krankheitsverständnis. *Der Klinikarzt*, 48(07): 301–7.
- Lang C. 2018. Lactobacillus – Alleskönner für die Gesundheit?. *BIOspektrum*, 24(1): 23–26.
- Liu C, Hermann TE. 1978. Characterization of Ionomycin as a Calcium Ionophore. *Journal of Biological Chemistry*, 253(17): 5892–94.
- Ma F et al. 2017. Fecal Bacteria from Treatment-Naive Crohn's Disease Patients Can Skew Helper T Cell Responses. *Experimental Cell Research*, 361(1): 135–40.
- MacDonald JK et al. 2016. Anti-IL-12/23p40 Antibodies for Induction of Remission in Crohn's Disease. Cochrane IBD Group. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD007572.pub3> (25. Januar 2021).
- McLaren J et al. 2009. Interferon Gamma: A Master Regulator of Atherosclerosis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20(2): 125–35.
- MetaHIT Consortium et al. 2010. A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established by Metagenomic Sequencing. *Nature*, 464(7285): 59–65.
- Miossec P. 2007. Interleukin-17 in Fashion, at Last: Ten Years after Its Description, Its Cellular Source Has Been Identified. *Arthritis & Rheumatism*, 56(7): 2111–15.
- Miossec P. 2009. IL-17 and Th17 Cells in Human Inflammatory Diseases. *Microbes and Infection*, 11(5): 625–30.
- Monin L, Gaffen SL. 2018. Interleukin 17 Family Cytokines: Signaling Mechanisms, Biological Activities, and Therapeutic Implications. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(4): a028522.
- Morgan XC et al. 2012. Dysfunction of the Intestinal Microbiome in Inflammatory Bowel Disease and Treatment. *Genome Biology*, 13(9): R79.
- O'Connor W et al. 2009. A protective function for Interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nature Immunology*, 6(10): 603–609.

- Onishi RM, Gaffen SL. 2009. Interleukin-17 and Its Target Genes: Mechanisms of Interleukin-17 Function in Disease. *Immunology*, 129(3): 311–21.
- Ostaff MJ et al. 2013. Antimicrobial Peptides and Gut Microbiota in Homeostasis and Pathology. *EMBO Molecular Medicine*, 5(10): 1465–83.
- Preiß J et al. 2014. Aktualisierte S3-Leitlinie – ‚Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn‘ 2014. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 52(12): 1431–84.
- Rossi M et al. 2016. Mining Metagenomic Whole Genome Sequences Revealed Subdominant but Constant Lactobacillus Population in the Human Gut Microbiota. *Environmental Microbiology Reports*, 8(3): 399–406.
- Rovedatti L et al. 2009. Differential Regulation of Interleukin 17 and Interferon Production in Inflammatory Bowel Disease. *Gut*, 58(12): 1629–36.
- Sabat R et al. 2010. Biology of Interleukin-10. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21(5): 331–44.
- Safari MT et al. 2017. Evaluation of IL-17B and IL-17F mRNA Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Association with Clinical Outcome of IBD Patients. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*, 10(Suppl. 1):S79-S84.
- Salzman NH et al. 2010. Enteric Defensins Are Essential Regulators of Intestinal Microbial Ecology. *Nature Immunology*, 11(1): 76–82.
- Sandborn WJ et al. 2013. Vedolizumab as Induction and Maintenance Therapy for Crohn’s Disease. *New England Journal of Medicine*, 369(8): 711–21.
- Sanders ME et al. 2018. Shared Mechanisms among Probiotic Taxa: Implications for General Probiotic Claims. *Current Opinion in Biotechnology*, 49: 207–16.
- Santosa S, Farnworth E, Jones PJH. 2006. Probiotics and Their Potential Health Claims. *Nutrition Reviews*, 64(6): 265–74.
- Sarmiento A. 2017. Editorial: Understanding Crohn’s Disease: Immunity, Genes and Microbes. *Frontiers in Immunology*, 8(357): 1-2.
- Sarra M et al. 2010. IL-23/IL-17 Axis in IBD. *Inflammatory Bowel Diseases*, 16(10): 1808–13.
- Scher J et al. 2013. Expansion of Intestinal Prevotella Copri Correlates with Enhanced Susceptibility to Arthritis. *eLife*, 2: e01202.
- Schröder T, Ibrahim S. 2017. Mikrobiom und Autoimmunität. *Der Internist*, 58(5): 449–55.
- Stallmach A et al. 2023. Treatment strategies in inflammatory bowel diseases. *Deutsches Ärzteblatt International*, 120: 768-78.
- Sulz MC et al. 2020. Treatment Algorithms for Crohn’s Disease. *Digestion*, 101(suppl 1):43–57.

- Thaiss CA et al. 2016. The Microbiome and Innate Immunity. *Nature*, 535(7610): 65–74.
- The NIH HMP Working Group et al. 2009. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Research*, 19(12): 2317–23.
- Trifunovic J et al. 2014. Pathologic patterns of interleukin 10 expression – A review. *Biochemia Medica*, 2015;25(1):36–48.
- Uhlig HH, Powrie F. 2009. Autoimmune disease: Inflammatory bowel disease. *European Journal of Immunology*, 39: 1991-2058.
- Van Niel CW et al. 2002. Lactobacillus Therapy for Acute Infectious Diarrhea in Children: A Meta-Analysis. *PEDIATRICS*, 109(4): 678–84.
- van Wietmarschen HA et al. 2020. Probiotics Use for Antibiotic-Associated Diarrhea: A Pragmatic Participatory Evaluation in Nursing Homes. *BMC Gastroenterology*, 20(1): 151.
- Vasilev P et al. 2017. Omni-Biotic In Patients With Diarrheal Syndrome. *Journal of BioScience & Biotechnology, Special Edition*, p59-63. 5p.
<https://eds.p.ebscohost.com/abstract?site=eds&scope=site&jrnl=13146238&AN=126542075&h=hkGR5ZagXIZ6Ajsvz9Tce%2b3LpN19BMAEFfp%2fg0Wwyk1D%2fofxkdpHvAjKzsq1r3HMg42%2biLUp%2fqiTr33eS0yzmw%3d%3d&crl=c&resultLocal=ErrCrlNoResults&resultNs=Ehost&crlhashurl=login.aspx%3fdirect%3dtrue%26profile%3dehost%26scope%3dsite%26authtype%3dcrawler%26jrnl%3d13146238%26AN%3d126542075> (26.Januar 23).
- Wilck N et al. 2017. Salt-Responsive Gut Commensal Modulates TH17 Axis and Disease. *Nature*, 551(7682): 585–89.
- Williams NT. 2010. Probiotics. *Am J Health-Syst Pharm*, 67: 449-58.

9. Anhang

9.1 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

mir die geltende Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe, keine Textabschnitte eines Dritten oder eigener Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben habe,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. Andreas Stallmach, Dr. rer. nat. Sven Stengel, Arndt Steube, Prof. Dr. Christina Zielinski, Dr. Thomas Sommermann, Prof. Dr. Dietmar Pieper und seine Arbeitsgruppe vom HZI Braunschweig

die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe,

eine gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation nicht eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Soziodemographische Patientendaten	- 13 -
Tabelle 2: Übersicht Chemikalien	- 15 -
Tabelle 3: Antigene der Oberflächenmarker und Zytokine	- 15 -
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien	- 20 -
Tabelle 5: Geräte	- 21 -
Tabelle 6: Oberflächenmarker mit der jeweiligen Verdünnung	- 24 -
Tabelle 7: Antigene mit der jeweiligen Verdünnung	- 25 -
Tabelle 8: Prozentualer Anteil an Lebenden Zellen vor (A) und nach (B) der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC® 10 Einnahme	- 31 -
Tabelle 9: Bestandteile OMNi-BiOTiC® 10 mit jeweiliger Identifizierung	- 32 -
Tabelle 10: Zuordnung der Zellpopulationen	- 33 -
Tabelle 11: Durchgeführter Wilcoxon-Test mit dem jeweiligem p-Wert für IL-17A und IL-17F	- 40 -

9.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Darmbarriere im physiologischen und pathologischen Zustand, modifiziert aus Klag, Wehkamp 2019; Ostaff et al. 2013	- 4 -
Abbildung 2: Differenzierungsschritte TH17-Zellen, modifiziert aus Bettelli et al. 2008 - 10 -	
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Darmmukosa im physiologischen und pathologischen Zustand bei MC und mögliche Effekte von Laktobazillen, modifiziert aus Klag und Wehkamp 2019	- 11 -
Abbildung 4: Cytex Vollspektrum-Viewer, https://spectrum.cytekbio.com/ aufgerufen am 03.08.2021, 13:56 Uhr	- 16 -
Abbildung 5: Ähnlichkeits-Index (Similarity Indices), https://spectrum.cytekbio.com/ aufgerufen am 03.08.2021, 13:57 Uhr	- 17 -
Abbildung 6: Versteckter Ähnlichkeits-Index (Hide Similarity) Index, https://spectrum.cytekbio.com/ aufgerufen am 03.08.2021, 13:58 Uhr	- 17 -

Abbildung 7: Gating der PBMCs (linke Abbildung) und der Single Zellen (rechte Abbildung) mittels FlowJo	- 26 -
Abbildung 8: Lebend-Tot-Färbung mit Zombie UV Farbstoff (linke Abbildung); CD3 positiv und CD3 negativ (rechte Abbildung) mittels FlowJo.....	- 27 -
Abbildung 9: Gating der Monozyten und der B-Zellen (links); unbehandelte Monozyten mit Zytokin TNF- α (rechts) mittels FlowJo	- 27 -
Abbildung 10: Unbehandelte B-Zellen mit Zytokin TNF- α (links); CD4 positive und CD4 negative Populationen (rechts) mittels FlowJo.....	- 28 -
Abbildung 11: CD3 ⁺ CD4 ⁻ (links); unbehandelt CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD161 ⁺ mit dem Zytokin TNF- α (rechts) mittels FlowJo	- 28 -
Abbildung 12 CD3 ⁺ CD4 ⁺ (links); unbehandelt CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD161 ⁺ mit dem Zytokin TNF- α (rechts) mittels FlowJo	- 29 -
Abbildung 13: Unbehandelte Population CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD161 ⁻ mit dem Zytokin TNF- α (links); behandelt Population CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD161 ⁻ mit Zytokin TNF- α (rechts) mittels FlowJo	- 30 -
Abbildung 14: Unbehandelte PBMCs (links) und behandelte PBMCs (rechts) für die Population CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD161 ⁻ IFN- γ mittels FlowJo	- 30 -
Abbildung 15: Übersicht der durchflusszytometrischen Analyse der Zellpopulationen vor (A) und nach (B) der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC [®] 10-Einnahme	- 34 -
Abbildung 16: Durchflusszytometrische Analyse der CD3 ⁺ - und CD3 ⁻ -Zellen im Vorher-Nachher-Vergleich in Prozent	- 35 -
Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse von CD3 ⁺ CD4 ⁺ Population und CD3 ⁺ CD4 ⁺ mit dem Oberflächenmarker CD161 im Vorher-Nachher-Vergleich in Prozent.....	- 36 -
Abbildung 18: Durchflusszytometrische Analyse von CD3 ⁺ CD4 ⁻ Population und CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD161 ⁺ vor und nach 3-wöchiger Omnibiotic-Einnahme in Prozent	- 37 -
Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse von B-Zellen (CD20 ⁺ CD3 ⁻ CD14 ⁻) und Monozyten (CD14 ⁺ CD3 ⁻ CD20 ⁻) vor und nach 3-wöchiger OMNi-BiOTiC [®] 10-Einnahme in Prozent.....	- 39 -
Abbildung 20: Durchflusszytometrische Analyse von IL-17A und IL-17F Prozent vor (A) und nach (B) der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC [®] 10-Einnahme in Prozent.....	- 41 -
Abbildung 21: Durchflusszytometrische Analyse IL-17A und Il-17F MFI vor (A) und nach (B) der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC [®] 10-Einnahme, Angabe in MFI	- 42 -

Abbildung 22: Durchflusszytometrische Analyse von CD3 ⁺ CD4⁺CD161⁺ IL-10 in Prozent (linke Abbildung); CD3 ⁺ CD4⁻CD161⁺ IL-10 in Prozent (rechte Abbildung), vor (A) und nach (B) der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC [®] 10-Einnahme	- 43 -
Abbildung 23: Durchflusszytometrische Quantifizierung von IL-10 positiven B-Zellen in Prozent, vor (A) und nach (B) der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC [®] 10-Einnahme	- 44 -
Abbildung 24: Durchflusszytometrische Bestimmung der IFN- γ Expressionsstärke (MFI) in CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD161 ⁺ Zellen (linke Abbildung) und IL-13 in B-Zellen in Prozent (rechte Abbildung) vor-(A) und nach (B) der 3-wöchigen OMNi-BiOTiC [®] 10-Einnahme ..	- 45 -
Abbildung 25: Mikrobiomanalyse mittels nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS)	- 47 -
Abbildung 26: Übersicht über die in OMNi-BiOTiC [®] 10 enthaltenen Stämme und ihr Nachweis in den entsprechenden Patienten-Stuhlproben in Prozent.....	- 48 -
Abbildung 27: Anzahl der täglichen Stuhlfrequenz über die Dauer von 21 Tagen während der Einnahme von OMNi-BiOTiC [®] 10	- 50 -
Abbildung 28: Die lineare Regression für die Anzahl der täglichen Stuhlfrequenz über die Dauer von 21 Tagen während der Einnahme von OMNi-BiOTiC [®] 10.....	- 51 -

9.4 Tabelle Zytokine

Alle Zellpopulationen in Prozent

Patient	CD3+ A	CD3+ B	CD3+CD4+ A	CD3+CD4+ B	CD3+CD4+CD161+ A	CD3+CD4+CD161+ B
TH17006	39,7	65,1	41,7	50,7	27,1	23,4
TH17007	33,9	49,4	42,5	35,1	14,8	13,8
TH17008	59	52,2	56,1	45,3	11,1	10,6
TH17009	59,2	53,6	48,5	23,6	32,9	37,5
TH17010	62,6	51,8	54,2	59,8	9,19	8,15
TH17011	51,3	49,9	49,2	47	9,51	13,9
TH17012	67,2	65,7	47	44,9	21,5	19,1
TH17013	48,2	53,6	41,5	41,6	7,06	6,61
TH17014	58,3	55,6	41,6	38	10,1	12,4
TH17015	59,9	44,1	60,1	60,6	24,5	17,7
p-value	0,625		0,322266		0,625	
q-value	0,710156		0,710156		0,710156	
	CD3+CD4+CD161- A	CD3+CD4+CD161- B	CD3+CD4- A	CD3+CD4- B	CD3+CD4-CD161+ A	CD3+CD4-CD161+ B
TH17006	72,9	76,6	48,8	45,4	22,5	16,4
TH17007	85,2	86,2	56,7	64,6	11,5	6,55
TH17008	88,9	89,4	40,2	51,4	12	10,7
TH17009	67,1	62,5	50,1	74,8	26,2	29,4
TH17010	90,8	91,9	46,1	39,2	5,56	7,42
TH17011	90,5	86,1	50,7	52,2	5,01	5,79
TH17012	78,5	80,9	51,6	54,2	15	17,2
TH17013	92,9	93,4	56,4	56,9	8,77	6,28
TH17014	89,9	87,6	54,7	58,9	6,62	11,9
TH17015	75,5	82,3	37,5	39,6	20,5	18,8
p-value	0,607422		0,130859		0,921875	
q-value	0,710156		0,710156		0,931094	
	CD3 neg A	CD3 neg B	CD20+CD3-CD14-A	CD20+CD3-CD14-B	CD14+CD3-CD20-A	CD14+CD3-CD20-B
TH17006	54,4	29,3	1,26	4,48	77,7	45,4
TH17007	64,1	50,5	55,4	51,8	23	24,5
TH17008	38,2	45,8	36,5	39,9	19,7	24,4
TH17009	39	45,2	40,3	35,3	13,2	15,8
TH17010	34,4	45,9	23	38,7	25,2	26,2
TH17011	46,7	47,6	60	55,8	13	17,2
TH17012	30,9	32,7	16,6	14,2	39,9	32,9
TH17013	50,2	45,3	31,5	32,5	34,1	32,2
TH17014	40,3	42,6	24,4	24	13,7	19,9
TH17015	38,9	54,2	35,7	25,1	26,9	42,5
p-value	0,625		0,556641		0,556641	
q-value	0,710156		0,710156		0,710156	

CD3⁺CD4⁺CD161⁺ in Prozent

	CD161+ , TNFa+ A	CD161+ , TNFa+ B	CD161+ , GM-CSF+ A	CD161+ , GM-CSF+ B	CD161+ , IFN-g+ A	CD161+ , IFN-g+ B
TH17006	11,8	42,3	1,75	11,3	15,8	33,8
TH17007	37,2	48,6	10,1	13,5	30,4	41,3
TH17008	13,8	11,9	7,61	9,19	12,6	13,4
TH17009	54	51,8	12,8	11,7	64	68,8
TH17010	23,4	20,3	7,01	8,68	8,19	8,21
TH17011	16,4	13,3	10,6	8,04	6,07	6,63
TH17012	32	34	10,2	11,5	22,7	25,6
TH17013	21,9	35,7	4,84	7,61	13,2	14,4
TH17014	44,1	33,9	10,7	6,7	44,2	32
TH17015	56,6	35,8	17,3	8,98	9,45	6,12
p-value	0,984375		0,695313		0,232422	
q-value	0,994219		0,858325		0,716074	
	CD161+ , IL-4+ A	CD161+ , IL-4+ B	CD161+ , IL-9+ A	CD161+ , IL-9+ B	CD161+ , IL-10+ A	CD161+ , IL-10+ B
TH17006	4,76	4,88	0,46	1,02	0,59	0,41
TH17007	8,55	5,21	5,58	6,04	0,47	0,29
TH17008	2,89	1,85	0,41	0,095	0,41	0,14
TH17009	2,62	1,75	0,65	0,7	0,17	0,056
TH17010	3,17	5,53	2,29	1,24	1,62	1,53
TH17011	3,17	4,02	2,99	0,83	0,7	0,19
TH17012	3,85	6,23	4,43	6,25	0,54	0,71
TH17013	1,67	4,26	2,09	2,66	0,33	0,91
TH17014	4,4	2,45	2,17	1,58	0,88	0,33
TH17015	1,37	2,59	1,5		0,4	0,37
p-value	0,695313		0,625		0,185547	
q-value	0,858325		0,858325		0,716074	
	CD161+ , IL-13+ A	CD161+ , IL-13+ B	CD161+ , IL-17A+ A	CD161+ , IL-17A+ B	CD161+ , IL-17f+ A	CD161+ , IL-17f+ B
TH17006	10,1	5,13	2,77	7,52	0,35	1,17
TH17007	5,24	6,09	0,99	0,88	1,16	0,098
TH17008	10,5	6,92	1,7	1,8	0,37	0,47
TH17009	5,94	5,12	1,32	0,61	0,35	0,56
TH17010	3,24	2,77	2,65	3,34	1,18	0,19
TH17011	6,24	4,97	2,29	2,3	1,23	0,51
TH17012	4,29	3,33	1,76	3,56	0,44	0,55
TH17013	5,17	6,7	2,67	4,11	0,5	0,91
TH17014	15,7	13,8	1,47	1,31	1,12	0,33
TH17015	8,09	9,35	8,31	3,77	2,17	3,17
p-value	0,232422		0,625		0,921875	
q-value	0,716074		0,858325		0,994219	
	CD161+ , IL-21+ A	CD161+ , IL-21+ B	CD161+ , IL-22+ A	CD161+ , IL-22+ B		
TH17006	6,11	6,2	1,51	1,07		
TH17007	2,91	3,98	1,92	1,13		
TH17008	3,46	2,23	5,94	7,11		
TH17009	1,98	1,42	2,32	2		
TH17010	1,77	2,86	0,96	2,29		
TH17011	3,17	1,66	4,4	7,14		
TH17012	1,81	1,22	3,75	5,58		
TH17013	2,34	3,65	3,75	5,48		
TH17014	7,11	3,54	3,41	1,85		
TH17015	8,25	4,96	3,44	2,34		
p-value	0,322266		0,322266			
q-value	0,716074		0,716074			

CD3+CD4+CD161+ MFI

	CD161+ , TNFa+ A	CD161+ , TNFa+ B	CD161+ , GM-CSF+ A	CD161+ , GM-CSF+ B	CD161+ , IFN-g+ A	CD161+ , IFN-g+ B
TH17006	5602	25607	309	3088	2140	7985
TH17007	17084	8853	1686	926	11177	6222
TH17008	5854	6498	1293	2222	4184	5646
TH17009	23999	19063	2267	2383	18985	22524
TH17010	7753	7629	2944	2909	2698	3176
TH17011	4753	7228	4022	3510	1603	3172
TH17012	12608	14186	1989	2783	11258	15090
TH17013	9653	14821	327,3	802	4046	5916
TH17014	21679	14777	900	297	14271	8138
TH17015	25013	13631	3551	1614	2487	1106
p-value	0,845703		0,845703		0,492188	
q-value	0,919258		0,919258		0,919258	
	CD161+ , IL-4+ A	CD161+ , IL-4+ B	CD161+ , IL-9+ A	CD161+ , IL-9+ B	CD161+ , IL-10+ A	CD161+ , IL-10+ B
TH17006	637	456	1558	768,5	185	163
TH17007	671	308	828,7	162,1	260	105
TH17008	413	232	1139	1324	86	251
TH17009	611	524	1101	1129	86	242
TH17010	572	927	1120	565	928	687
TH17011	209	231	991	189	481	221
TH17012	635	815	409	1032	404	350
TH17013	339	608	508	491	52	232
TH17014	916	489	966	847	324	128
TH17015	330	277	381	194	601	340
p-value	0,476563		0,160156		0,232422	
q-value	0,919258		0,919258		0,919258	
	CD161+ , IL-13+ A	CD161+ , IL-13+ B	CD161+ , IL-17A+ A	CD161+ , IL-17A+ B	CD161+ , IL-17f+ A	CD161+ , IL-17f+ B
TH17006	1537	1468	6831	30329	339	806
TH17007	325	347	249	160	135	11
TH17008	1301,7	1533	3691	3852	101	150
TH17009	1136,8	1256,2	3062	2005	101	170
TH17010	426	3	541	1006	229	213
TH17011	919	1225	1002	860	103	78
TH17012	374	228	2586	4169	131	286
TH17013	977	1147	2378	5021	23	197
TH17014	1907	1623	3155	1215	587	61
TH17015	1099	1276	17077	5361	487	515
p-value	0,769531		0,769531		0,431641	
q-value	0,919258		0,919258		0,919258	
	CD161+ , IL-21+ A	CD161+ , IL-21+ B	CD161+ , IL-22+ A	CD161+ , IL-22+ B		
TH17006	1814	2655	151	44		
TH17007	398	423	132	31		
TH17008	1503	1403	177	225		
TH17009	1166	1166	12	140		
TH17010	1244	294	145	147		
TH17011	461	653	140	201		
TH17012	338	503	251	403		
TH17013	568	1179	130	425		
TH17014	1747	808	246	61		
TH17015	1395	983	256	150		
p-value	0,910156		0,769531			
q-value	0,919258		0,919258			

CD3⁺CD4⁺CD161⁻ in Prozent

	TNFa+ , CD161- A	TNFa+ , CD161- B	GM-CSF+ , CD161- A	GM-CSF+ , CD161- B	IFN-g+ , CD161- A	IFN-g+ , CD161- B
TH17006	17,9	34,4	1,92	7,27	11,5	26,7
TH17007	50,2	59,5	14,3	15,3	53,7	65,3
TH17008	4,09	5,3	1,84	2,89	4,54	5,46
TH17009	34,9	35,1	9,05	12,1	29,4	34,3
TH17010	13,3	14,4	2,82	4,62	2,4	4,07
TH17011	10,1	11,1	5,32	6,02	3,29	4,13
TH17012	21,7	23	4,06	4,34	15,4	16
TH17013	18,4	22,4	4,77	5,8	9,41	11,1
TH17014	32,4	27,4	7,63	4,85	22,2	17,2
TH17015	41,5	29,3	9,66	5,23	8,49	4,27
p-value	0,275391		0,275391		0,193359	
q-value	0,670506		0,670506		0,670506	
	IL-4+ , CD161- A	IL-4+ , CD161- B	IL-9+ , CD161- A	IL-9+ , CD161- B	IL-10+ , CD161- A	IL-10+ , CD161- B
TH17006	1,34	2,29	0,14	0,14	0,27	0,062
TH17007	6,98	1,76	5,31	2,92	0,14	0,024
TH17008	0,24	0,17	0,03	0,073	0,081	0,045
TH17009	1,86	1,07	0,2	0,97	0,094	0,13
TH17010	0,63	1,07	0,23	0,33	0,16	0,12
TH17011	0,76	0,54	0,43	0,49	0,4	0,1
TH17012	1,5	1,48	1,63	2,49	0,14	0,035
TH17013	0,48	0,71	0,63	0,84	0,051	0,038
TH17014	1,28	0,7	0,49	0,32	0,15	0,11
TH17015	0,88	0,86	0,58	0,56	0,21	0,059
p-value	0,476563		0,425781		0,007813	
q-value	0,670506		0,670506		0,086797	
	IL-13+ ,CD161- A	IL-13+ ,CD161- B	IL-17A+ , CD161- A	IL-17A+ , CD161- B	IL-17f+ , CD161- A	IL-17f+ , CD161- B
TH17006	2,34	4,14	0,72	1,38	1,15	0,062
TH17007	3,05	2,72	0,17	0,35	0,79	0,11
TH17008	0,87	0,95	0,068	0,13	0,038	0,056
TH17009	4,74	4,07	0,55	0,38	0,12	0,22
TH17010	1,25	1,57	0,54	0,85	0,06	0,1
TH17011	2	1,83	0,56	0,48	0,065	0,021
TH17012	1,6	1,58	0,52	0,44	0,13	0,33
TH17013	3,7	4,04	0,61	0,84	0,14	0,2
TH17014	3,58	2,91	0,24	0,47	0,15	0,49
TH17015	6,56	5,8	1,05	0,54	0,19	1,11
p-value	0,603516		0,371094		0,556641	
q-value	0,670506		0,670506		0,670506	
	IL-21+ , CD161- A	IL-21+ , CD161- B	IL-22+ , CD161- A	IL-22+ , CD161- B		
TH17006	2,39	4,19	0,37	0,62		
TH17007	1,01	1,08	0,95	0,47		
TH17008	0,63	0,57	0,54	0,62		
TH17009	1,98	2,53	2,35	2,47		
TH17010	0,19	0,69	0,51	0,51		
TH17011	0,2	0,3	0,95	1,19		
TH17012	0,69	0,57	1,45	1,52		
TH17013	0,25	0,96	1,01	1,22		
TH17014	1,41	1,07	0,59	0,47		
TH17015	4,27	1,48	1,68	0,89		
p-value	0,492188		0,84375			
q-value	0,670506		0,852188			

CD3⁺CD4⁺CD161⁻ MFI

	TNFa ⁺ , CD161- A	TNFa ⁺ , CD161- B	GM-CSF ⁺ , CD161- A	GM-CSF ⁺ , CD161- B	IFN-g ⁺ , CD161- A	IFN-g ⁺ , CD161- B
TH17006	7926	19459	340	2063	2405	7264
TH17007	22268	24411	2644	2096	20378	17431
TH17008	2630	2793	50	618	1418,3	2098
TH17009	16737	14996	1887	2594	8209,3	11205,1
TH17010	4818	5836	2386	2807	108	1279
TH17011	3787	6271	2953	3553	642	1554
TH17012	8904	9310	940	1520,9	7543	8999
TH17013	7482	10656	980,2	1257	2898	4057
TH17014	18589	11645	1965	920	8237	4604
TH17015	18170	10943	2042	1080	1923	892
p-value	0,556641		0,492188		0,431641	
q-value	0,931094		0,931094		0,931094	
	IL-4 ⁺ , CD161- A	IL-4 ⁺ , CD161- B	IL-9 ⁺ , CD161- A	IL-9 ⁺ , CD161- B	IL-10 ⁺ , CD161- A	IL-10 ⁺ , CD161- B
TH17006	440	487	731,4	631	435	27
TH17007	768	657	1224	590	284	222
TH17008	232	160	485	465	4	4
TH17009	441	404	690	768	18	208
TH17010	407	494	1889	1168	999	569
TH17011	217	256	1550	1286	453	390
TH17012	481	563	626	1210	461	360
TH17013	348	571	433	398	414	278
TH17014	614	293	351	117	735	478
TH17015	252	246	541,5	340,7	474	415
p-value	0,921875		0,105469		0,054688	
q-value	0,931094		0,585879		0,585879	
	IL-13 ⁺ ,CD161- A	IL-13 ⁺ ,CD161- B	IL-17A ⁺ , CD161- A	IL-17A ⁺ , CD161- B	IL-17f ⁺ , CD161- A	IL-17f ⁺ , CD161- B
TH17006	852,6	1051	764	2425	436	347
TH17007	101	385	2	309	215	85
TH17008	508	543	1507	783	126	82
TH17009	1185	1216	398	516	37	186
TH17010	1004	410	663	559	285	283
TH17011	454	283	394	380	108	103
TH17012	12	317	794	500	141	193
TH17013	474	659	1002	1081	140	222
TH17014	655	529	573	517	508	144
TH17015	863	767	1593	595	154	285
p-value	0,625		0,845703		0,921875	
q-value	0,931094		0,931094		0,931094	
	IL-21 ⁺ , CD161- A	IL-21 ⁺ , CD161- B	IL-22 ⁺ , CD161- A	IL-22 ⁺ , CD161- B		
TH17006	1383	1798	164	80		
TH17007	93	410	192	98		
TH17008	738	611	15	33		
TH17009	1107	1232	149	294		
TH17010	2043	160	237	161		
TH17011	1460	770	170,5	160		
TH17012	69	905	230	301		
TH17013	176	341	188	195		
TH17014	565	25	224	128		
TH17015	508	264	184	147		
p-value	0,769531		0,431641			
q-value	0,931094		0,931094			

CD3⁺CD4⁺CD161⁺ in Prozent

	CD161+ , TNFa+ A	CD161+ , TNFa+ B	CD161+, GM-CSF+ A	CD161+, GM-CSF+ B	CD161+ , IFN-g+ A	CD161+ , IFN-g+ B
TH17006	11,6	23	2,85	5,17	19	37,5
TH17007	29,3	36	2,25	3,87	32	38,5
TH17008	17,3	23,6	4,68	7,99	34,8	30,8
TH17009	17,6	30,8	1,16	4,65	50,2	55,6
TH17010	32,1	30,5	4,01	6,55	19,3	20,8
TH17011	17,7	25,5	7,79	8,68	12,3	18,9
TH17012	46,3	40,6	9,12	9,27	36,3	40,9
TH17013	29,2	35,8	1,33	4,04	17,7	31,6
TH17014	48,8	40,3	3,87	2,94	53,6	46,1
TH17015	62,9	38,3	12,6	8,27	33,3	25,9
p-value	0,492188		0,160156		0,322266	
q-value	0,931094		0,889668		0,931094	
	CD161+ , IL-4+ A	CD161+ , IL-4+ B	CD161+ , IL-9+ A	CD161+ , IL-9+ B	CD161+ , IL-10+ A	CD161+ , IL-10+ B
TH17006	2,38	3,07	0,3	2,34	2,05	0,48
TH17007	3,93	1,57	5,51	2,75	2,19	0,28
TH17008	3,31	2,44	1,77	0,83	1,02	0,41
TH17009	1,59	1,49	0,31	0,37	0,17	0,089
TH17010	3,3	4,47	1,86	2,4	2,58	1,76
TH17011	7,14	5,37	4,87	3,72	2,6	0,83
TH17012	4,57	7,4	8,02	9,12	3,84	0,88
TH17013	3,06	3,69	0,99	1,76	0,94	1,7
TH17014	5,23	2,35	2,92	3,74	0,88	1,03
TH17015	6,19	3,76	3,29	1,71	4,43	0,7
p-value	0,431641		0,845703		0,027344	
q-value	0,931094		0,931094		0,303789	
	CD161+ , IL-13+ A	CD161+ , IL-13+ B	CD161+, IL-17A+ A	CD161+, IL-17A+ B	CD161+ , IL-17f+ A	CD161+ , IL-17f+ B
TH17006	18,3	17,2	9,31	8,24	7,26	4,36
TH17007	21	16,2	19,6	12,9	10	4,49
TH17008	14,4	6,96	5,39	2,24	0,71	0,83
TH17009	3,51	3,49	0,62	2,09	0,3	0,7
TH17010	7,45	11,2	5,87	12,1	1,29	2,24
TH17011	10,2	10,9	10,6	13,2	6,01	2,62
TH17012	6,62	9,65	12	10,7	2,18	2,02
TH17013	17,7	15,7	28,1	20,3	4,05	3,28
TH17014	18,9	11,6	4,34	7,75	1,36	3,82
TH17015	8,41	16,3	6,22	7,44	2,39	5,25
p-value	0,695313		0,921875		0,625	
q-value	0,931094		0,931094		0,931094	
	CD161+ , IL-21+ A	CD161+ , IL-21+ B	CD161+ , IL-22+ A	CD161+ , IL-22+ B		
TH17006	25,1	28,2	1,47	1,21		
TH17007	11,3	13,6	13,8	7,3		
TH17008	8,7	1,37	3,09	3,85		
TH17009	1,58	2,33	0,44	0,92		
TH17010	5,44	6,55	1	4,63		
TH17011	13,5	5,79	5,36	6,35		
TH17012	10,1	5,12	4,21	3,9		
TH17013	5,68	7,44	3,56	3,86		
TH17014	6,52	3,96	2,51	1,1		
TH17015	11,4	19,5	3,15	2,1		
p-value	0,921875		0,921875			
q-value	0,931094		0,931094			

CD3⁺CD4⁺CD161⁺ MFI

	CD161+ , TNFa+ A	CD161+ , TNFa+ B	CD161+, GM-CSF+ A	CD161+, GM-CSF+ B	CD161+ , IFN-g+ A	CD161+ , IFN-g+ B
TH17006	5348	14271	72	503	2065	6182
TH17007	12583	15049	125	111	6367	7200
TH17008	5852	8627	172	1502	7304	11837
TH17009	7477	13337	450	507	6887	12745
TH17010	7430	7123	573,5	1001	5459	5287
TH17011	5062	10215	1221	2842	2452	7636
TH17012	15818	14973	815	1875,2	13713	17589
TH17013	11462	12554	575,1	186,8	4235	8164
TH17014	14536	13670	737	451,2	11519	8439
TH17015	23714	14433	2003	1071	6679	4715
p-value	0,275391		0,232422		0,048828	
q-value	0,611918		0,611918		0,54248	
	CD161+ , IL-4+ A	CD161+ , IL-4+ B	CD161+ , IL-9+ A	CD161+ , IL-9+ B	CD161+ , IL-10+ A	CD161+ , IL-10+ B
TH17006	423	454	1556	1042	190	105
TH17007	583	352	559	442	106	123
TH17008	183	430	1057	954	208	123
TH17009	308	440	572,3	702	117	176
TH17010	397	974	104	278	524	267
TH17011	466	755	278	831	34	246
TH17012	749	876	194	844	305	290
TH17013	406	615	1409	1275	131	91
TH17014	688	445	1048	490	176	212
TH17015	392	363	232	292	470	112
p-value	0,193359		0,921875		0,361328	
q-value	0,611918		0,931094		0,669059	
	CD161+ , IL-13+ A	CD161+ , IL-13+ B	CD161+, IL-17A+ A	CD161+, IL-17A+ B	CD161+ , IL-17f+ A	CD161+ , IL-17f+ B
TH17006	1404	1117	2595	6330	435	387
TH17007	867	716	1172	1247	332	144
TH17008	1249	1296	380	2611	273	324
TH17009	552,6	791,5	919	152	96	220
TH17010	662	644	187	193	373	498
TH17011	2038	2670	160	1011	339	354
TH17012	820	386	3152	3272	254	344
TH17013	1508	1761	3450	3334	303	369
TH17014	1285	742	888	659	419	124
TH17015	763	1539	8328	3161	301	422
p-value	0,845703		0,769531		0,556641	
q-value	0,931094		0,931094		0,883468	
	CD161+ , IL-21+ A	CD161+ , IL-21+ B	CD161+ , IL-22+ A	CD161+ , IL-22+ B		
TH17006	1752	1652	109	165		
TH17007	1102	945	175	142		
TH17008	1060	1037	229	176		
TH17009	494	1014	142	39		
TH17010	375	1117	190	26		
TH17011	1141	1392	166	75		
TH17012	1455	505	155	232		
TH17013	1740	2117	127	87		
TH17014	1313	595	82	102		
TH17015	1859	1463	116	52		
p-value	0,845703		0,160156			
q-value	0,931094		0,611918			

CD20⁺CD3⁻CD14⁻ in Prozent

	CD20 ⁺ , TNFa ⁺ A	CD20 ⁺ , TNFa ⁺ B	CD20 ⁺ , GM-CSF ⁺ A	CD20 ⁺ , GM-CSF ⁺ B	CD20 ⁺ , IFN-g ⁺ A	CD20 ⁺ , IFN-g ⁺ B
TH17006	4,24	6,87	23,5	4,78	2,47	0,9
TH17007	4,68	9,23	0,077	0,34	0,045	0,24
TH17008	3,71	2,62	0,26	0,14	0,93	0,55
TH17009	8,84	9,67	0,47	0,31	0,8	0,53
TH17010	8,59	9,42	0,15	0,47	0,087	0,054
TH17011	15,1	15,1	0,59	0,31	0,31	0,094
TH17012	22,6	11,6	0,62	0,92	0,46	0,31
TH17013	7,59	8,76	0,045	0,046	0,037	0,091
TH17014	22	10,9	0,76	0,35	0,51	0,45
TH17015	4,25	3,76	0,33	0,17	0,31	0,32
p-value	0,976563		0,539063		0,083984	
q-value	0,986328		0,748623		0,311022	
	CD20 ⁺ , IL-4 ⁺ A	CD20 ⁺ , IL-4 ⁺ B	CD20 ⁺ , IL-9 ⁺ A	CD20 ⁺ , IL-9 ⁺ B	CD20 ⁺ , IL-10 ⁺ A	CD20 ⁺ , IL-10 ⁺ B
TH17006	0,53	0,6	35,3	10,1	15,2	2,69
TH17007	0,087	0,25	0,1	0,072	0,024	0,081
TH17008	0,14	0,28	0,22	0,1	0,12	0,11
TH17009	0,22	0,16	0,28	0,14	0,15	0,099
TH17010	0,058	0,18	0,029	0,81	0,029	0,027
TH17011	0,26	0,18	0,51	0,2	0,25	0,12
TH17012	0,23	0,33	0,28	0,076	0	0
TH17013	0,097	0,21	0,00744	0,03	0,037	0,03
TH17014	0,48	0,056	0,087	0,15	0,13	0,07
TH17015	0,22	0,16	0,094	0,18	0,25	0,095
p-value	0,310547		0,322266		0,039063	
q-value	0,694375		0,694375		0,216992	
	CD20 ⁺ , IL-13 ⁺ A	CD20 ⁺ , IL-13 ⁺ B	CD20 ⁺ , IL-17A ⁺ A	CD20 ⁺ , IL-17A ⁺ B	CD20 ⁺ , IL-17f ⁺ A	CD20 ⁺ , IL-17f ⁺ B
TH17006	5,83	0,9	11	3,58	0,88	1,49
TH17007	0	0,027	0,55	0,67	0,41	0,43
TH17008	1,17	0,53	0,2	0,12	0,67	0,45
TH17009	0,85	0,55	0,14	0,23	0,16	0,44
TH17010	0,15	0,095	0,23	0,24	0,7	0,41
TH17011	0,26	0,12	0,63	0,85	0,24	0,28
TH17012	0,46	0,31	1,15	0,94	0,67	1,6
TH17013	0,00744	0,076	0,98	0,83	0,36	0,59
TH17014	0,77	0,29	1,19	0,55	1,25	0,57
TH17015	0,25	0,16	0,42	0,88	0,74	1,09
p-value	0,013672		0,695313		0,375	
q-value	0,151895		0,858325		0,694375	
	CD20 ⁺ , IL-21 ⁺ A	CD20 ⁺ , IL-21 ⁺ B	CD20 ⁺ , IL-22 ⁺ A	CD20 ⁺ , IL-22 ⁺ B		
TH17006	10,1	1,19	4,24	1,19		
TH17007	0,00699	0,081	0,19	0,22		
TH17008	0,18	0,14	0,13	0,19		
TH17009	0,24	0,4	0,15	0,13		
TH17010	0,087	0,18	0,029	0,054		
TH17011	0,17	0,07	0,11	0,29		
TH17012	0,046	0,076	0,18	0,13		
TH17013	0	0,015	0,11	0,12		
TH17014	0,42	0,17	0,42	0,22		
TH17015	0,15	0,042	0,3	0,39		
p-value	0,492188		0,921875			
q-value	0,748623		0,986328			

CD20+CD3-CD14- MFI

	CD20+ , TNFa+ A	CD20+ , TNFa+ B	CD20+ , GM-CSF+ A	CD20+ , GM-CSF+ B	CD20+ , IFN-g+ A	CD20+ , IFN-g+ B
TH17006	832	5906	1076	1141	388	670
TH17007	2139	3526	1153	833,8	619	276
TH17008	1307	1427	348	286	24,69	48,9
TH17009	3916	3781	109	352	41,3	33,1
TH17010	3234	3388	998	1610	1159	1043
TH17011	3981	6052	661	769	593	631
TH17012	7389	5936	1069	1919	460	788
TH17013	3432	4372	809	705	531	333
TH17014	8035	4743	53	971	205	217
TH17015	1583	1497	669	840,3	376	330
p-value	0,492188		0,105469		0,921875	
q-value	0,883468		0,860736		>0,999999	
	CD20+ , IL-4+ A	CD20+ , IL-4+ B	CD20+ , IL-9+ A	CD20+ , IL-9+ B	CD20+ , IL-10+ A	CD20+ , IL-10+ B
TH17006	14	305	1050	1109	885	1190
TH17007	14	32	1541	952,3	61	14
TH17008	43	92	320	13	249	70
TH17009	46	68	100	102	132	305
TH17010	15	71	2091	2155	1195	745
TH17011	16	87	1120	1215	678	735
TH17012	35	58	1261	2303	419	35
TH17013	30	56	1259	795	91	29
TH17014	99	0	125	926	420	83
TH17015	87	44	847	881	115	63
p-value	0,193359		0,556641		0,232422	
q-value	0,860736		0,883468		0,860736	
	CD20+ , IL-13+ A	CD20+ , IL-13+ B	CD20+ , IL-17A+ A	CD20+ , IL-17A+ B	CD20+ , IL-17f+ A	CD20+ , IL-17f+ B
TH17006	677	1090	2466	2042	58	523
TH17007	1202	751	135	223	111	51
TH17008	213	46	415	160	54	28
TH17009	43	60	203	140	92	123
TH17010	1617	1615	422	498	243	163
TH17011	868	890	498	371	72	109
TH17012	949	1722	391	388	107	224
TH17013	1001	626	335	252	92	120
TH17014	167	690	305	261	313	83
TH17015	779	677	20	167	98	212
p-value	0,769531		0,375		0,556641	
q-value	>0,999999		0,883468		0,883468	
	CD20+ , IL-21+ A	CD20+ , IL-21+ B	CD20+ , IL-22+ A	CD20+ , IL-22+ B		
TH17006	518	161	178	143		
TH17007	1634	1057	19	57		
TH17008	276	460	22	51		
TH17009	9	364	125	10		
TH17010	1560	1195	45	28		
TH17011	716	654	20	17		
TH17012	1227	2435	2	30		
TH17013	1350	766	14	34		
TH17014	302	1107	63	45		
TH17015	1108	985	75	65		
p-value	0,921875		>0,999999			
q-value	>0,999999		>0,999999			

CD14⁺CD3⁻CD20⁻ in Prozent

	CD14 ⁺ , TNFa+ A	CD14 ⁺ , TNFa+ B	CD14 ⁺ , GM-CSF+ A	CD14 ⁺ , GM-CSF+ B	CD14 ⁺ , IFN-g+ A	CD14 ⁺ , IFN-g+ B
TH17006	39,7	11,5	0,17	0,41	2,4	1
TH17007	34,9	34,3	0,94	1,8	0,82	2,19
TH17008	13,6	20,2	0,2	0,94	0,6	0,44
TH17009	9,74	33,6	0,17	0,44	1,6	0,37
TH17010	15,7	23,2	0,61	2,12	1,22	1,32
TH17011	40,3	11,5	0,8	0,63	2,75	1,14
TH17012	37,4	14,4	1,86	1,38	1,08	0,85
TH17013	24	12,7	0,7	0,46	1,46	2,05
TH17014	38,3	43,7	0,72	0,29	1,78	0,78
TH17015	21,8	31,5	0,4	0,32	0,31	1,11
p-value	0,625		0,449219		0,375	
q-value	0,854949		0,854949		0,854949	
	CD14 ⁺ , IL-4+ A	CD14 ⁺ , IL-4+ B	CD14 ⁺ , IL-9+ A	CD14 ⁺ , IL-9+ B	CD14 ⁺ , IL-10+ A	CD14 ⁺ , IL-10+ B
TH17006	2,55	0,91	0,00572	0	1,16	0,62
TH17007	1,78	1,4	0,00839	0	0,042	0,42
TH17008	0,45	0,67	0,017	0,011	0,15	0,17
TH17009	0,5	0,61	0	0	0,071	0,15
TH17010	0,34	1,06	0	0	0,079	0,36
TH17011	0,8	0,96	0	0	0,77	0,48
TH17012	1,61	1,23	0	0	0,54	0,31
TH17013	0,74	1,21	0	0	0,28	0,35
TH17014	2,35	0,88	0,052	0	0,078	0,29
TH17015	0,39	1,26	0,063	0,22	0,15	0,24
p-value	0,984375		0,625		0,769531	
q-value	0,994219		0,854949		0,854949	
	CD14 ⁺ , IL-13+ A	CD14 ⁺ , IL-13+ B	CD14 ⁺ , IL-17A+ A	CD14 ⁺ , IL-17A+ B	CD14 ⁺ , IL-17f+ A	CD14 ⁺ , IL-17f+ B
TH17006	18,2	4,66	30,3	11,3	17,1	4,19
TH17007	1,89	8,56	4,06	10,2	7,51	4,64
TH17008	2,86	2,08	0,47	5,6	7,55	5,41
TH17009	3,84	2,74	0,21	1,33	2,17	11
TH17010	8	5,24	1,72	2,66	3,52	3,56
TH17011	12,2	3,91	9,48	8,06	4,11	3,35
TH17012	5,62	4,3	4,45	1,81	6,61	6,77
TH17013	6,36	7,55	3,17	17,8	2,77	3,31
TH17014	6,59	6,24	8,38	8,62	7,6	5
TH17015	3,43	5,72	5,55	20,2	3,78	10,8
p-value	0,375		0,431641		0,695313	
q-value	0,854949		0,854949		0,854949	
	CD14 ⁺ , IL-21+ A	CD14 ⁺ , IL-21+ B	CD14 ⁺ , IL-22+ A	CD14 ⁺ , IL-22+ B		
TH17006	5,47	1,67	0,23	0		
TH17007	1,24	3,54	1,16	5,13		
TH17008	0,23	0,21	0,05	0,65		
TH17009	0,21	0,43	1,04	1,33		
TH17010	1,03	4,2	0,026	0,92		
TH17011	1,67	1,04	10,8	4,51		
TH17012	1,62	2,04	0,79	1,14		
TH17013	1,3	2,16	0,56	1,23		
TH17014	4,03	2,5	1,03	0,34		
TH17015	3,33	6,58	0,54	0,63		
p-value	0,556641		0,431641			
q-value	0,854949		0,854949			

CD14⁺CD3⁻CD20⁻ MFI

	CD14 ⁺ , TNFa ⁺ A	CD14 ⁺ , TNFa ⁺ B	CD14 ⁺ , GM-CSF ⁺ A	CD14 ⁺ , GM-CSF ⁺ B	CD14 ⁺ , IFN-g ⁺ A	CD14 ⁺ , IFN-g ⁺ B
TH17006	15980	14889	127	3	763	408
TH17007	23340	24284	982	449	502	645
TH17008	13204	15298	220	30	319	126
TH17009	13717	17945	372	40	500	561
TH17010	11496	13404	236	817	473	607
TH17011	10213	10884	133	563	779	647
TH17012	25457	15407	958	831	701	700
TH17013	16852	13759	854	1006	720	687
TH17014	26896	17206	393	359	833	514
TH17015	12430	16977	505	867	357	607
p-value	>0,999999		0,921875		0,625	
q-value	>0,999999		>0,999999		0,991964	
	CD14 ⁺ , IL-4 ⁺ A	CD14 ⁺ , IL-4 ⁺ B	CD14 ⁺ , IL-9 ⁺ A	CD14 ⁺ , IL-9 ⁺ B	CD14 ⁺ , IL-10 ⁺ A	CD14 ⁺ , IL-10 ⁺ B
TH17006	1001	895	2461	2008	982	1210
TH17007	891	650	1427,2	1684	156	448
TH17008	326	519	1203	1041	426	359
TH17009	419	625	1433	1319	52	381
TH17010	59	674	2111	1835	386	222
TH17011	118	356	1864	1610	581	239
TH17012	710	758	1890,6	1636	512	279
TH17013	524	611	1814,2	1920,6	333	505
TH17014	1092	796	1696	1874	400	343
TH17015	267	716	1159	2047	467	946
p-value	0,375		0,507813		0,556641	
q-value	0,991964		0,991964		0,991964	
	CD14 ⁺ , IL-13 ⁺ A	CD14 ⁺ , IL-13 ⁺ B	CD14 ⁺ , IL-17A ⁺ A	CD14 ⁺ , IL-17A ⁺ B	CD14 ⁺ , IL-17f ⁺ A	CD14 ⁺ , IL-17f ⁺ B
TH17006	2052	1534	6531	6934	2053	1524
TH17007	1132	1390	4027	3701	2251	1194
TH17008	1009	854	4410	3532	1768	1312
TH17009	1277	1134	4069	4801	1845	2241
TH17010	1500	1368	2422	2445	2147	2358
TH17011	1382	1153	1653	2069	1818	2197
TH17012	1543	1351	4231	3660	1940	2104
TH17013	1566	1642	3631	2071	1869	2060
TH17014	1498	1573	5955	6387	3048	2746
TH17015	1015	1732	4633	7654	1906	2478
p-value	0,556641		0,845703		0,921875	
q-value	0,991964		>0,999999		>0,999999	
	CD14 ⁺ , IL-21 ⁺ A	CD14 ⁺ , IL-21 ⁺ B	CD14 ⁺ , IL-22 ⁺ A	CD14 ⁺ , IL-22 ⁺ B		
TH17006	2954	3146	188	1008		
TH17007	2009	1987	109	866		
TH17008	436	836	739	213		
TH17009	621	1325	539	178		
TH17010	537	2489	2595	409		
TH17011	677	808	732	119		
TH17012	2415	1857	291	299		
TH17013	1428	2071	183	138		
TH17014	3454	2750	378	378		
TH17015	1929	3608	413	123		
p-value	0,167969		0,496094			
q-value	0,991964		0,991964			

9.5 Ernährungstagebuch

Ernährungstagebuch

Name:

1.Tag	Ernährung	Frühstück	
		Mittag	
		Abendbrot	
		Zwischenmahlzeiten	
	Stuhlgang	☐ Flüssig ☐ breiig ☐ fest ☐ anderes: Anzahl:	
2.Tag	Ernährung	Frühstück	
		Mittag	
		Abendbrot	
		Zwischenmahlzeiten	
	Stuhlgang	☐ Flüssig ☐ breiig ☐ fest ☐ anderes: Anzahl:	
3. Tag	Ernährung	Frühstück	
		Mittag	
		Abendbrot	
		Zwischenmahlzeiten	
	Stuhlgang	☐ Flüssig ☐ breiig ☐ fest ☐ anderes: Anzahl:	
4. Tag	Ernährung	Frühstück	
		Mittag	
		Abendbrot	
		Zwischenmahlzeiten	
	Stuhlgang	☐ Flüssig ☐ breiig ☐ fest ☐ anderes: Anzahl:	
5.Tag	Ernährung	Frühstück	
		Mittag	
		Abendbrot	
		Zwischenmahlzeiten	
	Stuhlgang	☐ Flüssig ☐ breiig ☐ fest ☐ anderes: Anzahl:	
6. Tag	Ernährung	Frühstück	
		Mittag	
		Abendbrot	
		Zwischenmahlzeiten	
	Stuhlgang	☐ Flüssig ☐ breiig ☐ fest ☐ anderes: Anzahl:	
7.Tag	Ernährung	Frühstück	
		Mittag	
		Abendbrot	
		Zwischenmahlzeiten	
	Stuhlgang	☐ Flüssig ☐ breiig ☐ fest ☐ anderes: Anzahl:	
8.Tag	Ernährung	Frühstück	
		Mittag	
		Abendbrot	

		Zwischenmahlzeiten	
	Stuhlgang	☐ Flüssig ☐ breiig ☐ fest ☐ anderes: Anzahl:	
9.Tag	Ernährung	Frühstück	
		Mittag	
		Abendbrot	
		Zwischenmahlzeiten	
	Stuhlgang	☐ Flüssig ☐ breiig ☐ fest ☐ anderes: Anzahl:	
10.Tag	Ernährung	Frühstück	
		Mittag	
		Abendbrot	
		Zwischenmahlzeiten	
	Stuhlgang	☐ Flüssig ☐ breiig ☐ fest ☐ anderes: Anzahl:	
11.Tag	Ernährung	Frühstück	
		Mittag	
		Abendbrot	
		Zwischenmahlzeiten	
	Stuhlgang	☐ Flüssig ☐ breiig ☐ fest ☐ anderes: Anzahl:	
12. Tag	Ernährung	Frühstück	
		Mittag	
		Abendbrot	
		Zwischenmahlzeiten	
	Stuhlgang	☐ Flüssig ☐ breiig ☐ fest ☐ anderes: Anzahl:	
13. Tag	Ernährung	Frühstück	
		Mittag	
		Abendbrot	
		Zwischenmahlzeiten	
	Stuhlgang	☐ Flüssig ☐ breiig ☐ fest ☐ anderes: Anzahl:	
14. Tag	Ernährung	Frühstück	
		Mittag	
		Abendbrot	
		Zwischenmahlzeiten	
	Stuhlgang	☐ Flüssig ☐ breiig ☐ fest ☐ anderes: Anzahl:	
15. Tag	Ernährung	Frühstück	
		Mittag	
		Abendbrot	
		Zwischenmahlzeiten	
	Stuhlgang	☐ Flüssig ☐ breiig ☐ fest ☐ anderes: Anzahl:	
16. Tag	Ernährung	Frühstück	
		Mittag	
		Abendbrot	
		Zwischenmahlzeiten	
	Stuhlgang	☐ Flüssig ☐ breiig ☐ fest ☐ anderes: Anzahl:	

		Anzahl:	
17. Tag	Ernährung	Frühstück	
		Mittag	
		Abendbrot	
		Zwischenmahlzeiten	
	Stuhlgang	☐ Flüssig ☐ breiig ☐ fest ☐ anderes:	
	Anzahl:		
18. Tag	Ernährung	Frühstück	
		Mittag	
		Abendbrot	
		Zwischenmahlzeiten	
	Stuhlgang	☐ Flüssig ☐ breiig ☐ fest ☐ anderes:	
	Anzahl:		
19. Tag	Ernährung	Frühstück	
		Mittag	
		Abendbrot	
		Zwischenmahlzeiten	
	Stuhlgang	☐ Flüssig ☐ breiig ☐ fest ☐ anderes:	
	Anzahl:		
20. Tag	Ernährung	Frühstück	
		Mittag	
		Abendbrot	
		Zwischenmahlzeiten	
	Stuhlgang	☐ Flüssig ☐ breiig ☐ fest ☐ anderes:	
	Anzahl:		
21. Tag	Ernährung	Frühstück	
		Mittag	
		Abendbrot	
		Zwischenmahlzeiten	
	Stuhlgang	☐ Flüssig ☐ breiig ☐ fest ☐ anderes:	
	Anzahl:		

9.6 Beipackzettel OMNi-BiOTiC® 10



40712-1
Art.-Nr. 88655 / XII.19

OMNi-BiOTiC® 10 ist ein Nahrungsergänzungsmittel mit 10 natürlich im menschlichen Darm vorkommenden Bakterienstämmen.

Liebe Kundin, lieber Kunde,

wir freuen uns, dass Sie sich für OMNi-BiOTiC® 10 entschieden haben. OMNi-BiOTiC® 10 ist ein Qualitätsprodukt aus der Produktreihe OMNi-BiOTiC®. Die Entwicklung jedes einzelnen Produktes beruht darauf, dass der Darm für den gesamten Organismus eine zentrale Rolle spielt.

Unser Darm wird von Billionen von Darmsymbionten aus einer Vielzahl von Bakterienstämmen besiedelt. Eine hohe Diversität im Darm ist von großer Bedeutung, denn verschiedene Stämme übernehmen im Darm auch verschiedene Aufgaben.

1. Was ist OMNi-BiOTiC® 10?

OMNi-BiOTiC® 10 ist ein Nahrungsergänzungsmittel und enthält 10 natürlich im menschlichen Darm vorkommende Bakterienstämme. Die Lebens- und Vermehrungsfähigkeit der speziell aufeinander abgestimmten Bakterien wird bis zum Mindesthaltbarkeitsdatum garantiert.

2. Wie wird OMNi-BiOTiC® 10 angewandt?

Während der gesamten Antibiotika-Therapie 2x täglich 1 Beutel OMNi-BiOTiC® 10 (= 5 g) in ca. 1/8 l Wasser einrühren, mindestens 1 Minute Aktivierungszeit abwarten, nochmals umrühren und dann trinken. Nach der Antibiotika-Therapie möglichst noch 14 Tage lang 1x täglich 1 Beutel einnehmen. Kinder bis zu 3 Jahren nehmen die halbe Dosierungsmenge. Empfehlenswert ist die Einnahme auf möglichst leeren Magen. Wenn Sie OMNi-BiOTiC® 10 2x täglich einnehmen, empfiehlt sich die Anwendung vor dem Frühstück und vor dem Abendessen.

Im Idealfall sollte zwischen der Einnahme von OMNi-BiOTiC® 10 und dem Antibiotikum ein Abstand von mind. 1 Stunde eingehalten werden.

Da OMNi-BiOTiC® 10 ausschließlich natürlich im menschlichen Darm vorkommende Bakterien enthält, kann die Einnahme auch während Schwangerschaft und Stillzeit erfolgen.

OMNi-BiOTiC®-Produkte enthalten in kleinen Mengen unterschiedliche Ballaststoffe, die den Bakterien als spezifische Nahrung dienen, z.B. auch Fructooligosaccharide (FOS) oder Inulin. Wenn eine Fructoseunverträglichkeit bekannt ist, sollten Sie die Aktivierungszeit von OMNi-

BiOTiC® 10 auf 30 Minuten verlängern. In dieser Zeit verstoffwechseln die Bakterien ihre Nahrung (= Fructooligosaccharide, Inulin etc.) fast vollständig, sodass höchstens noch einzelne Moleküle dieser Stoffe in den Darm gelangen.

3. Was enthält OMNi-BiOTiC® 10?

Ein Beutel (= 5 g) enthält 5 Milliarden Bakterien aus 10 ausgewählten Bakterienstämmen:

<i>Lactobacillus acidophilus</i> W55	<i>Lactobacillus salivarius</i> W24
<i>Lactobacillus acidophilus</i> W37	<i>Lactobacillus plantarum</i> W62
<i>Lactobacillus paracasei</i> W72	<i>Bifidobacterium bifidum</i> W23
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> W71	<i>Bifidobacterium lactis</i> W18
<i>Enterococcus faecium</i> W54	<i>Bifidobacterium longum</i> W51

OMNi-BiOTiC® 10 ist frei von tierischem Eiweiß, Gluten, Hefe und Lactose und für Milchallergiker geeignet.

Nährwertangaben:

	pro 5 g (= 1 Port.)	10 g	100 g
Brennwert	77,60 kJ	155,20 kJ	1.552 kJ
	18,55 kcal	37,10 kcal	371 kcal
Fett	< 0,01 g	0,01 g	0,10 g
davon gesättigte Fettsäuren	< 0,01 g	< 0,01 g	0,02 g
Kohlenhydrate	4,52 g	9,04 g	90,40 g
davon Zucker	0,19 g	0,38 g	3,78 g
Eiweiß	0,11 g	0,22 g	2,20 g
Salz	0,03 g	0,07 g	0,66 g

Zutaten:

Maisstärke, Maltodextrin, Inulin, Kaliumchlorid, Reisprotein, Magnesiumsulfat, Fructooligosaccharide (FOS), Bakterienstämme, Enzyme (Amylasen), Vanillearoma, Mangansulfat

4. Wechselseitige und unerwünschte Effekte:

Es sind keine wechselseitigen Effekte von OMNi-BiOTiC® 10 mit Arzneimitteln bekannt.

5. Weitere Informationen:

OMNi-BiOTiC® 10 sollte trocken und bei Raumtemperatur gelagert werden, die Aufbewahrung im Kühlschrank ist nicht erforderlich.

Bitte wenden >

Ergänzend zu OMNi-BiOTiC® 10 empfehlen wir:



MikroSan

- Elixer mit 31 verschiedenen, aktiven Mikroorganismen.
- Ergänzt mit einer Kräuter- und Pflanzenmischung aus 24 Zutaten, wie Anis, Fenchel oder Salbei.



metacare® Colon Lecithin

- Mit Phosphatidylcholin, die Bestandteil der Membranen aller Zellen des Körpers, so auch jener des Darms, sind; der Aminosäure L-Glutamin, sowie der pflanzlichen Kraft von Wermut.
- Kombiniert mit Zink und den Vitaminen B6 und B12, sowie Molybdän.

Nahrungsergänzungsmittel sind kein Ersatz für abwechslungsreiche und ausgewogene Ernährung. Achten Sie auf eine gesunde Lebensweise. Empfohlene Tagesdosis nicht überschreiten. Außerhalb der Reichweite von kleinen Kindern aufbewahren.

OMNi-BiOTiC® 10 – Wissenschaftlich geprüft
Ein Qualitätsprodukt des Institut AllergoSan

www.allergosan.com
www.omni-biotic.com

Institut
AllergoSan

9.7 Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Andreas Stallmach für die Betreuung meiner Arbeit. Vielen Dank für die großartige Begleitung und Unterstützung von Beginn bis zum Ende dieser Studie. Seine hilfreichen Ideen, ausgezeichnete Betreuung, konstruktiven Kommentare und wertvollen Anregungen haben diese Arbeit stets gefördert.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. rer. nat. Sven Stengel und Arndt Steube, die mich im gastroenterologischen Labor vom UKJ betreut haben. Vielen Dank für die unkomplizierte Zusammenarbeit. Für jedes Problem wurde schnell eine Lösung gefunden. Die nette Arbeitsatmosphäre und ständige Unterstützung haben diese Studie konstant vorangetrieben.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Christina Zielinski, Dr. rer. nat. Sommermann und allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die Mitbetreuung und Unterstützung meiner experimentellen Arbeit.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Pieper vom HZI in Braunschweig danke ich für Bearbeitung und Auswertung der Stuhlproben.

Auch möchte ich mich bei meinen Freunden, besonders bei Chrissy, Johanna, Leonie und Steffi, bedanken, die mich immer unterstützt und mit motivierenden Worten gestärkt haben.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich das ganze Studium auf allen Ebenen unterstützt haben und diese Arbeit in vielen Perspektiven bestärkt und bereichert haben.