

2. Literaturübersicht

2.1. Aufbau des Darmes

Als Darmkanal bezeichnet man den Abschnitt des Tubulus alimentarius, der als Mittel- und Enddarm in Form eines vielfältig gewundenen Schlauchs vom Pylorus bis zum After reicht (SCHWARZE, 1962; SMOLLICH, MICHEL, 1992).

Der Mitteldarm besteht aus drei Abschnitten: dem Zwölffingerdarm (Duodenum), dem Leerdarm (Jejunum) und dem Hüftdarm (Ileum).

Auch der Enddarm setzt sich aus drei Einzelabschnitten, dem Blinddarm (Caecum), dem Grimmdarm (Colon) und dem Mastdarm (Rektum), zusammen.

Der Darm dient der Verdauung und der Nährstoffabsorption sowie der Ausscheidung (SCHWARZE, 1962; SMOLLICH, MICHEL, 1992). Am ergiebigsten sind Verdauung und Nährstoffabsorption im Dünndarm, der bei einem ausgewachsenen Schwein eine Länge von 16 bis 21 m erreicht. Zusammen mit dem Dickdarm, der 3,5 bis 6 m lang ist, kommt der Darm auf eine Gesamtlänge von 19,5 bis 27 m, das entspricht in etwa dem 15fachen der Körperlänge des Schweins.

2.1.1. Der Dünndarm

Der Dünndarm ist der längste Abschnitt des Verdauungskanal, in dessen Lumen die Nahrung viele Stunden verweilt und damit einen engen Kontakt mit den Verdauungsenzymen aus der Bauchspeicheldrüse und den Sekreten der Galle und Darmdrüsen sowie mit der resorbierenden Darmschleimhaut hat. Hier werden die Nahrungsstoffe verdaut und die dabei entstandenen Stoffe resorbiert.

Das Duodenum geht in Höhe des 11. Interkostalraumes, etwa an der Grenze zwischen dem dorsalen und mittleren Drittel der Bauchhöhle, aus dem Pylorus hervor (BERG, 1988).

Es liegt zum größten Teil in der rechten Seite der Bauchhöhle und hat bei einem ausgewachsenen Schwein eine Länge von 0,7 bis 1 m (SCHWARZE, 1962).

Es beginnt mit seiner Pars cranialis duodeni an der Eingeweidefläche der Leber nach craniodorsal aufsteigend, bildet ventral der rechten Niere eine horizontale s-förmige

Krümmung, die Flexura duodeni cranialis, und geht von hier aus in die Pars descendens über, die an einem 60–100 mm breiten Gekröse befestigt ist.

Von hier verläuft das Duodenum ventral der rechten Niere nach caudal und biegt als Flexura duodeni caudalis nach links in die Pars transversa, die nach rechts biegend in die Pars ascendens übergeht. Diese verläuft zunächst dicht neben der Medianebene, vom Colon descendens begleitet und durch die Plica duodenocolica mit diesem verbunden, nach links und dorsal, um sich dann in der Höhe der A. mesenterica cranialis nach rechts zu wenden und, dem Colon transversum anliegend, in einem scharfen Bogen in das Jejunum überzugehen (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE, 1987).

Das Jejunum, das bei einem ausgewachsenen Schwein eine Länge von etwa 15 bis 20 m erreicht (SCHWARZE, 1962), hängt in zahlreichen engbogigen Schlingen (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE, 1987) an einer breiten Gekröseplatte (SMOLLICH, MICHEL, 1992). Es nimmt zusammen mit dem Colonkonvolut den caudoventralen Bereich der Bauchhöhle ein (DYSE, SACK, WENSING, 1991).

Das Jejunum füllt einen großen Teil der rechten Bauchhöhlenhälfte aus, wobei einige Schlingen auch im linken ventralen Bereich liegen können. Die Schlingen reichen von Magen und Leber bis zum Beckeneingang (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE, 1987) und haben mit fast allen Organen der Bauchhöhle Kontakt (BERG, 1988). Sie erreichen dorsal das Duodenum, das Pankreas, die rechte Niere, den Endabschnitt des Colon descendens, die Harnblase und bei weiblichen Tieren den Uterus.

Des Weiteren liegen die Schlingen großflächig der rechten Bauchwand an und umlagern das Colon ascendens sowie vor dem Beckeneingang das Caecum (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE, 1987).

Links im mittleren Abschnitt und in halber Höhe der Bauchhöhle geht aus dem Jejunum das Ileum hervor (BERG, 1988). Dieses ist von außen nicht vom Jejunum zu unterscheiden. Eine Abgrenzung erfolgt durch das Ligamentum ileocaecale, das am antimesenterialen Rand des Ileums ansetzt. Das Ende des Ileums wendet sich nach rechts und etwas dorsal und mündet an der Grenze zwischen Caecum und Colon mit dem Ostium ileale in Hüftnähe in den Dickdarm ein (SCHWARZE, 1962). Das Mündungsstück ragt in Form eines 1,5 bis 2,5 cm langen Zapfens (Papilla ilealis) (SCHWARZE, 1962), in dem die Ringmuskulatur verdoppelt ist (M.sphincter ilei) (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE, 1987), spitzwinklig in den Dickdarm hinein.

2.1.2. Der Dickdarm

Die Länge des gesamten Enddarms beträgt bei einem ausgewachsenen Schwein 3,5 bis 6 m, davon fallen 0,3 bis 0,4 m auf das Caecum, das ein Fassungsvermögen von 1,5 bis 2,2 l hat. Es liegt als stumpfkegelförmiger Sack (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE, 1987) ventral des caudalen Pols der linken Niere in der linken Bauchhöhle und verläuft caudoventral. Sein nach caudal gerichteter Anfangsabschnitt liegt links der dorsalen und seitlichen Bauchwand an. Das blinde Ende überragt bei schwach gefülltem Magen die Medianebene nach rechts (BERG, 1988) und erreicht mit seiner Spitze die linke Leistengegend (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE, 1987). Bei leerem Magen verlagern sich die Jejunumschlingen vor das Colonkonvolut nach links, und das Caecum liegt dann in der rechten Bauchhöhle.

Das Caecum besitzt drei Bandstreifen (Taeniae caeci) und drei Poschenreihen (Haustra) (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE, 1987), die das sonst glatte Darmrohr zu einem „Standdarm“ (SCHWARZE, 1962) umgestalten, der die Leistungsfähigkeit steigert. Der „Standdarm“ entsteht durch taschenartige Vorbuchtungen (Poschen) der zwischen den Bandstreifen verbleibenden dünnen Darmwand (SCHWARZE, 1962).

Die ventrale Taenie dient als Ansatz für die Plica ileocaecalis. Die laterale und mediale Taenie sind frei und gehen an der Spitze ineinander über (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE, 1987).

Das Colon besteht aus drei Unterabschnitten, dem Colon ascendens, das beim Schwein ein arttypisches Spezifikum darstellt, da es eine beträchtliche Länge aufweist und durch sein kurzes Gekröse zu einem kegel-, bienenkorb- bzw. turbanähnlichem Colonkegel aufgerollt ist, dem Colon transversum und dem Colon descendens, die zusammen mit dem Rektum bei einem ausgewachsenen Schwein eine Länge von 3 bis 5 m erreichen können (SCHWARZE, 1962; NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE, 1987).

Das Colon ascendens geht in Höhe des dritten Lendenwirbels aus dem etwas breiteren Caecum hervor, liegt dicht beckenwärts von Leber und Magen in den cranialen zwei Dritteln der linken Hälfte der Bauchhöhle und grenzt zum größten Teil unmittelbar an die linke Bauchwand (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE, 1987). Der Colonkegel besteht aus vier äußeren, verhältnismäßig weiten, spiraligen, zentripetalen Windungen (Gyri centripetales) und drei inneren, zentrifugalen Windungen (Gyri centrifugales) (SCHWARZE, 1962).

Die Außenwindungen sind mit zwei Taenien und zwei Poschenreihen besetzt (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE, 1987). An den zentrifugalen Windungen hingegen sind die Taenien anfangs nur undeutlich vorhanden und fehlen schließlich ganz (SCHWARZE, 1962). Der Colonkegel ist mit seiner Basis dorsal an der Bauchwand in der Nähe der linken Niere und des Pankreas durch eine breitflächige Verklebung fixiert (DYCE, SACK, WENSING, 1991).

Die Achse des Colonkegels ist senkrecht nach unten gerichtet und kann sowohl nach cranioventral und caudoventral ausweichen als auch in halber Höhe nach rechts oder links abknicken, so dass die Kuppe des Colonkegels der rechten oder linken Bauchwand in verschiedenen Höhen anliegt (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE, 1987).

Aus der letzten zentrifugalen Windung tritt das Colon ascendens frei hervor, bildet eine Endschleife, die bis zum Magen reicht, verläuft dann cranial der A. mesenterialis cranialis als Colon transversum nach links und geht nahe der Medianen ins Colon descendens über, das beckenwärts umbiegt, an einem kurzen, fettgewebsreichen Gekröse angeheftet ist und dann schließlich ins Rektum übergeht (SCHWARZE, 1962; NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE, 1987). Auch das Rektum ist in Fettgewebe eingebettet.

Bei Ferkeln kommt es im Laufe der Entwicklung durch den Vorsprung des Längenwachstums einiger Darmstrecken zu einer Verlängerung des Mesocolon descendens direkt im Anschluss an das Colon transversum und vor dem Übergang ins Rektum zu einer Bildung des zeitlich begrenzten Colon sigmoideum.

Die deutliche Erweiterung des Rektums (Ampulla recti) geht in der Beckenhöhle in den After über (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE, 1987).

2.2.Histologie des Darmes

2.2.1. Allgemeiner Aufbau

Der Aufbau der Darmwand entspricht dem allgemeinen Bauprinzip des Tubulus alimentarius. Von außen nach innen besteht die Wand aus der Serosa (Tunica serosa), welche eine Fortsetzung des Gekröses darstellt, der Muskelhaut (Tunica muscularis), die aus glatten Muskelfasern besteht, der Tela submucosa und der Schleimhaut (Tunica mucosa) (SCHWARZE, 1962), die sich aus drei Teilen, dem Epithelium mucosae, der Lamina propria

mucosae und der Lamina muscularis mucosae zusammensetzt (SMOLLICH, MICHEL, 1992).

Das Epithelium mucosae besteht aus einem einschichtigen, hochprismatischen Epithel, das im Wesentlichen folgende Zelltypen enthält:

1. Saumzellen (Enterozyten), die kugelförmige oder ellipsoid konturierte Kerne besitzen und die ihren Namen daher haben, dass sie mit einem etwa 1 mm breiten gestreiften Saum zum Darmlumen abschließen. Der Saum besteht aus einem morphologischen Korrelat eines dichten Mikrovillenbesatzes;
2. Becherzellen, welche den Prototyp einzelliger Drüsen darstellen. Die von ihnen produzierten Glycoproteine, die als Sekretgranula freigesetzt werden und einen Schutz- und Gleitfilm über der Darmoberfläche bilden, werden in Form von Sekretröpfchen supranukleär gespeichert, treiben somit diesen Zellabschnitt auf und geben der Zelle die typische Becherform. Der schlanke basale Zellabschnitt enthält den deformiert erscheinenden Zellkern sowie den Hauptteil der übrigen Zellorganellen;
3. M-Zellen, die im Bereich der lymphoretikulären Einrichtungen der Darmschleimhaut, insbesondere im Ileum zu finden sind. Diese gehen vermutlich aus unreifen Enterozyten hervor (SMOLLICH, MICHEL, 1992). Die M-Zellen liegen entweder einzeln oder in Form kleiner Zellgruppen im seitlichen Domepithel. Unter Dome versteht man breite Schleimhauterhabenheiten, die über den Noduli lymphatici solitarii et aggregatii (Peyer' Plaques) liegen. M-Zellen sind am Immungeschehen der Darmschleimhaut in der Form beteiligt, dass sie Antigene aufnehmen und transepithelial transportieren, um dann mit den immunkompetenten Zellen der darmassoziierten lymphoretikulären Immuneinrichtungen in Kontakt zu treten (SMOLLICH, MICHEL, 1992; GEBERT, 1999).
4. Paneth' Zellen, sind Drüsenzellen, die sich vor allem im Bereich des Kryptengrundes befinden und große azidophile Sekretgranula enthalten. Ihre Anzahl nimmt im Verlauf vom Duodenum zum Ileum zu. Das von ihnen produzierte Sekret, das ins Drüsen- bzw. Darmlumen abgegeben wird, beinhaltet u.a. das bakterizid wirkende Lysozym (HILGENBRINK, 1987; SMOLLICH, MICHEL, 1992; SCHWARZBACHER, 2004;).
5. enteroendokrine Zellen sind Zelltypen des gastrointestinalen Hormonsystems, die, genau wie die Paneth' Zellen, einzeln oder in kleinen Gruppen, vorrangig im Bereich der Kryptenbasis auftreten. Die von ihnen sezernierten Hormone sind an der Regulation der Sekretion des Magens und des Pankreas sowie der Kontraktion der Gallenblase beteiligt. Sie machen insgesamt etwa 1-3% der Gesamtepithelzahl aus (SMOLLICH, MICHEL, 1992; SCHWARZBACHER, 2004).

Unmittelbar unter dem Epithel befindet sich die Lamina propria mucosae, die ein lockeres Bindegewebe aus feinem Kollagen, elastischen und retikulären Fasern darstellt. Sie enthält lymphatisches Gewebe mit immunkompetenten T- und B-Lymphozyten, Blutgefäße zur Versorgung des Epithels, Lymphkapillaren sowie Nerven (DELLMANN, EURELL, 1998). An die Lamina propria mucosae schließt sich die Lamina muscularis mucosae an, die nicht konstant vorhanden ist und aus ein bis drei Schichten glatter Muskulatur besteht (DELLMANN, EURELL, 1998). Die sich überkreuzenden Muskelzüge, die in Form von Links- und Rechtsspiralen verlaufen, bilden ein verstellbares Scherengitter (SMOLLICH, MICHEL, 1992), das der Schleimhaut eine von der Submucosa unabhängige Bewegung erlaubt (DELLMANN, EURELL, 1998). Die Lamina muscularis mucosae wird stellenweise von Submucosadrüsen und lymphoretikulären Einrichtungen unterbrochen (SMOLLICH, MICHEL, 1992). Zwischen der Tunica mucosa (Epithelium mucosae) und der Tunica muscularis liegt eine Schicht aus lockerem Bindegewebe, die Tela submucosa. Diese enthält größere Lymph- und Blutgefäße, den submucösen Nervenplexus (Meissnerscher Plexus), sowie im Duodenum die Submucosa-Drüsen (DELLMANN, EURELL, 1998). Die Tela submucosa fungiert als Verschiebeschicht, die eine Schleimhautbewegung und die Darmperistaltik ermöglicht. Sie enthält kollagene Faserbündel, die ein verstellbares Scherengitter bilden und damit zu einer Längenänderung und Dehnung des Darmrohres beitragen (SMOLLICH, MICHEL, 1992).

Die Tunica muscularis besteht aus zwei Schichten glatter Muskulatur, deren Fasern innen zirkulär und außen longitudinal verlaufen. Zwischen den beiden Muskelschichten befindet sich das Stratum intermusculare, das aus Bindegewebe mit elastischen Elementen besteht und das einen Ganglion-Nerven-Plexus, den Auerbach-Plexus (Plexus myentericus) enthält. Die Aufgabe dieser Schicht besteht darin, die Ingesta durch den Verdauungstrakt zu bewegen und sie mit Drüsensekreten zu vermischen.

Den äußeren Abschluss bildet die Tunica serosa. Sie besteht aus Mesothel und enthält neben einer bindegewebigen Propria und einer Tela submucosa, feinere Nervennetze und viele elastische Elemente sowie z. T. auch größere Fetteinlagerungen (SMOLLICH, MICHEL, 1992).

2.2.2. Histologischer Aufbau des Dünndarms

Wesentlichstes Merkmal und entscheidendes Kriterium zur Abgrenzung zum Dickdarm sind die fingerförmigen Zotten, die eine Länge von etwa einem Millimeter haben und die Schleimhautoberfläche um ein 20faches vergrößern. Der Gesamtwuchs der Absorbtiionsfläche des Dünndarms steigt durch Schleimhautfalten, Darmzotten und den Mikrovillibesatz der Darmepithelzellen um das 600fache (JUNGUEIRA, CARNEIVO, 1986; SMOLLICH, MICHEL, 1992).

Die Zotten sind im Jejunum am längsten, am Anfang des Duodenums und im Endteil des Ileums kürzer und verlieren sich im Bereich des Ostium ileale schließlich ganz.

Auf der Schleimhautoberfläche kommen etwa 20 bis 40 Zotten pro mm² vor. Die Zotten sind Aufwerfungen der Mucosa und bestehen aus dem Oberflächenepithel des Darms, dessen Zellen im Bereich der Zottenspitze besonders hoch sind, der Lamina muscularis mucosae und der Lamina propria mucosae.

Die Zotten enthalten glatte Muskelzellen, die teilweise mit der Lamina muscularis mucosae verbunden sind, sie befähigen die Zotten zu rhythmischen Kontraktionen, die etwa vier- bis sechsmal in der Minute erfolgen.

Bei Verkürzung und Verdickung der Zotten werden gleichzeitig die Zottengefäße ausgepresst. Durch die langsame Entspannung und Streckung der Zotten wird der notwendige Kontakt mit dem Darminhalt für die Absorption hergestellt, und es kommt wieder zur Füllung der Zottengefäße. Außer den Muskelfasern sind auch Retikulinfasern und elastische Fasern des Zottenstromas an dieser „Zottenpumpe“ beteiligt. Die Aufgabe der Zottenkontraktion besteht darin, das mit Monosacchariden und Aminosäuren angereicherte Blut und die mit Fett beladene Lymphe beschleunigt abzutransportieren (SMOLLICH, MICHEL, 1992).

Die Oberfläche des Dünndarms ist mit dem zuvor beschriebenen einschichtigen, hochprismatischen Epithel bedeckt, das sich aus Saumzellen, Becherzellen, endokrinen Zellen und Paneth- Zellen zusammensetzt. Die Anzahl der Becherzellen ist im Gegensatz zu den Saumzellen gering und nimmt von der Zottenbasis zur Zottenspitze ab. Sie ist im Ileum zwei- bis dreimal größer als im Duodenum (DELLMANN, EURELL, 1998).

Die Enterozyten stehen untereinander durch Schlussleisten bzw. mehr oder weniger komplette Verzahnung miteinander in Verbindung. Sie tragen auf ihrer apikalen Zelloberfläche ca.3000 dicht stehende, zahlreiche Mikrovilli, mit einer Länge von 1 bis 2 µm und einem Durchmesser von 0,1 µm, deren Gesamtheit den Bürstensaum bildet. Sie sind mit

einer Glykokalix bedeckt und damit resistent gegen proteolytische und mucolytische Enzyme (JUNGUEIRA, CARNEIVO, 1986). Ihre Aufgabe besteht zum einen darin, die Oberfläche zu vergrößern, und zum anderen, mit ihrem Enzymbestand (Bürstensaumenzyme) zur Verdauung beizutragen und schließlich der Resorption zu dienen (JUNGUEIRA, CARNEIVO, 1986). Eine Bewegung der Mikrovilli erfolgt dadurch, dass sie Bündel längsgerichteter Actinfilamente enthalten, die in den horizontal verlaufenden Anteilen des Zytoskeletts des Enterozyten verankert sind; bei einer Verschiebung dieses Zytoskeletts kommt es zu einer Verkürzung der Mikrovilli (JUNGUEIRA, CARNEIVO, 1986). Zwischen den Zotten befinden sich die Öffnungen der unverzweigten, geraden, tubulären Drüsen, Glandulae intestinales, Lieberkühn' Krypten, deren Epithel mit dem Oberflächenepithel kontinuierlich zusammenhängt und auch funktionell mit ihm verbunden ist. Sie liefern den Ersatz der an den Zottenspitzen abgestoßenen Epithelzellen, die in der Kryptentiefe gebildet werden und dann als kontinuierlicher Zellstrom zur Zottenoberfläche wandern (JUNGUEIRA, CARNEIVO, 1986; DELLMANN, EURELL, 1998).

Die Lieberkühn' Krypten liegen in der Lamina propria mucosae und reichen bis zur Lamina muscularis mucosae. Zwischen ihrem einschichtigem, hochprismatischem Drüsenepithel befinden sich mehr Becherzellen als im Oberflächenepithel (SMOLLICH, MICHEL, 1992).

Eine weitere Besonderheit des Dünndarms sind die Duodenaldrüsen oder auch Brunnersche Drüsen, die vom tubulo- alveolären, serösen (DELLMANN, EURELL, 1998) Typ sind und in der Tela submucosa liegen. Mit einer Längenausdehnung von 3 bis 5 m erstrecken sie sich unter Umständen über das Duodenum hinaus bis in das Jejunum. In der Nähe des Pylorus bilden sie ein dichtes zusammenhängendes Lager, lösen sich dann in einzelne Drüsenpakete auf und werden gegen Ende der Drüsenzzone immer kleiner. Oft brechen sie durch die Lamina muscularis mucosae in die Lamina propria ein. Dadurch wird die eigentliche Grenze zwischen der Propria mucosae und der Submucosa verwischt (SMOLLICH, MICHEL, 1992). Ihr seröses Sekret ölt das Oberflächenepithel ein und schützt es vor dem sauren Magenchymus (DELLMANN, EURELL, 1998).

Die lymphatischen Einrichtungen des proximalen und mittleren Dünndarms (Duodenum und Jejunum) liegen diffus oder in Form von Noduli solitarii (Einzelknötchen) vor. Im Ileum liegen in der Mucosa und Submucosa Anhäufungen von Lymphknötchen (Lymphonoduli aggregati, Peyer' Platten) (SMOLLICH, MICHEL, 1992).

Die Form der Peyer' Platten ist bandförmig und sie können mit einer Länge von bis zu 3,5 m bis in den Dickdarm reichen (SCHWARZE, 1962). Bei jungen Schweinen findet man einen

einzelnen großen, aus Lymphknötchen zusammengesetzten, ilealen Peyer' Plaque, der sich im distalen Jejunum und Ileum befindet. Die Lymphfollikel können in drei verschiedenen Formen auftreten. Es gibt die Follikel- Dome- Strukturen (LOWDEN, HEATH, 1995), bei der sich die Lymphfollikel zum Lumen vorwölben und einen Dome bilden (GEBERT, 1999), der oft die Form einer Pyramide hat (CHU et al., 1979). Bei dieser Form dehnen sich die Peyer' Platten von der Lamina Propria bis in die Submucosa aus (SLOMIANKA, 2004). Das Epithel, das über einem solchen Dome liegt, besteht aus Enterozyten (LOWDEN, HEATH, 1995), wenigen Becherzellen, vielen Lymphozyten- mehr als im normalen Zottenepithel- (CHU et al., 1979) und M- Zellen (GEBERT, 1999). Enterozyten, Becherzellen und M-Zelle gehen aus Stammzellen hervor, die im mittleren Drittel der Lieberkühn' Krypten liegen und innerhalb von drei bis vier Tagen als unreife Epithelzellen auf die Dome wandern, um sich dort zu den verschiedenen Zelltypen zu differenzieren (GEBERT, 1999). In den Domen findet man B-Zellen und Macrophagen (DURGUT, 2000). Eine weitere Form ist der propriale Follikel, bei dem der Hauptteil oder der gesamte Lymphfollikel im Bereich der Lamina propria liegt. Die dritte Form wird in Kapitel 2.2.4. beschrieben.

2.2.3. Histologischer Aufbau des Dickdarms

Die Schleimhaut des Dickdarms bildet im Gegensatz zum Dünndarm keine Zotten und ist anhand dieses Merkmales vom Dünndarm abzugrenzen.

Des Weiteren findet man im Dickdarm weniger Lymphknötchen und Peyer' Platten als im Dünndarm (SCHWARZE, 1962).

Die Dickdarmwand setzt sich, wie der Dünndarm, aus drei Schichten zusammen:

Die Schleimhaut besteht aus einem einschichtigen, hochprismatischen, mit Becherzellen durchsetzten Oberflächenepithel, der Lamina propria mit den einfachen tubulären Schleimdrüsen (Lieberkühn' Krypten) sowie zahlreichen Lymphozyten bzw. gelegentlichen Lymphfollikeln und der Lamina muscularis mucosae.

Die Hauptaufgabe des Dickdarms besteht darin, das Wasser und die Elektrolyte aus dem Chymus zu entziehen, ihn dadurch einzudicken, durch Kontraktion zum After zu schaffen und zu entleeren (SCHEUNERT, TRAUTMANN, 1987).

Der Dickdarm ist weiterhin der Hauptort der bakteriellen Fäulnis- und Gärungsprozesse. Die Becherzellen bilden ein schleimreiches Sekret, das die Darmschleimhaut und den Inhalt

schlüpfrig erhält und als Schutz- und Gleitmittel wirkt (SCHWARZE, 1962; JUNGUEIRA, CARNEIVO, 1986).

2.2.4. Die lymphatischen Darmkrypten im Dünn- und Dickdarm

Seit langem ist bekannt, dass zwei Gewebetypen des Körpers, das Drüsengewebe und das lymphoretikuläre Gewebe, dicht nebeneinander liegen und auch funktionell in einem gewissen Zusammenhang zu stehen scheinen. Schon 1893 wurde von TOMARKIN beim Meerschweinchen im Dünn- und Dickdarm beobachtet, dass sich die Darmeigendrüsen (Lieberkühn` Krypten) aus ihrer gewohnten Umgebung in die Submucosa verlagern und dort von lymphatischem Gewebe umgeben werden. MUTHMANN (1913) beschreibt, wie die in der Submucosa liegenden Lymphfollikel an die Oberfläche gelangen: „Das Epithel senkt sich in Form von Lacunen oder engen Drüsenschläuchen durch eine Lücke der Muscularis in das Knötchen, also in das Gebiet der Submucosa hinein.“ CARLENS (1928) beschreibt für den Dickdarm „enge Darmkrypten, an deren Grund größere halbmondförmige Lymphozytenhaufen gelagert sind. In diesen Anhäufungen hat sich das Epithel in Form von Lacunen oder engen Drüsenschläuchen (Lieberkühn` Drüsen), die die Muscularis mucosae durchbrochen haben, eingesenkt oder richtiger die Lymphozyten haben sich um die in die Submucosa eingedrungenen Epithelschläuche gelagert.“ Er fand sie beim Schwein gleichmäßig im gesamten Dickdarm verteilt. Anders als CARLENS beschreibt ELIAS (1947) beim Rind große Kammern, von denen zahlreiche Tubuli ausgehen und Verzweigungen zahlreicher Krypten, die an „Miniaturdärme“ erinnern. GRAU und WALTER (1957) bestätigen ELIAS Ergebnisse. Sie fanden auch solche Submucosadrüsen im Dünn- und Dickdarm des Schweins und unterschieden zwei Formen: „Strauchdrüsen“ und „Büscheldrüsen“. „Strauchdrüsen“ entstehen aus einem Lieberkühn` Drüsenschlauch, der die Muscularis mucosae durchbohrt und sich dann in der Submucosa hirschgeweihtartig aufgabelt. Seine Endstücke stecken in diffusem lymphatischem Gewebe und werden von den Peyer` Platten umgeben. Die dreimal häufiger vorkommenden „Büscheldrüsen“ bestehen aus einem ganzen Büschel Lieberkühn` Schläuche, die durch die Muscularis mucosae durchwachsen, sich dort z. T. verästeln und an ihren Endstücken von dem umgebenen Lymphgewebe so eingeeengt werden, dass sie geknäuel in einer flaschenförmigen Vertiefung stecken. Auch HEBEL (1960) fand bei seinen Untersuchungen vor allem diese beiden Formen der lymphatischen Darmkrypten.

Er beschreibt die Büscheldrüsen als ganze Büschel von Drüsenschläuchen, die nebeneinander in die Submucosa ziehen und dort meist nur flach eintauchen, aber gelegentlich auch tiefer gelegen zu finden sind. Die Schläuche dieser Drüsenform verzweigen sich nur selten.

Im Ileocaecalzapfen des Schweins fand HEBEL (1960) eine von den Büscheldrüsen etwas abweichende Form, die er als eine „besonders schöne und extrem große Büscheldrüse“ beschreibt. Er beobachtete tiefe trichterartige Epitheleinsenkungen, die oft bis weit unter die Muscularis mucosae zogen. Von ihnen aus gehen seitlich und nach unten zahlreiche Drüsenschläuche, die bis weit in die Tiefe des Lymphgewebes reichen. Sie verlaufen gestreckt und verzweigen sich selten. Diese Form unterscheidet sich in der Größe, der Anzahl der beteiligten Drüsen-schläuche und der „Eintauchtiefe“ von den Büscheldrüsen.

Die zweite, schon oben erwähnte, nicht so oft vorkommende Form, die Strauchdrüse, besteht aus einem langen weitleumigen Drüsenschlauch, der als Hauptstamm in die Submucosa eintritt und dort zahlreiche Seitenäste abgibt. Die Erscheinungsbilder dieser beiden genannten Formen sind sehr verschieden voneinander, doch gibt es zwischen ihnen diverse Übergangsformen.

Die lymphatischen Darmkrypten stellen nach HEBEL (1960) eine funktionelle Verbindung von Lymphgewebe und Drüsengewebe dar. Über ihre genaue Funktion konnten bisher nur Vermutungen aufgestellt werden. Man weiß nicht, ob sie durch ihr Eindringen in die Submucosa die Oberfläche vergrößern und damit den Lymphozyten einen schnelleren und einfacheren Durchgang ermöglichen oder ob sie auch durch ein spezielles Drüsensekret die Aktivierung der Abwehrzellen hervorrufen.

2.3. Die postnatale Entwicklung des Schweinedarms

Der Schweinedarm zeigt in den ersten drei Wochen nach der Geburt starke Veränderungen in der Zottenstruktur. Kurz nach der Geburt kommt es durch die Enterozytenproduktion und die noch immer vorhandene Population fetaler Enterozyten zu einer Verlängerung der Zotten (SMITH und PEACOCK, 1980). Kurze Zeit später kommt es zu einer Zottenverkürzung. Die Zottenhöhe ist dann nur noch halb so groß wie bei neugeborenen Tieren (MOON, 1971). SMITH (1983) untersuchte die Zottenlänge bei 15, 21 und 26 Tage alten Ferkeln und stellte dabei fest, dass mit dem Alter die Zottenlänge abnahm. In einem weiteren Experiment beurteilte er die Zotten- und Kryptenstruktur 20 Tage alter Ferkel, die am 15. Tag abgesetzt und von flüssiger auf feste Nahrung umgestellt wurden. Hier zeigten die Zotten ähnliche

Längenwerte wie die der 21 Tage alten, nicht abgesetzten Ferkel. Die Krypten der abgesetzten Ferkel waren tiefer als die der nicht abgesetzten.

2.4. Becherzellen- Vorkommen und Verteilung im Darm

Becherzellen befinden sich in allen Darmabschnitten. In den Lieberkühn' Krypten, wo ihre Verteilung regelmäßig ist, kommen mehr Becherzellen vor als in den Zotten, in denen sie eher unregelmäßig verteilt sind. Besonders im Colon ist die Anzahl der Becherzellen sehr hoch, sie kann sogar die der Enterozyten übertreffen. Im Epithel über den Peyer' Platten scheinen die Becherzellen zu fehlen. Die Größe der Becherzellen ist abhängig von der Lage, sie sind im Colon und in den Krypten allgemein etwas größer als im Dünndarm und in dem Oberflächenepithel, und ihrem Sekretions- also Füllungszustand (MICHEL, 1988).

Becherzellen differenzieren sich aus den endodermalen Stammzellen, die in der proliferativen Zone der intestinalen Krypten liegen. Sie wandern über die Drüsen in Richtung Zottenspitze und werden dort eventuell ins Lumen abgeschilfert (LEBLOND, MESSIER, 1958; RAMPAL et al., 1978).

Die Anzahl der Becherzellen ist vom Alter und von ihrer Lokalisation abhängig.

MICHEL (1988) erkannte eine altersgemäße Zunahme der Becherzellanzahl bei sieben bis neun Monaten alten Schweinen, danach blieb die Zahl eher konstant.

MICHEL zeigte auch, dass man die Becherzellen des Schweins nicht eindeutig als Alcianblau- oder PAS- positiv bezeichnen kann. Unterschiedliches Färbeverhalten scheint vom variierenden Gehalt saurer und neutraler Glykoproteine herzuführen.

Die chemische Zusammensetzung des Muzins in den Becherzellen unterliegt Veränderungen, die mit der Becherzell- Wanderung zusammenhängen (NEUTRA, FORSTNER, 1987; SNYDER, WALKER, 1987; RAMPAL et al., 1978; BROWN et al., 1988).

Das intestinale Muzin besteht aus einem zentralen Protein mit einer seitlichen Carbohydrat-Kette. Dieser Proteinkern, der etwa 20 bis 30% des gesamten Muzin- Moleküls ausmacht, ist reich an den Aminosäuren Serin, Threonin und Prolin.

In der Carbohydratkette wurden fünf verschiedene Monosaccharide gefunden: Fructose, Galactose, N-acetylgalactosamin, N- acetylglucosamin und Sialinsäure (NEUTRA, FORSTNER, 1987; SNYDER, WALKER, 1987).

2.5. Probiotika

2.5.1. Geschichte der Probiotika

Der positive Effekt von Probiotika auf die Gesundheit wurde schon festgestellt, bevor überhaupt der Begriff bekannt und genutzt wurde (HOSONO, 1992).

Die Ursprünge der kultivierten Milchprodukte reichen bis zum Anfang der Zivilisation zurück und wurden schon in der Bibel und den heiligen Büchern des Hinduismus erwähnt. Viele traditionelle Produkte aus saurer Milch oder kultivierte Milchprodukte wie Kefir, Koumiss, Leben oder Dahi, deren Entstehung eher zufällig gewesen sein dürfte, wurden oft therapeutisch eingesetzt, bevor die Existenz von Bakterien überhaupt bekannt war. Schon in einer persischen Version des alten Testaments (Genesis 18.8) steht: „Abraham verdankt seinem Konsum von saurer Milch seine Langlebigkeit“.

76 vor Christi empfahl der römische Historiker Plinius, gegärte Milchprodukte zur Behandlung von Gastroenteritis zu sich zu nehmen (BOTTAZZI, 1983).

Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts verband Elie METCHNIKOFF (1901) die überdurchschnittliche Lebensdauer (ca. 115 Jahre) der Bulgaren mit der Aufnahme von Joghurt, der reich an Laktobazillen ist. Seine Hypothese besagt, dass die Milchsäurebakterien die toxinproduzierenden Bakterien im Magen-Darm-Trakt reduzieren bzw. verdrängen und dadurch einen positiven Einfluss auf die Gesamtgesundheit haben (METCHNIKOFF, 1907; Yakult Central Institute, 1998; GORDON et al., 1957).

COHENDY (1906) verabreichte Menschen eine mit *L. bulgaris* angesäuerte Milch und fand heraus, dass es zu einer Abnahme der Verwesungsprodukte kam und dass im Darm eine gram-positive Flora vorherrschte. Er konnte noch 8-12 Tage nach Beginn des Versuchs Laktobazillen im Kot nachweisen.

Zur gleichen Zeit entdeckte TISSIER (1906), dass Bifidobakterien die dominierenden Bakterien im Magen- Darm- Trakt gestillter Kinder sind. Er empfahl Kindern mit Durchfall die Einnahme von „un ou deux verres a bordeaux d`une culture pure de *Bac. acidiparalactici* ou d`une symbiose de cette espece avec le *Bac. bifidus*“. Seine Theorie war die, dass die Bifidobakterien die Fäulnisbakterien, die den Durchfall hervorrufen, verdrängen.

1916 versuchte NISSL, nicht- milchsäure- bildende Bakterien, z.B. *E. coli*, für den Kampf gegen die „pathogene intestinale Flora“ einzusetzen.

In den frühen 20er Jahren zeigten RETTGER, CHEPLIN (1921) und KOPELOFF (1926), dass *L. acidophilus*, im Gegensatz zu dem bulgarischen Bazillus, im menschlichen Magen-Darm- Trakt überleben und sich ansiedeln können und einen therapeutischen Effekt auf die Verdauung haben. Sie glaubten, dass Vermehrung und Wachstum der Bakterien im Darm essentiell für ihre Wirksamkeit sind, und verordneten deshalb den Gebrauch von intestinalen Isolaten.

In den frühen 30er Jahren richtete der Japaner SHIROTA seine Untersuchungen auf ausgewählte Stämme intestinaler Bakterien, die die Passage durch den Darm überleben, und entwickelte daraus Stämme, die er dazu benutzen konnte, fermentierte Milch herzustellen und diese an seine Patienten zu verteilen. Sein erstes Produkt beinhaltete *L. acidophilus Shirota*., Er schuf damit die Grundlage seine „Yakult“ Company (Yakult Central Institute for Microbiological Research, 1998).

In den 50er Jahren machten BOHNHOFF et al. (1954), FRETER (1954), COLLINS und CARTER (1978) eine Entdeckung, dass die intestinale Mikroflora eine große Rolle bei der Resistenz gegen Krankheiten spielt. Sie fanden heraus, dass die orale Gabe von Antibiotika an Mäuse es erschwerte, sie für die Infektion mit *S. typhimurium*, *Shigella flexneri* und *Vibrio cholerae* empfänglich zu machen. Weiterhin waren 1×10^{11} *Salmonella enteritidis* ausreichend, keimfreie Meerschweine zu töten, aber 1×10^9 Bakterien waren erforderlich, um Tiere mit einer normalen Darmflora zu töten.

Ende der 50er Jahre veröffentlichte GORDON (1959) im „Lancet“, dass die erfolgreiche Therapie mit Laktobazillen von folgenden Kriterien abhängig ist:

1. man muss einen Organismus nehmen, der ein normaler Bewohner des Darms ist, wie z. B. *L. acidophilus*;
2. der Mikroorganismus darf nicht pathogen sein;
3. er sollte selbst in der Lage sein, sich im Darm „einzunisten“;
4. es ist eine große Menge notwendig (10^7 bis 10^9), um eine schnelle Einrichtung der gesundheitsfördernden Flora zu bewirken;
5. es ist eine zusätzliche Einnahme einer Diät mit hohem Milch- oder Laktose- Gehalt notwendig, da die Laktobazillen sonst nicht wachsen können.

Anfang bis Mitte des vorigen Jahrhunderts wurden häufig Joghurts genutzt, um die Balance der Darmflora nach Antibiotikagebrauch wieder herzustellen oder auch um Erkrankungen, wie z.B. Diarrhö, Verstopfung, Dyspepsie, Cystitis, Mucus- Colitis, chronisch- ulzerative Kolitis und Dermatitis zu mindern oder gar zu verhüten (CHEPLIN et al., 1922; HAWLEY et al., 1959; NEWMAN, 1915).

In der heutigen Zeit sind Probiotika im §11 des Futtermittel- Gesetzes unter der Bezeichnung „mikrobieller Zusatzstoff zur Stabilisierung der Darmflora“ zugelassen und werden unter der Bezeichnung „ecological health control products (EHCP)“, auf die sich die EC-FLAIR (European Community- Food linked Agro Industrial Research Group) einigte, geführt. Auf EU- Ebene wird der Umgang mit solchen Futterzusatzstoffen in dem Artikel 1 der Richtlinie 93/113/EG des Rates vom 14.12.1993 geregelt. Ihre Beurteilung wird nach den Leitlinien der Richtlinie 87/153/EWG durchgeführt.

2.5.2. Entstehung der Definition

Das Wort „Probiotikum“ stammt aus dem Griechischen (pro bios) und bedeutet: „fürs Leben“. Der Begriff „Probiotikum“ wurde erstmals von LILLY und STILWELL (1965) verwendet. Sie bezeichneten damit eine Substanz, die von Ciliaten produziert wurde und das Wachstum eines anderen Protozoen stimulierten. Damit unterschied sich das Substrat vom Terminus „Antibiotikum“.

SPERTI (1971) benutzte diesen Begriff, um einen Gewebeextrakt zu beschreiben, der das mikrobielle Wachstum stimuliert. Zu dieser Zeit wurde den Probiotika eine eher allgemeine Bedeutung auch für andere Objekte zugeschrieben, die positive und generelle Wirkungen hatten. PARKER (1974) war der erste, der den Begriff „Probiotika“ in der Bedeutung benutzte, die sie heute haben. Er definierte sie als „Organismen und Substanzen, die einen gesundheits-fördernden Effekt auf ein Tier haben“ und beschrieb damit einen Tierfuttermittelzusatz mit Mikroorganismen und andere Substanzen, die „zum Gleichgewicht der intestinalen Flora beitragen“. Seine Definition bezieht auch Antibiotika mit ein, da sie zu dieser Zeit genutzt wurden, das Wachstum der Nutztiere anzuregen. Laut GEDEK (1986) greifen die Probiotika „regulativ in die Besiedlung des Verdauungstrakt mit Mikroorganismen ein“. Erst im Jahr 1989 wurde die Definition von PARKER durch FULLER verbessert bzw. erweitert, in dem er folgenden Unterschied hinzufügt: „Probiotika sind lebende mikrobielle Futterzusatzstoffe, die sich wohltuend auf die meisten Tiere auswirken, indem sie ihre intestinale Mikroflora verbessern.“ Im Gegensatz zu PARKER betonte FULLER die Lebensfähigkeit der Mikroorganismen als Komponente eines effektiven Probiotikums und schließt damit Antibiotika aus. Drei Jahre später wurde FULLERS Definition noch einmal erweitert. HAVENAAR und HUIS IN'T VELD (1991) definierten Probiotika als „Eine lebensfähige Einzel- oder Mischkultur von Mikroorganismen, die Menschen und Tieren

verabreicht werden und meist durch die Verbesserung der eigenen intestinalen Mikroflora gesundheitsfördernd wirken“. SALMINEN (1996) beschrieb ein Probiotikum als „eine lebende mikrobielle Kultur oder ein kultiviertes Milchprodukt mit einem wohltuenden Einfluss auf die Gesundheit und Ernährung der meisten Wirte.“. SCHAAFSMA (1996) stellte fest, dass „ein orales Probiotikum lebende Mikroorganismen sind, die in gewisser Menge einen positiven Effekt über die normale Ernährung hinaus auf die Verdauung ausüben“. Eine ähnliche Definition folgte im Jahr 2000 von SANDERS. Er sagte: „Probiotika sind lebende Mikroorganismen, die bei ausreichender oraler Zufuhr einen gesundheitsfördernden Effekt auf Menschen ausüben“. Ende der 90er Jahre schlug eine EU- unterstützte Gruppe europäischer Wissenschaftler (SALMINEN et al., 1998) vor, Probiotika in der Humanernährung besser wie folgt zu definieren: „lebende mikrobielle Nahrungsbestandteile, die einen positiven Einfluss auf die Gesundheit haben.“. Sie berücksichtigten damit Ergebnisse aktuellster Studien, die zeigten, dass Probiotika nicht nur die intestinale Mikroflora verändern, sondern dass es auch probiotische Effekte in anderen Bereichen, z.B. auf verschiedene Immunparameter, gibt.

In den USA werden die Probiotika nach dem Vorschlag der FAO als „direct- fed microbials (DFM)“ bezeichnet. In Kanada ist die Beschreibung „lebende mikrobielle Produkte (viable microbial products)“, bestimmt durch das Department of Agriculture and Health (AC), gebräuchlich.

2.5.3. Auswahlkriterien

Soll ein Probiotikum in der Tierernährung als Futterzusatzstoff eingesetzt werden, muss es EU- einheitlich als ein solches zugelassen sein.

Die Hersteller müssen sich nach den Zulassungsvorschriften der EG, die in den Richtlinien 70/524/EWG über Zusatzstoffe in der Tierernährung sowie der Richtlinie 87/153/EWG zur Festlegung von Leitlinien zur Beurteilung von Zusatzstoffen geregelt sind, richten und entsprechende Untersuchungen durchführen, bevor sie das Probiotikum in den Verkehr bringen.

Damit ein Mikroorganismus als Probiotikum genutzt werden kann, muss er folgende Kriterien erfüllen (FULLER, 1989; KEMPF und TROLLDENIER, 1997; HOLZAPFEL, 1998; COLLINS und GIBSON, 1999; SAARELA, 2000; JADAMUS, 2001; DUGGAN et al., 2002; TEITELBAUM, ALLAN WALKER, 2002):

1. er darf nicht pathogen sein und keine Toxine bilden;
2. er muss die Fähigkeit haben, den Transport durch den gesamten Magen- Darm- Trakt zu überleben;
3. eine große Anzahl lebensfähiger Bakterien muss die Fähigkeit haben, auch eine längere Lagerzeit überleben zu können er muss die Fähigkeit haben, sich an intestinale Enterozyten anheften zu können;
4. er muss resistent gegen die Zerstörung während der technischen Prozesse sein;
5. er muss zur Kolonisation (Besiedlung) im Gastrointestinaltrakt fähig sein, wenn auch nur für kurze Zeit;
6. er sollte antimikrobielle Substanzen bilden können;
7. weiterhin sollte er eine gute Verträglichkeit aufweisen, womit eine Entstehung von Dysbiosen nach oraler Aufnahme vermieden wird;
8. lebensfähige Probiotika sollten nur in geringer Menge ausgeschieden werden und sie sollten in der Umwelt nur eine geringe Überlebensfähigkeit haben;
9. es dürfen nur Stämme zugelassen werden, die sich in ihrem Resistenzverhalten nicht von dem der Feldstämmen unterscheiden (Europäische Kommission für Gesundheit und Verbraucherschutz, 27.04.2000).

2.5.4. Allgemeine Wirkungsmechanismen

Für viele gesundheitsfördernde Auswirkungen, die Probiotika auf den Organismus haben, ist es noch immer nicht möglich, eine wissenschaftliche Erklärung zu finden.

Des Weiteren haben probiotische Stämme nicht auf jedes Individuum einer spezifischen Art den gleichen Effekt bzw. eine Reihe angenehmer Eigenschaften (SHORTT, 1999).

Einige schon weitgehend bekannte und aufgeklärte Mechanismen sind:

1. Die Anheftung und Besiedlung des Magen- Darm- Trakts
 - Wie oben erwähnt, ist die Anheftung an intestinale Zellen ein wünschenswertes, wenn nicht sogar erforderliches Qualitätsmerkmal. Es bedeutet den ersten Schritt in der Besiedlung des Magen- Darm- Trakts und ermöglicht den probiotischen Mikroorganismen damit z.B., dass Immunsystem zu verändern.
 - Weiterhin wird durch die Anheftung der probiotischen Bakterien eine solche von pathogenen Organismen, z. B. *E. coli* und *S. typhimurium* verhindert, da

eine Konkurrenz um den Rezeptor auf der Seite der intestinalen Oberfläche besteht (JOHANNSSON et al., 1993; BERNET et al., 1994; SAXELIN, 1997).

2. Die Konkurrenz um Nahrung und die Produktion von antimikrobiellen Substanzen.
 - Außer der Verdrängung der pathogenen Keime durch Anheftung, können Probiotika diese auch durch die Konkurrenz um limitierende Substrate für ihre Fermentation sowie durch die Sekretion von antimikrobiellen Substraten, den Bakteriozinen, inhibieren (FULLER, 1989). Die Bakteriozine bestehen hauptsächlich aus organische Säuren, hydrogenen Peroxiden, nicht- Peptid oder Polypeptid- Antibiotika (ZIMMERMANN et al., 2001).
3. Eine Stimulation der Mucosa und der systemischen Immunität (MEYDANI, 2000).
 - Die Stimulation der Immunität beruht auf der Möglichkeit der Mikroorganismen, sich an intestinale Zellen anzuheften und dadurch mit dem Darm- assoziierten Lymphgewebe (GALT) zu interagieren (MCGHEE, 1992).

2.5.5. Durchgeführte Untersuchungen zu den Wirkungsmechanismen

2.5.5.1. Untersuchungen zur Anheftung und Besiedlung des Gastrointestinaltraktes

Bereits 1973 konnte mittels rasterelektronischen Untersuchungen von MURALIDHARA et al. gezeigt werden, dass es durch einen dichten Schutzfilm von apathogenen Keimen auf der Schleimhautoberfläche des Darmes zu einer rein sterischen Behinderung der Anheftung von pathogenen Mikroorganismen kommt.

DAVIDSON und HIRSH (1976) zeigten, dass Ferkel, die mit einem bestimmten apathogen Stamm *E. coli* besiedelt sind, nach einer Injektion mit einem toxinbildenden Stamm, der dasselbe Fimbrien- Antigen besaß, nicht erkrankten. Ihre Erklärung hierfür war, dass die Anheftungsstelle der Glykokalix durch die apathogenen Mikroorganismen besetzt wurde und damit den pathogenen Keimen nicht mehr zur Verfügung stand.

Eine Untersuchung von COLLINS und CARTER (1978) ergab, dass 10^9 KBE von *S. enteritidis* notwendig sind, um konventionell gehaltene Mäuse zu töten. Die letale Dosis des gleichen Keims betrug bei keimfrei gehaltenen Tieren nur 10^1 KBE. Dieses Ergebnis weist auf eine Interaktion zwischen der Darmflora und den pathogenen Mikroorganismen hin.

Bei einem Tierversuch mit gnotobiotischen Mäusen konnte durch eine Behandlung mit *L. salivarius* die Anheftung des in der Humanmedizin häufig vorkommenden Keimes *Helicobacter pylori* an die Magenschleimhaut verhindert werden (KABIR et al., 1997). Ein in vitro- Versuch von COCONNIER et al. (1998) mit *L. acidophilus* zeigte ähnliche Ergebnisse.

Ein anderer Versuch zeigte, dass das Eindringen von enteropathogenen Mikroorganismen, *E. coli* und anderen gram negativen Bakterien, durch *Lactobacillus acidophilus* inhibiert werden kann (BERNET et al., 1994).

Bei neugeborenen Kaninchen wurde durch eine *L. casei* GG- Substitution der Gehalt von *E. coli* K1A signifikant reduziert. Damit konnte eine bakterielle Invasion verhindert werden (LEE et al., 2000).

JIN et al. (2000) stellten fest, dass der *Enterococcus faecium*- Stamm 18 C 23 in dosisabhängiger Weise die Anheftung von *E. coli* K88 und K8MB an die Darmmucosa effizient zu 90% verhindern kann, wenn mindestens 10^9 KBE pro ml zusammen mit *E. coli* verabreicht werden (JIN et al., 2000).

Ein Versuch (VIERA et al., 1999), bei dem das kommerzielle Futter mit *L.L. casei* oder *L. sp. starin B-5* an Ferkel verabreicht wurde, ergab bei der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung, dass *L. sp. strain B-5* im Gegensatz zu *L.L. casei* am intestinalen Epithel anheftet. Weiterhin war die Anzahl der Laktobazillen, gemessen in der Ileumwand und im Ileuminhalt, bei beiden Laktobazillen- Gruppen größer als in der Kontrollgruppe. Die Auswertung des *E. coli*- Gehaltes in der Ileumwand sowie im Ileuminhalt ergab, dass es in den Laktobazillus- Gruppen weniger *E. coli* gab als in der Kontrollgruppe.

OHASHI et al. (2001) untersuchten den Einfluss von mit *L. casei*- Strain Shirota-fermentierter Milch auf die indigenen Laktobazillen im Darm des Schweins.

Die Anzahl der Laktobazillen und Bifidobakterien im Darm stieg mit der Aufnahme der fermentierten Milch an. Des Weiteren kam es zu einer Abnahme des Digesta- pHs durch eine ansteigende Laktat- und Acetat- Konzentration, die evtl. vor einem Wachstum von pathogenen und potentiell- pathogenen Bakterien schützt. Der fäkale pH sank mit der Aufnahme der fermentierten Milch und wurde mit der Abnahme der Anzahl der Enterobacteriaceaeen und Enterococci und mit der Zunahme von Laktobacillen und Bifidobakterien assoziiert. Der Anstieg der Acetat- und Propionatkonzentration wurde mit dem Anstieg der Laktobacillen- und Bifidobacterienzahl erklärt, da ersterer Laktat und letzterer Acetat und Laktat produziert. Laktat wird durch laktatabbauende Bakterien (*Desulfovibrio spp.*, *Propionibact. spp.*) in Acetat und Propionat umgewandelt.

2.5.5.2. Untersuchungen zur Wirkung der ausgeschiedenen antimikrobiellen Substanzen

Die Synthese einer speziellen, antibiotisch wirksamen Substanz wurde für Laktobazillen (OXFORD, 1944) und Streptokokken (MATTICK und HIRSCH, 1944) beschrieben.

BOHNHOF et al. stellten 1964 fest, dass flüchtige Fettsäuren einen Einfluss auf das Wachstum von *S. enteritidis* haben.

FLOCH (1972) bestätigte, dass die durch die mikrobielle Hydrolyse freigesetzte Gallensäure verschiedene gram- positive und -negative Bakterienstämme inhibiert.

Laktobacillus spp. synthetisieren H_2O_2 (PRICE und LEE, 1969), das sich, so wurde erst einige Jahre später festgestellt, für die anaeroben Mikroorganismen, die weder Katalase- noch Superoxid Dismutase- Aktivität aufweisen, als Toxin darstellt (DAHIYA und SPECK, 1986). Flüchtige Fettsäuren, die ein Fermentationsprodukt der Dickdarmflora bei der Kohlenhydratmetabolisierung darstellen, haben einen Einfluss auf die Besiedlungsresistenz gegenüber *E. coli*.

Auch bei der Untersuchung der Hefe *Saccharomyces boulardii* wurde eine gegen gram-negative Bakterien wirksame Substanz, die bis dahin nur in vitro nachgewiesen wurde, gefunden (GEDEK, 1975, 1987).

GEDEK und AMSELGRUBER (1990) konnten mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskopes eine Bindung eines *E. coli*- sowie *S. typhimurium*- Stamms an die Hefezelle zeigen. Diese Anheftung konnte durch eine Vorinkubation der Bakterien mit Mannose stark abgeschwächt werden, so dass sie zu der Annahme gelangten, die Hefezelle besitze einen mannosehaltigen Rezeptor auf ihrer Oberfläche.

Weiterhin ist *Sac. boulardii* in der Lage, bakterielle Toxine zu neutralisieren. So zeigten BRANDAO et al. (1998), dass die Untereinheit B des Cholera-Toxins an die spezielle Oberfläche der Hefezelle bindet. Der Vorteil ist, dass es dadurch von der Hefezelle im Magen- Darm- Trakt abgefangen wird, bevor es sich an die Epithelzelle anlagern kann.

Eine weitere Eigenschaft von *Sac. boulardii* fand CASTAGLINOLO (1996) heraus. Die von der Hefe synthetisierte Serinprotease inaktiviert in vitro das Toxin A und B von *Clostridium difficile*.

Durch verschiedene antimikrobielle Faktoren, wie die Veränderung des pH's, der Bildung von Hydrogen- Peroxid, Bakteriozinen, Fettsäuren und dekonjugierten Gallensalzen greifen die probiotischen Bakterienstämme in den Mechanismus der kompetitiven Verdrängung der pathologischen Keime ein (FULLER, 1999).

KELLY (1998) zeigte in seinen Versuchen, dass die von den probiotischen Bakterien gebildeten Bakteriozine in der Lage sind, die Permeabilität der Zellmembran der Zielzellen zu verändern. Es konnten sogar zwei als Bakteriozine wirksame Komponenten von *L. acidophilus* nachgewiesen werden (BAREFOOT et al., 1984; ZAMFIR et al., 1999) und zwar das Lactacin B und Acidolin. Lactacin B inhibiert in vitro einen anderen Lactobazillus und Acidolin inhibiert einen enteropathogenen Keim.

Das von *L. reuteri* gebildete Reuterin hat ebenso wie Acidolin eine antimikrobielle Wirkung gegenüber gram- negativen Bakterien inklusive der enteropathogenen Keime (CASAS und DOBROGOSZ, 1997).

Auch bei *Lactobacillus GG* wurde eine inhibitorische Substanz mit einem ähnlich breiten Aktivitätsspektrum gefunden (SILVA et al., 1987).

Ein weiterer Mikroorganismus, der ein Bakteriozin bildet, ist *B. cereus*. Er synthetisiert Cerin. Ob auch die als Probiotika verwendeten Stämme, wie *B. cereus* var. *toyoi* oder *B. cereus* var. *caron*, dieses Cerin produzieren, ist noch nicht bekannt (NACLERIO et al, 1993).

2.5.5.3. Untersuchungen zur Veränderung der Immunität durch Probiotika

Zusätzlich zur direkten Wechselwirkung mit pathogenen Bakterien wächst die Annahme, dass Probiotika auch die Resistenz gegen Krankheiten verbessern, in dem sie die systemische und die mucosale Immunität verändern (ZIMMERMANN et al., 2001).

Die Stimulation der Immunität durch die probiotischen Stämme beruht auf deren Fähigkeit, an die intestinalen Zellen (MC GHEE et al., 1992) und an die luminale Oberfläche der M-Zellen (MUSCETTOLA et al., 1994) anzuheften und dadurch mit dem Darm- assoziierten Gewebe zu interagieren (MC GHEE et al., 1992).

Durch das Überleben von laktatbildenden Bakterien (LAB) wird das darmassoziierte Lymphgewebe (GALT) stimuliert, und es kommt zur Veränderung der Cytokin- und Antikörperproduktion (z.B. sekretorischem IgA) sowie zu einer ansteigenden mitotischen Aktivität der Peyer' Platten- Zellen und der Splenozyten (MEYDANII, HA, 2000).

Der immunostimulative Effekt probiotischer Bakterien ist abhängig von der Höhe des Kontakts mit dem lymphoiden Gewebe während der Besiedlung des intestinalen Lumens (MEYDANII, HA, 2000). So konnten PERIDON und ALVAREZ (1992) zeigen, dass die orale Gabe von Milchsäurebakterien an Ratten signifikant auf die systemische und mucosa- assoziierte Immunantwort wirkt.

Einen weiteren Beweis für die Veränderung des Immunsystems lieferte LINK- AMSTER (1994). Er verabreichte 16 Versuchspersonen über einen Zeitraum von drei Wochen mit *L. acidophilus*, *Bifidobacterium Bb12* und *Streptococcus thermophilus* fermentierte Milch. In der Versuchszeit bekamen sie eine darmangepasste *S. typhimurium* Typ 21 a- Vaccine. Der spezifische IgA- Titer war bei den behandelten Personen höher als in der Kontrollgruppe. Auch die unspezifische Abwehr wird durch die Gabe von *Bifidobacterium lactis* stimuliert. Die Kapazität der polymorphkernigen Phagozyten war bei den Testpersonen im Vergleich zu den Kontrollpersonen signifikant erhöht (ARUNACHLAM et al., 2000).

KAILA et al. (1992, 1995) wählten blind 39 Kinder mit akuter Rotavirus- Diarrhö aus, um zu untersuchen, ob auch hier eine Stimulation des Immunsystems möglich ist. Den erkrankten Kindern wurde *Lactobacillus GG* oder ein Placebo- Milchprodukt verabreicht. KAILA et al. fanden eine ansteigende IgA- spezifische Antkörper- Sekretion als Zellantwort zur Rotavirusinfektion in der Probiotikagruppe sowie eine Reduktion der Diarrhö. Bei der Wiederholung der Studie mit erhitzter inaktiverter *Lactobacillus GG*-haltiger Milch blieb das IgA- Level unverändert, aber die Dauer des Durchfalls verkürzte sich. Die Autoren schlussfolgerten aus ihren Ergebnissen, dass Probiotika die Möglichkeit haben müssen, in einer bestimmten Reihenfolge mit dem Mucosa- Immunsystem interagieren zu können.

PERDIGON (1995) fand heraus, dass sich durch eine Aufnahme von *L. casei* und *L. acidophilus* in dosisabhängiger Weise die IgA- Produktion der Plasmazellen vergrößert. Er nimmt an, dass der Anstieg der Serum- IgA- Konzentration mit der Stimulation der Zellen der Peyer' Platten durch LAB verbunden ist und sich dadurch das Verhältnis von CD4⁺- T- Lymphozyten (Helfer- Zellen) zu CD8⁺- Lymphozyten (Supressor- Zellen) ändert (PERDIGON et al, 1991).

Bei Ratten, denen *Sac. boulardii* verabreicht wurde, war der Gehalt an sekretorischem IgA im Darmlumen sowie in der sekretorischen Komponente des Darmepithels erhöht (BUTS et al., 1990).

Bei Schweinen, die eine Woche lang *Sac. boulardii* oder drei Wochen lang *B. cereus* als Futterbeigabe bekamen, nahm der Anteil an IgA Plasmazellen im Dünndarm zu und im Dickdarm ab. Besonders ausgeprägt war diese Erscheinung bei den Tieren, die *Sac. boulardii* erhalten hatten (VAN BRIEL, 2002).

Nach einem Salmonella- Challenge stellten PURI et al. (1996) bei mit Joghurt gefütterten Mäusen eine signifikant höhere Serum- IgA- Konzentration fest als in milchgefütterten Mäusen.

TAKAHASHI (1993) fand in der LAB- Zellwand und in dem Zytoplasma von Mäusen, die mit LAB gefüttert wurden, eine signifikant höhere spezifische IgA- und IgG- Konzentration als bei den Mäusen, die nicht mit LAB gefüttert wurden.

Bei neugeborenen Kindern kommt es nach der Verabreichung von dem *E. coli*- Stamm Nissle 1917 zu einer Steigerung der lokalen und systemischen Produktion von spezifischem IgA.

Bei Mäusen, die oral mit Choleratoxin immunisiert wurden, ist die Konzentration von spezifischem IgA im Serum und Kot höher, wenn ihnen gleichzeitig bestimmte Milchsäurebakterien gegeben werden (VIERRA et al., 1999).

Mit *L. johnsonii* La1 und *B. bifidum* fermentierte Milch hat einen immun- adjuvanten Effekt, d.h. es kommt zu einem signifikanten Anstieg des totalen und spezifischen Serum- IgA- Spiegels, wenn es in Verbindung mit einer oralen *S. typhimurium*- Vaccine verabreicht wird (LINK AMSTER et al., 1994).

Allerdings führt *L. casei* zu einer abnehmenden IgE- Produktion in den Milzzellen sowie einer Abnahme des Serum- IgE's (MATSUZAKI et al., 1998).

Eine andere Studie (MIETTINEN et al., 1996) ergab, dass auch die Cytokinausschüttung (Tumornekrosefaktor α (TNF), Interleukin-6 (IL-6), IL-10) von menschlichen peripheren mononucleären Zellen durch Laktobazillen stimuliert wird. Die Produktion von Interferon α und β (IFN- α und IFN- β) in murinen peritoneal- Makrophagen- Zellkulturen wird durch *L. acidophilus* beeinflusst.

Das in vitro produzierte IFN- γ von Milzzellen junger und alter Mäuse, die LAB erhalten hatten, war höher als bei den Kontrolltieren. Durch den Laktobazillenzusatz für sieben oder 15 Tage kam es zu einem signifikanten Anstieg der IFN- α und IFN- γ - Produktion bei den jungen Mäusen und zur Reduktion des Cytokin- Levels der älteren Mäuse unter das der jüngeren Mäuse (MUSCULETTA et al., 1994). Es wird angenommen, dass die immunostimulatorische Funktion bei oraler Gabe von LAB z.T. mit einer ansteigenden Sekretion von IFN- γ in den Peyer' Plaques- Zellen des GALT zusammenhängt (SOLIS- PEREYRA, 1997). Bei einem Versuch von MARTIN et al. (1998), der eine Makrophagen- Zelllinie mit *Streptococcus thermophilus* behandelte, stieg die Interleukin- Produktion signifikant an. In vivo konnte allerdings kein Effekt verschiedener Probiotika auf die basale Cytokin- mRNA- Expression in Mäuse- Peyer' Platten, -Milz oder- Lymphknoten nach einer 14-tägigen Behandlung nachgewiesen werden (TEJADA- SIMON et al., 1999).

Ein in vitro- Versuch mit menschlichen mononucleären Zellen zeigte nach der Behandlung mit *Laktobazillen* eine ansteigende Expression von IL-1 B, IL- 6 und der TNF- mRNA- Expression sowie der Cytokin- Exkretion (MIETTINEN et al., 1998).

Nach der Verfütterung von bestimmten Laktobazillen und *Sac. boulardii* an Mäusen fanden PERIGON (1986) eine erhöhte phagozytotische Aktivität von Peritonealmakrophagen und PETZOLD und MÜLLER (1986) von neutrophilen Granulozyten.

SCHIFFRIN (1997) konnte nach der Aufnahme von *L. johnsonii* La1 eine ansteigende Phagozytose der peripheren mononukleären Blutzellen verzeichnen.

NEUMANN (1998) isolierte *L. acidophilus* von Säuglingen und inokulierte diese in keimfreie Mäuse. Nach sieben Tagen Kolonisation konnte er eine verbesserte Makrophagen- Kapazität, demonstriert anhand der Clearance intravenös- injizierter *E. coli*, feststellen.

Ebenso konnte durch die Behandlung von Menschen mit *Sac. boulardii* ein Anstieg der Leukozytenzahl nachgewiesen werden (MACHADO- CAETANO, 1986).

Ein weiterer Hinweis für die Aktivierung der Lymphozytenpopulation ist der Anstieg der Expression des IL-2- Rezeptors auf den peripheren CD4⁺- Lymphozyten nach einer mehrwöchigen Einnahme von *Sac. boulardii*.

Auch die Anzahl der CD3- Lymphozyten im Epithel ($p < 0,05$) und in der Lamina propria ($p < 0,01$) in den Ileumzotten von Ferkeln, die ein mit Milch und *L. L. casei* angereichertes Futter bekamen, waren im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, die das Futter ohne den Milch- und Probiotikumzusatz aufnahm, signifikant geringer. Ferkel, die das Futter mit Milch und *L. sp strain B-5* erhielten, hatten auch weniger CD3-Lymphozyten in den Ileumzotten als die Kontrolltiere, aber der Unterschied war hier nicht signifikant (VIERA et al., 1999).

VAN DER BRIEL (2002) fand heraus, dass sich nach der Zugabe von *Sac. boulardii* oder *B. cereus* die Anzahl der CD4⁺- und CD8⁺- Lymphozyten im Schweinedarm veränderte.

Der Anteil an CD4⁺- Lymphozyten wurde im Jejunum größer und nahm im Dickdarm ab. Die Zahl der CD8⁺- Lymphozyten nahm im Epithel des mittleren Jejunums und im proximalen Colon zu.

Mäuse, die mit LAB- haltigem Joghurt gefüttert wurden, wiesen einen höheren Anteil von B- Lymphozyten in den Peyer' Plaques- Zellen auf als Mäuse, die Kuhmilch bekommen hatten (DE SIMONE et al, 1988).

Durch die dreiwöchige Aufnahme von *B. bifidum* und *L. acidiophilus* verdoppelte sich die Anzahl der weißen Blutzellen mit phagozytotischer Aktivität bei 14 untersuchten Menschen (SCHIFFRIN et al., 1997).

2.5.5.4. Einfluss auf die Morphologie der Darmschleimhaut

Durch den Zusatz von *Lactobacillus L. casei*- bzw. *Lactobacillus sp. Strain B-5* angereicherter Milch zu kommerziellem Ferkelfutter, kam es zu einer nicht signifikanten Zunahme der Dicke der Tunica mucosa und Tela submucosa im Vergleich zu der Kontrollgruppe (VIERA et al., 1999).

Ein Vergleich (BANASAZ et al., 2002) von konventionell gehaltenen Ratten und gnotobiotischen, keimfrei gehaltenen Ratten (GF- Ratten), die am dritten und 21.Tag mit *L. rhamnosus GG* monoassoziiert wurden, zeigte, dass die Krypten der am dritten und 21.Tag monoassoziierten Ratten im Dünndarm kürzer waren, als bei den GF- Ratten und den konventionell gehaltenen Ratten.

Die Zotten der monoassoziierten Ratten waren im Duodenum und im Jejunum höher als bei den GF- und konventionell- gehaltenen Ratten. Im Ileum verhielt es sich umgekehrt.

JAHN et al. (1996) untersuchten die Veränderungen der Darmschleimhaut des Menschen durch die Aufnahme von *Sac. boulardii* und konnten eine tendenzielle Vergrößerung der Schleimhautoberfläche im Duodenum feststellen.

Auch GÖRKE (2000) konnte nach einer dreiwöchigen Fütterung von Schweinen im Absetzalter mit *B. cereus var. toyoi* zeigen, dass die Zotten im Jejunum signifikant länger waren als die der Kontrolltiere, und BAUM et al. (2002) fand, dass die relative Schleimhautdicke im proximalen Jejunum des abgesetzten, mit *Sac. boulardii* gefütterten Schweins größer war als bei den Kontrolltieren.

Eine Untersuchung (THELEN, 1997) zum Einfluss der Fütterung über 35 Tage mit zwei verschiedenen *B. cereus*- Varianten, *toyoi* bzw. *caron*, bei abgesetzten Schweinen ergab eine signifikante Zunahme der Zottenlänge im Duodenum der *B. cereus var. toyoi* behandelten Gruppe.

KLEIN und SCHMIDTS (1997) applizierten abgesetzten Ferkeln vier Wochen lang 10^9 Sporen von *B.cereus var. caron*/kg Futter. Sie stellten eine Vergrößerung der Mucosa-oberfläche (+ 18,5%) im Jejunum in Form einer Zunahme der Zotten- (+22,8%) sowie Kryptentiefe (+14,1%) fest.

NOUSIAINEN (1991) konnte keine morphologische Veränderung der Dünndarmschleimhaut bei Ferkeln im Absetzalter nach einer Behandlung mit Laktobazillen feststellen.

Ähnliche Ergebnisse erhielten BREVES et al. (1997), nachdem sie *B. cereus var. toyoi* und *Sac. boulardii* Läufer Schweinen applizierten.

2.5.5.5. Beeinflussung bestimmter Darmerkrankungen durch Probiotika

2.5.5.5.1. Einfluss auf virale Diarrhöen

In verschiedenen Studien wurde der Effekt von *Lactobacillus GG* auf die Dauer der Rotavirus- Diarrhö untersucht (ISOLAURI et al., 1991, 1994; KAILA et al., 1995, 1992; MAJAMAA, et al., 1995; PANT et al., 1996). Es stellten sich folgende Ergebnisse heraus: die Dauer des Durchfalls bei hospital behandelten Kindern und Kindern, die zu Hause behandelt wurden, verkürzte sich auf einen Tag. Des Weiteren wurde die Rehydratationsphase verkürzt. Die Menge des wässrigen Stuhls nahm ab.

In einer *LGG*- Gruppe kam es im Gegensatz zur Placebo- Gruppe seltener zu einer über sieben Tage hinaus anhaltenden Diarrhö.

Durch die Gabe von *E. faecium* kam es bei einer akuten Diarrhö zu einer Reduzierung der Erkrankung im Vergleich zur Placebo- Gruppe (WUNDERLICH et al., 1989).

Auch die Untersuchung von *Streptococcus faecium* zeigte eine Reduzierung der Durchfallphase von 2,8 auf 1,7 Tage (BUYDENS, 1996).

Eine Behandlung mit *L. acidophilus* zeigte hingegen keine solche Wirkung (BOULLOCHE et al., 1994).

2.5.5.5.2. Einfluss auf bakterielle Diarrhöen

Bei Diarrhöen, die durch enteroinvasive Bakterien hervorgerufen wurden, zeigte sich beim Menschen durch die Probiotika- Behandlung keine Besserung (GUANDALINI et al., 2000). Auch bei Kindern mit infektiösen, blutigen Durchfällen konnte kein gesundheitsfördernder Effekt durch Probiotika festgestellt werden (PANT et al., 1996; RAZA, et al., 1995; SHORNIKOVA et al., 1997).

Bei akuten Diarrhöen, hervorgerufen durch *Vibrio cholera*, enterotoxischem *E. coli* oder unbekanntem Organismen, hatte die Gabe von *E. faecium* jedoch einen positiven Effekt (MITRA et al., 1990).

Auch bei Tieren konnte durch einen Zusatz von Bacilluspräparaten oder Enterokokkenstämmen zum Futter eine signifikant reduzierte Durchfallhäufigkeit erkannt werden (IBEN und LEIBETSEDER, 1989; SCHUMM et al., 1990; MÄNNER und SPIELER, 1997 und KYRIAKIS et al., 1999).

2.5.5.5.3. Einfluss auf antibiotika- assoziierte Diarrhöen

Ein Versuch, bei dem 16 Menschen für eine Woche Erythromycin einnahmen, zeigte, dass sich, wenn sie zusätzlich *LGG*- Joghurt aßen, die Anzahl der Diarrhö- Tage von acht auf zwei reduzierte (SIITONEN et al., 1990).

SURAWICZ (1989) stellte fest, dass nur neun Prozent der mit Antibiotika behandelten Patienten Durchfall entwickeln, wenn sie mit *Sac. boulardii* behandelt wurden. In der Placebo- Gruppe hingegen entwickelten 22% eine Diarrhö.

In einer ähnlichen Studie wurde die Wirksamkeit von *E. faecium* untersucht. Hier bekamen 9% der *E. faecium* und 27% der Placebo- Gruppe Durchfall (WUNDERLICH et al., 1989).

Ein noch größerer Unterschied zeigte sich in den Untersuchungen von GOTZ (1979).

Er gab mit Ampicillin behandelten Menschen *L. acidophilus* und *L. bulgaris*.

In der Placebo- Gruppe hatten 14% der Untersuchten Durchfall, in der Probiotikum- Gruppe keiner.

2.5.5.5.4. Weitere Mechanismen der Probiotika, den Darm vor schädlichen Einflüssen zu schützen

Probiotika, z.B. Saccharomycesarten, sind in der Lage, das Redoxpotential zu verändern. Im Magen und in den vorderen Dünndarmabschnitten kommt es zu einer Reduzierung des Restsauerstoffs, wenn durch die Stoffwechselaktivität anaerobe Verhältnisse entstehen, wird das Wachstum der Anaerobier gefördert und die Aerobier, z.B. Enterobakterien werden darin gehemmt (JADAMUS, 2001).

Weiterhin kommt es durch den Einsatz von Probiotika zu einer dosisabhängigen Verringerung des Ammoniaks (NH_3) in der Caecumflüssigkeit, der bei dem Abbau von Proteinen durch proteolytische Bakterien entsteht (SAKATA, 1999).

Säurebildende Bakterien können NH_3 durch Protonierung zu NH_4^+ unschädlich machen, da es in der protonierten Form nicht mehr von den Enterocyten aufgenommen werden kann.

Reduzierte Harnstoffwerte im Serum von *L. casei*- gefütterten Ferkeln könnten eine Folge dieser Umwandlung sein (BOMBA et al, 1998).

Eine wichtige Rolle spielen Hefen bei der Toxinbindung. Sie sind durch ihre Oberflächenstrukturen in der Lage, Giftstoffe zu binden und damit ihre Adhäsion an der Darmwand zu verhindern, wodurch die Wirkung der Toxine vermindert wird.

Sac. boulardii ist sogar in der Lage, eine Serinprotease zu synthetisieren, die die von *Clostridium difficile* gebildeten Toxine A und B abbauen kann und damit die Bindung an den spezifischen intestinalen Rezeptor verhindert (CASTAGLIUOLO et al, 1996, 1999). PELTONEN (2000) konnte in einem in vitro Versuch zeigen, dass auch Laktobazillen Toxine binden können. So konnten 31% der zugeführten Aflatoxin B-1 Menge durch das Probiotikum gebunden werden. Hitzebehandelte Bifidobakterien konnten sogar bis zu 60% der inokulierten Aflatoxine binden (OATLEY et al, 2000).

2.5.5.6. Anheftung probiotischer Bakterien

Die bakterielle Adhäsion an intestinale Zellen und die kompetitive Verdrängung pathogener Bakterien basiert auf der Anwesenheit von Rezeptoren an der intestinalen Zelloberfläche, die in einer begrenzten Anzahl vorhanden sind (CHAUVIERE et al., 1992; COCONNIER et al., 1992). Hierbei spielt die Muzinschicht des Darmepithels eine wichtige Rolle für die probiotischen Stämme. Die Anheftung der Bakterien an intestinale Zellen ist von verschiedenen bakteriellen Oberflächenbestandteilen (z.B. bakterielle Proteinstrukturen) abhängig. So nahm die Adhäsionsfähigkeit nach einer Behandlung mit Proteasen ab (BERNET et al., 1993; GREENE and KLAENHAMMER, 1994; ADLERBERTH et al., 1996).

Die Anheftung der Probiotika kann grundsätzlich durch chemische, physikalische und enzymatische Vorbehandlungen verändert werden (TUOMOLA et al., 2000; FOTAINE, 1994).

Die Adhäsion der Stämme *LAI* und *LGG* z.B. wird durch Autoklavieren, Kochen und einer Pepsin- Trypsin- Behandlung reduziert (TUOMOLA et al., 2000).

FOTAINE (1994) führte eine Hitzebehandlung (30 min Kochen) durch und stellte fest, dass sich *B. bifidum* danach weniger effektiv an das porcine Magenmucin bindet, als das bei den unbehandelten Bifidobakterien der Fall war.

Auch CHAUVIERE (1992) hatte eine Laktobazillenkultur auf 100°C erhitzt, allerdings keinen Bezug zu der Adhäsionsfähigkeit gefunden.

GREENE und KLAENHAMMER (1994) fanden heraus, dass auch Kohlenhydrate für die Anheftung einiger Bakterienstämme essentiell sind. Sie oxidierten die Kohlenhydrate mit Metaperiodat, worauf es zu einer reduzierten Adhäsion kam.

Die Behandlung von LA1 mit Äthanol und Propanol vor der Adhäsion lässt diese signifikant ansteigen.

In einem Versuch von LEE et al. (2000) konnte festgestellt werden, dass die Verdrängung von anheftenden Laktobazillen durch *E. coli* TG1 ein schneller Prozess zu sein scheint, wohingegen die Verdrängung von *E. coli* TG 1 durch Laktobazillen länger als eine Stunde dauert.

2.5.5.7. Einfluss der Probiotika auf die Qualität und Quantität der Becherzellen bzw. des Muzins

GÖRKE (2000) untersuchte den Einfluss zweier Probiotika (*Sac. boulardii* und *B. cereus* var. *toyoi*) auf die Anzahl der Becherzellen und unterschied solche, die saures, und solche, die neutrales Muzin enthielten. Sie konnte nur einen kleinen Unterschied in der Anzahl der Becherzellen mit saurem Muzin zwischen den behandelten und Kontrollgruppen feststellen. Die mit *Sac. boulardii* behandelte Gruppe hatte in allen Darmabschnitten, außer dem Colon, mehr saure Becherzellen als die Kontrollgruppe, im Caecum war der Unterschied signifikant ($p < 0,05$). Die Anzahl der Becherzellen, die neutrales Muzin enthielten, waren bei der *Sac. boulardii*- gefütterten Gruppe im proximalen Jejunum signifikant geringer als bei der Kontroll- und *B. cereus*. var. *toyoi*- behandelten Gruppe ($p < 0,05$).

Bei der Zählung der Becherzellen mit sulfatiertem Muzin konnten im Dünndarm zwischen den Fütterungsgruppen keine Unterschiede festgestellt werden. Im Colon allerdings fand sie in den Probiotikagruppen mehr Becherzellen ohne sulfatiertes Muzin als in den Kontrollgruppen.

2.6. Einfluss anderer Faktoren auf die Darmschleimhaut

2.6.1. Einfluss verschiedener Faktoren auf Zottenlänge und Kryptentiefe

Die Maße von Zottenlänge und Kryptentiefe können altersbedingt, aber auch in Abhängigkeit von der Futterbeschaffenheit variieren.

Bei Ferkeln hat eine hohe Futteraufnahme nach dem Absetzen einen positiven Einfluss auf die Zottenarchitektur. So haben Ferkel, die mit einem hohen Fütterungslevel gefüttert wurden,

eine signifikant höhere Zottenlänge als Ferkel, die auf niedrigem Level gefüttert wurden (VERDONK et al., 2003).

Eine Zottenatrophie kann hingegen eine Folge von Hunger sein (WIEBECKE et al., 1969; BARANYIOVA, HOLMAN, 1976).

Die Kryptentiefe tendiert ebenfalls dazu, bei Ferkeln, die mehr Futter erhielten, größer zu sein, als bei denen, die ein niedriges Futterangebot hatten (VERDONK et al., 2003).

VERDONK et al. (2003) fanden außerdem, dass die Zotten des proximalen und mittleren Jejunums am dritten Tag nach dem Absetzen (p.w.) signifikant höher sind als am siebenten Tage p.w. Die Kryptentiefe nahm vom Absetztage bis zum dritten Tag p.w. signifikant zu.

MARION et al. (2002) untersuchten den Einfluss des Frühabsetzens (am siebenten Tag post partum) auf die Darmentwicklung und Morphometrie bei Ferkeln. Sie stellten am dritten Tag nach dem Absetzen, verglichen mit dem Absetztage, eine bis 41% verkürzte Zottenlänge fest. Etwa 14 Tage nach dem Absetzen wurden die Zotten wieder länger. Die Kryptentiefe zeigte in diesem Versuch keine Abhängigkeit von der Menge der Futtermittelaufnahme.

Bei Mäusen nehmen mit dem Alter sowohl die Länge der Zotten als auch die Tiefe der Krypten zu. Die Anzahl der Zotten und Krypten pro mm nimmt hingegen mit dem Alter im proximalen und distalen Dünndarm ab (MARTIN et al., 1998).

VAN DER MEULEN et al. (2003), die den Einfluss des Absetzalters sowie der allmählich zunehmenden Aufnahme von Festfutter vor dem Absetzen untersuchten, stellten fest, dass die Ferkel, die in der vierten Woche abgesetzt worden waren, in der ersten Hälfte des Duodenums längere Zotten hatten als die Tiere, die in der siebenten Woche abgesetzt wurden.

Die Zottenlänge nahm am vierten Tag p.w. verglichen mit dem Absetztage ab und war am siebenten Tag p.w. wieder so hoch wie am Absetztage.

Ferkel, die vor dem Absetzen ein einschleichendes Futter bekamen, hatten höhere Zotten als die, die das Futter erst nach dem Absetzen erhalten hatten.

Die Kryptentiefe blieb von dem Zeitpunkt des Absetzens unbeeinflusst.

Sie war aber bei Ferkeln, die einschleichend vor dem Absetzen festes Futter bekamen, höher als bei Ferkeln, die erst nach dem Absetzen festes Futter bekamen.

Ebenso wie die Art des Futters hat auch die Art der Applikation der Fütterung einen Einfluss auf die Zotten und Krypten.

In einem Versuch (CONOUR et al., 2002), bei dem es drei Fütterungsgruppen gab, eine total parenteral gefütterte (TPN), eine, die zu 80% parenteral + 20% enteral gefütterte wurde (PEN) sowie eine total enteral gefütterte Gruppe (TEN), nahm die Zottenlänge der Schweine, die gar kein Futter oder nur 80% fraßen, verglichen mit den Ferkeln, die 100% fraßen, im Jejunum

und Ileum ab. Auch die Kryptentiefe war in den beiden parenteral gefütterten Gruppen im Vergleich zu der enteral gefütterten Gruppe geringer.

Ebenso zeigten Mäuse, die total parenteral gefüttert wurden, am siebenten Tag eine um 32,3% geringere Zottenlänge als die Kontrollgruppe (YANG et al., 2003).

Bei Geflügel, das mit Nichtstärke- Polysacchariden gefüttert wurde, erhöhte sich die Digestiviskosität. Das wiederum hatte eine Verkürzung und Verdickung der Darmzotten zur Folge (SIMON, WEYRAUCH, 1999).

WIESE (2002), die den Einfluss von Nichtstärke- Polysacchariden beim Ferkel untersuchte, konnte keinen Effekt auf die Zottenoberfläche und die Kryptenoberfläche durch Erhöhung der Digestiviskosität feststellen. Sie fand aber eine Erhöhung des Vergrößerungsfaktors für die Schleimhautoberfläche durch Kryptenbildung bei Tieren, die eine auf Getreide basierende Diät bekamen im Vergleich zu Schweinen, die eine semisynthetische Diät erhalten hatten. MCDONALD et al. (2001) fanden bei neu abgesetzten Ferkeln, die zu einer Reisdiät entweder Carboxymethylzellulose (CMC) mit niedriger oder mit hoher Viskosität erhalten hatten, signifikant tiefere Krypten als bei Kontrolltieren. Die Zotten waren bei den Ferkeln, die mit der CMC-Diät mit niedriger Viskosität gefüttert wurden am längsten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Der gleiche Effekt wurde von SMITS et al. (1999) bei Geflügel festgestellt. Auch hier waren die Zotten des Jejunums bei den Hühnern, die zusätzlich zum Futter unverdauliches CMC erhalten hatten, länger als bei den Kontrolltieren.

Bei Ratten, die als Kontrolltiere eine semisynthetische Diät erhielten und Ratten, die zu dieser Diät einen Zusatz von Guar- Gummi oder Carboxymethylzellulose (CMC) bekommen hatten, verlängerten sich die Krypten signifikant, und es kam zu einer 25%igen Vergrößerung der basalen Zottenbreite bei den Testgruppen (JOHNSON, GEE, 1986).

Bei Ferkeln, die 30 Tage lang einen Zusatz von 3% Holzkohle- Pulver mit Holzessig als flüssige Komponente ihrer Nahrung erhalten hatten, waren die Zotten signifikant länger und Zottenfläche größer als bei Tieren, die keine bzw. ein oder fünf Prozent des Holzkohlezusatz bekommen hatten (MEKBUNGWAN et al., 2004).

Ein Zusatz von β - Glucanen beeinflusst Zottenlänge im Jejunum frisch abgesetzter Ferkel positiv. Die Kryptentiefe verändert sich hingegen nicht durch einen solchen Futterzusatzstoff (VAN NEVEL et al., 2003).

Nach VENTE- SPREEUWENBERG et al. (2004) kann die Morphologie des Dünndarms bei abgesetzten Ferkeln durch die Proteinquelle verändert werden. Ferkel, die mit 27 Tagen abgesetzt wurden, erhielten Diäten, die den gleichen Gehalt an essentiellen Aminosäuren

hatten und sich nur in ihrer Proteinzusammensetzung unterschieden. Sie bekamen entweder Trockenmilchpulver oder hydrolisiertes Federmehl mit einer geringen ilealen Protein-verdaulichkeit. Tiere, die als Proteinquelle Trockenmilchpulver erhalten hatten, zeigten signifikant höhere Werte der Zottenhöhe und Kryptentiefe als die Ferkel, die das Federmehl bekommen hatten.

Auch Arzneimittel können die Morphologie der Darmschleimhaut beeinflussen:

So verkürzten sich bei Ratten, die mit Mitomycin C behandelt wurden, die Zotten im Jejunum und Ileum bis zum siebenten Tag nach der Behandlung kontinuierlich, nahmen dann wieder an Länge zu und waren am 11. Tag p. i. wieder so groß wie am dritten Tag. An allen Tagen waren die Zotten der MMC- behandelten Ratten signifikant kürzer als die der unbehandelten Kontrolltiere, dessen Zotten während der gesamten Zeit keine Unterschiede in den Längen zeigten (MORIMOTO et al., 2002).

Außer den oben genannten Faktoren können auch verschiedene Krankheiten die Morphologie der Darmschleimhaut beeinflussen.

Bei einer Infektion mit TGE (transmissible Gastroenteritis)-, Corona- bzw. Rotavirus, den typischen Erregern von Ferkeldurchfällen, kommt es durch die Zerstörung der Darmepithelzellen zu einer Verkürzung der Darmzotten (POSPISCHIL et al., 1986).

Im Gegensatz dazu kommt es bei bakteriellen Infektionen, z. B. mit enterotoxischem *E. coli* (ETEC) nur in geringer Form zu einer Verkürzung der Zotten, wobei diese bei Ferkeln stärker ausgeprägt ist als bei Läufern, da sie vor allem in den ersten beiden Lebenswochen eine langsamere Regeneration der zerstörten Darmepithelzellen zeigen (MOON, 1971).

Bei Ratten kam es zehn Tage nach einer Besiedlung des Darms mit dem Nematoden *Nippostrongylus brasiliensis* zu einer signifikanten Reduzierung der Zottenlänge im Jejunum. Vierzehn Tage nach Abklingen der Infektion nahmen die Zotten wieder ihre normale Länge an (HYOH et al., 1999).

KENWORTHY (1976) beschrieb im Zusammenhang mit der Malabsorption beim Ferkel nach dem Absetzen eine Kryptenhyperplasie und Zottenatrophie.

Diese Veränderungen wurden auch bei Ferkeln gesehen, die unter einer casein- oder sojaproteinhalten Diät abgesetzt worden waren (MILLER et al., 1984).

Bei Legehennen, die für 12 Stunden bis 20 Tage fasten mussten, zeigte sich vor allem im Duodenum eine deutliche Reduktion der Zottenlänge. Auch im Jejunum und im Ileum wurden die Zotten mit zunehmender Fastendauer immer kürzer. Wurden die Tiere nach der Fastenzeit wieder gefüttert, so kam es im Duodenum sehr schnell und im Ileum eher langsamer wieder zur Zunahme der Zottenlängen (YAMAUCHI, 1996).

Bei saugenden Ratten, denen die Milch entzogen wurde, nahm die Zottenhöhe ab. Die Kryptentiefe wurde von einem solchen Milchentzug nicht beeinflusst (PALANCH, ALVARES, 1998).

Bei adulten Ratten kam es nach einem Futterentzug zur Abnahme der Zottenlänge und der Kryptentiefe (ALTMANN, 1972).

Bei konventionell gehaltenen, eine Woche alten Hühnchen wurden, im Vergleich zu keimfrei gehaltenen älteren Tieren, eine signifikant größere Zottenfläche und Fläche der Lamina propria sowie Kryptentiefe gefunden (COOK, BIRD, 1973).

SPRINZ (1961) fand, zusätzlich zur ansteigenden Fläche, eine zunehmende Zahl der Enterozyten sowie eine Zunahme der totalen Anzahl der Zotten/ Längeneinheit im Dünndarm bei konventionell gehaltenen Tieren.

Mit dem Puten-Rotavirus Strain TU 2 infizierte Puten verschiedenen Alters haben ein geringeres Zotten-Kripten-Verhältnis als die Kontrollputen (YASON et al., 1987).

Katzen, die mit Metazerkarien des Wurms *Metagonimus yokogawai* in Form einer leichten Infektion (10 000 Metazerkarien) und einer schweren Infektion (50 000 Metazerkarien) infiziert wurden, zeigten im Verlauf der Infektion eine Abnahme des Zotten-Kripten-Verhältnisses, bedingt durch Verkürzung, Abstumpfung, einer Fusion sowie Verdickung der Zotten und einer Kripten- Hypertrophie (LEE et al., 1981).

Menschen, die an einer akuten, nekrotisierenden Pankreatitis erkrankt sind, haben, im Vergleich zu den Kontrollen, im Ileum ein signifikant reduziertes Zotten-Kripten-Verhältnis, das durch eine Reduktion der Zottenhöhe bei diesen Menschen bedingt ist (AMMORI et al., 2002).

Gnotobiotische Ratten haben, im Vergleich zu konventionell gehaltenen, ein fast doppelt so großes Zotten-Kripten-Verhältnis (ZUFAROV et al., 1979).

2.6.2. Einfluss der Fütterung auf Qualität und Quantität der Becherzellen

Becherzellen bilden entlang des gesamten Darmtrakts Schleimsubstanzen, die wie eine Gelschicht auf den Enterozyten liegen, sie vor mechanischen, chemischen und bakteriellen Einflüssen schützen und die die Passage des Nahrungsbreis erleichtern, indem sie als Schmiermittel fungieren (CROSS et al., 1984; ALLEN, 1989).

Die Schleimschicht bildet auf verschiedene Weise eine protektive Barriere gegen Pathogene (FLEMSTRÖM et al., 1999; FORSTNER et al., 1994). Sie wirkt einerseits als physikalische

Barriere, andererseits enthält sie Bindungsstellen für bakterielle Adhäsine und eine hohe Konzentration von sezerniertem IgA und Lysozymen, zu guter letzt dient sie als Radikalfänger (MILLER, et al., 1981; ROZEE et al., 1982; ROBERTON et al., 1999).

Im Colon bildet die in den Becherzellen produzierte Muzinschicht ein essentielles Milieu für die enteritische Mikroflora. Die Schleimsekretion wird durch neurale, endo- sowie parakrine Effekte reguliert (ALLEN, 1989; BROWN et al., 1993; FORSTNER et al., 1994; FORSTNER, 1995; SABABI, 1995; ICHIKAWA et al., 1998; PLAISANCIÈ et al., 1998). Die Stärke der Schleimsekretion stellt ein Gleichgewicht zwischen der Sekretionsrate und der Erosion durch die enzymatische Verdauung durch Proteasen und mechanische Reize her (ALLAN, 1989; ALLAN et al., 1991).

ATUMA et al. (2000) stellten fest, dass von den Becherzellen zwei Arten des Schleims sezerniert werden, eine fest anheftende Schicht (Glykokalix), die die protektive Barriere darzustellen scheint, und eine lockere Schicht, die als Schmiermittel wirkt. Letztere lässt sich absaugen und wird nach dem Entfernen schnell wieder ersetzt.

Die Zusammensetzung der Schleimschicht ist je nach Nahrung und bakterieller Präsenz unterschiedlich (FILIPE, 1979; NEUTRA et al., 1987). Sie setzt sich aus Glycoproteinen, Lipiden, Wasser, abgestorbenen Epithelzellen, Elektrolyten und Bakterien zusammen. Der Hauptbestandteil ist neben dem Wasser (95%) das Glycoprotein (bis 5%). Lipide, Mineralsalze und freie Proteine haben einen Anteil von 0,5 bis 1%. Zusammen bilden diese Komponenten ein dynamisches Gelnetzwerk.

Muzin ist das Glycoprotein der Schleimsubstanz und liegt in zwei Formen, dem löslichen sezernierten und dem membrangebundenen Muzin, vor. Das lösliche Muzin bildet mit seinem hohen Molekulargewicht und der Fähigkeit, Disulfidbrücken zu bilden, ein visköses Gel. Das membrangebundene Muzin hingegen hat eine hydrophobe Domäne, mit der das Molekül in der Plasmamembran verankert ist (ROUSSEL et al., 1988; STROUS et al., 1992).

Die Proteinkomponenten haben einen hohen Anteil an den Aminosäuren Serin, Threonin, Alanin, Glycin und Prolin sowie einen geringen Gehalt von aromatischen Aminosäuren. An den Proteinen sind direkt Zuckerreste gebunden. Die fünf meist gefundenen Monosaccharide sind: N- acetylgalactosamin, N- acetylglucosamin, Galactose, Fructose und Sialidsäure (CARLSON, 1968).

Die sauren Muzine sind, im Gegensatz zu den neutralen, resistent gegen den enzymatischen Abbau durch die bakteriellen Glycosidasen und den meisten Proteasen (FONTAINE et al., 1998; ROBERTON et al., 1997). Des Weiteren inhibiert die Sulfatierung der terminalen

Carbohydrate in vitro das bakterielle Wachstum im Gegensatz zu den nicht sulfatierten Carbohydraten (CHANCE et al., 2000).

CONOUR et al. (2000) fütterten Ferkel total parenteral (TPN), zu 80% parenteral + 20% enteral (PEN) oder 100%ig enteral (FEN) über drei bis sieben Tage. Zwischen dem dritten und siebenten Tag der Fütterung kam es bei den TPN- Tieren zu einer Expansion der Becherzellen mit Sulfomuzin, Sialomuzin oder neutralem Muzin in den Zotten des Dünndarms, wobei die Becherzellen der Krypten nicht so deutlich von der Art der Futteraufnahme beeinflusst wurden.

Ratten, die mit einer faserfreien Diät gefüttert wurden, hatten weniger Becherzellen in den Zotten als Ratten, die die gleiche Diät mit einem Zusatz von 20% Weizenkleie bekamen (SCHNEEMANN et al., 1982).

Tiere, die eine Diät mit 10% Zellulose oder Weizenkleie bekommen hatten, zeigten eine höhere Becherzellaktivität (CASSIDY et al., 1981).

Der Zusatz von 5% Zitrusfaser zeigte eine signifikant höhere Muzin- Reaktivität im Rattenmagen und- darm als bei der Kontrollgruppe, die eine faserfreie Diät erhalten hatten (SATCHITHANANDAM al., 1989).

Hühner, die mit einem Xylanase- Zusatz gefüttert wurden, zeigten einen Anstieg des neutralen, carboxylierten und sulfatierten Muzins im Jejunum. Bei Hühnern, die eine Maisdiät bekommen hatten, enthielten die Becherzellen der Oberfläche und in den oberen Krypten mehr neutrale Muzine im Dünn- und Dickdarm als Becherzellen von Tieren, die mit Weizen gefüttert worden waren. Im Caecum war eine Abnahme der neutralen Muzine zu erkennen (SHARMA et al., 1997).

DUNSFORD et al. (1991) untersuchten früh abgesetzte Ferkel (21 Tage) in Hinblick auf den Einfluss verschiedener Diäten auf die Becherzellpopulation. Am 24.Lebenstag, also dem dritten Tag nach dem Absetzen, kam es zu einer Abnahme der AB- positiven und PAS- positiven Becherzellen in allen drei Diätgruppen. Danach, vom dritten bis 15.Tag nach dem Absetzen, stieg die Anzahl der Becherzellen in den Zotten. In den Krypten blieb sie die ganze Zeit über auf einem niedrigen Niveau. Er postulierte, dass das Absetzen an sich und nicht die Absetz- Diät der Grund für die Abnahme der Becherzellpopulation, der Veränderungen der intestinalen Strukturen im Allgemeinen, am stärksten im Duodenum, ist.

2.6.3. Einfluss anderer Faktoren auf die Becherzellen

CLAUS et al. (2001) verglichen die Anzahl der Becherzellen bei gesunden Ferkeln mit der Anzahl der Becherzellen bei an Durchfall erkrankten Ferkeln, die mit *E. coli* infiziert waren. Im Duodenum der kranken Ferkel fand man fast zweimal soviel Becherzellen verglichen mit den gesunden Tieren. Im Jejunum war die Anzahl der Becherzellen bei den an Diarrhö erkrankten Ferkeln nur um 20% erhöht.

BROWN et al. (1988) untersuchten die Qualität und Quantität der Becherzellen bei nicht abgesetzten und abgesetzten Ferkeln. Sie fanden, dass die Qualität der Becherzellen nicht vom Alter, sondern von der Lokalisation der Becherzellen im Darm abhängt. So zeigten alle Altersgruppen (ein Tag, drei und zehn Wochen alt) vorrangig sulfatierte saure Muzine in allen Darmabschnitten, vor allem aber im Dickdarm. Nicht sulfatierte Muzine wurden hauptsächlich an der Kryptenbasis des Dünn- und Dickdarms und neutrale Muzine in Becherzellen, die weiter oben in den Krypten oder aber in den Zotten lagen, gefunden. Nach dem Absetzen war ein kontinuierlicher Anstieg der Becherzellanzahl in den Zotten und Krypten mit zunehmendem Alter zu erkennen. Die sulfatierten Muzine nahmen mit dem Alter relativ zu und ihre Verteilung in den Krypten veränderte sich im Vergleich mit den noch nicht abgesetzten Ferkeln. Bei den nicht- sulfatierten sauren Muzinen war eine Abnahme zu verzeichnen.

2.7. Proliferation

Der Dünn- und Dickdarm sind Orte mit einer sehr hohen Zellumsatzrate.

Die Epithelzellen werden in einem Turnus von drei bis sechs Tagen erneuert, wobei die Stammzelle aller Funktionszellen des Darms in den unteren $\frac{2}{3}$ des Kryptenbereichs lokalisiert ist. Etwa 60% der Gesamtzellzahl einer Krypte können zweimal am Tag einen Zellzyklus durchmachen. So durchlaufen z. B. 150 Zellen von 250 Gesamtzellen in den Dünndarmkrypten einer Maus einen kompletten Zyklus (POTTEN et al., 1996).

Nach POTTEN et al. erhalten Stammzellen ihre Fähigkeit, um, je nach Umstand, ihre Optionen zu ändern. Sie können einmal die Stammzellpopulation erhalten und zum anderen das Gewebe nach zytotoxischen Einflüssen regenerieren.

Aus der Stammzelle, die auch als Transitzelle bezeichnet wird (POTTEN et al., 1997), können sich fünf verschiedene Phänotypen, und zwar eine Panethzelle, eine Becherzelle, eine endokrine Zelle, eine M- Zelle oder ein absorbierender Enterozyt, entwickeln.

Die Panethzellen scheinen eine antibakterielle Funktion zu haben. Sie liegen in der Kryptenbasis und haben ein extensives endoplasmatisches Retikulum und sekrethaltige Granula, mit denen sie hohe Mengen Proteine, wie Lysozyme, TNF- α und Kryptidine (eine Art Defensin) sezernieren, womit sie in einem geringen Anteil zur Abwehr gegen Bakterien beitragen könnten. Allerdings sind diese antibakteriellen Eigenschaften der Panethzellen noch nicht erwiesen (DECKX, 1967; OUELETTE, 1989; TAN et al., 1993; HARWIG und EISENHAUER, 1995).

Die M-Zellen befinden sich im Epithel der über den Peyer' Platten gelegenen, oben beschriebenen Dome. Zu ihrer Aufgabe gehört die Präsentation von Antigenen den darunter liegenden Lymphozyten (SMOLLICH, MICHEL, 1992).

Die Aufgabe der pokalförmigen Becherzellen ist die Muzinproduktion. Dieses schützt einerseits die epitheliale Oberfläche und erleichtert andererseits den Nahrungstransport. Bevor eine Becherzelle voll differenziert und funktionstüchtig ist, muss sich die Stammzelle fünf- bis sechsmal teilen (PAULUS et al., 1993).

Endokrine Zellen sind wesentlich seltener als die Becherzellen (POTTEN et al., 1997). CHENG und LEBLOND (1974) nehmen an, dass sie aus der gleichen Stammzelle wie die Becherzellen entstehen.

Die am weitesten verbreitete Zelle des Darmepithels ist der Enterozyt, der im Dickdarm auch Colonozyt genannt wird; er hat generell die Fähigkeit zur Absorption. Sein Bürstensaum entwickelt sich während der Differenzierung in den oberen Kryptenbereichen, wobei bei reiferen Zellen die Mikrovilli länger und zahlreicher werden. Diese apikal sitzenden Mikrovilli bilden eine riesige Fläche, durch die Moleküle und Ionen sehr schnell aufgenommen und transportiert werden können (POTTEN et al., 1997).

Die proliferierenden Zellen liegen in dem unteren Bereich der Krypten und wandern dann innerhalb von zwei bis drei Tagen kontinuierlich, während ihrer Differenzierung und Reifung, nach oben in Richtung luminaler Oberfläche, wo sie die Zottenspitze erreichen und schließlich ins Lumen abgestoßen werden (QUI, 1994).

Anhand der Lage der Zellen in der Krypte kann man ihr Alter und ihren Reifezustand beurteilen.

POTTEN und HENDRY (1995) erstellten ein Schema der Hierarchie der Stammzellen.

Die Basis bilden vier bis sechs ultimative, lineare, ursprüngliche Stammzellen. Sie teilen sich dreimal. Schon durch eine geringe Strahlendosis können diese Zellen unter dem Bild der Apoptose absterben. Die zweite, über der Basis gelegene Schicht wird durch deren direkte Tochterzellen gebildet. Sie umfasst etwa sechs Zellen, die sich nur noch zweimal teilen. Die Zellen dieser Schicht sind resistenter gegen radioaktive Strahlen und können, wenn die Zellen der unteren Schicht abgetötet sind, ihre Funktion übernehmen. Die oberste Zellschicht besteht aus 24 Zellen, die sich nur noch einmal teilen und zuerst die Zottenspitze erreichen. Sie sind sehr resistent gegenüber radioaktiver Strahlung.

Die Kryptenentwicklung findet in den ersten 14 Tagen post partum statt. Es wird angenommen, dass alle Zellen einer Krypte in diesem Stadium von einer Stammzelle abstammen. In einem Versuch wurde der Darm von Mäusen mit dem Lektin Dolichos biflorus behandelt. Die Krypten der neugeborenen Tiere reagierten danach entweder positiv oder negativ für dieses Lektin. Gemischte Krypten, wie sie bei älteren Tieren gesehen wurden, gab es hier nicht (PONDER et al. 1985; SCHMIDT et al. 1988).

Die Teilung der Stammzellen verläuft größtenteils asymmetrisch, d. h. nur eine Tochterzelle reift heran und differenziert sich. Dies ist eine Einrichtung, die gewährleistet, dass die Zahl der Kryptenzellen konstant bleibt. Nur in 5% der Teilung findet eine symmetrische Teilung statt, d. h. beide Tochterzellen differenzieren sich und reifen heran (LOEFFLER et al., 1993). Andernfalls käme es zu einer Hyperplasie der Krypten. Außerdem ist es die Voraussetzung dafür, dass weitere Stammzellen erhalten bleiben, die für weitere Proliferationen benötigt werden.

Eine weitere Einrichtung zur Erhaltung einer konstanten Kryptenzellzahl ist die spontane Apoptose. Man findet etwa eine apoptotische Zelle in jeder fünften Krypte, v. a. in der vierten bis sechsten Position, d. h. in der Stammzell- Zone. 5- 10% der Stammzellen gehen per Apoptose zugrunde (POTTEN, 1977, 1992). Die Kontrolle der Stammzellanzahl ist wichtig für das homeostatische Gleichgewicht, denn eine Stammzelle zuviel bedeutet etwa 60 bis 120 mehr Zellen pro Krypte.

2.7.1. Einfluss auf die Proliferation im Darm

Es gibt verschiedene Faktoren, die den Zellumsatz positiv oder negativ beeinflussen. So fanden z. B. JOHNSON und GEE (1986), die Ratten mit einer Kontroll-semisynthetischen Diät und mit zwei Testdiäten, die zusätzlich Guar- Gummi oder Carboxymethylzellulose

(CMC) enthielten, gefüttert hatten, dass die Mukosazell- Produktionsrate im Dünn- und Dickdarm in beiden Testgruppen größer war als in der Kontrollgruppe. Die CMC-Gruppe zeigte besonders im distalen Ileum eine hohe Anzahl proliferationsaktiver Zellen. Sie war in dieser Lokalisation dreimal größer als in der Kontrollgruppe.

Weiterhin haben der Energiegehalt und der Zusatz von Purin einen Einfluss auf die Proliferationsrate. In einem Versuch von RAAB et al. (1998) erhielten Schweine eine Diät mit einem geringen Energiegehalt (Energiedefizit), mit einem hohem Energiegehalt oder eine Diät mit hohem Puringehalt. Die Proliferation wurde mit dem proliferativen Zellkern-Antigen (PCNA) nachgewiesen. RAAB et al. (1998) stellten einen signifikanten Anstieg der Proliferationsrate bei den Tieren, die eine hohe Energie- Diät bekamen, im Vergleich zu denen, die ein Energiedefizit hatten, fest.

Ein weiterer Anstieg der Mitoserate im Duodenum konnte in einem weiteren Versuch durch den Zusatz von Purin erreicht werden. So hatten Ratten, die zu einer normalen faserfreien Elementardiät einen Zusatz von 25% Pectin bekamen, signifikant mehr Ki67- positive Zellen/ Krypte in Ileum, Caecum und Colon als die Kontrolltiere, die das gleiche Futter ohne Pectinzusatz bekamen. Im Jejunum war der Mittelwert ebenfalls höher als bei den Kontrolltieren, aber es konnte keine Signifikanz festgestellt werden (FUKUNAGA et al., 2003).

In vivo wird die Mitoserate auch durch verschiedene Wachstumsfaktoren, wie dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), dem transforming growth factor- α (TGF- α) und dem insulin-like-growth factor-I (IGF-I), stimuliert (JOHNSON et al., 1994; ZIEGLER et al., 1995).

In vitro konnte eine Abhängigkeit der Proliferationsaktivität in Kryptenzellen von der Konzentration des Cytokins GM-CSF (granulocyt-macrophage colony- stimulating factor) festgestellt werden. Eine Konzentration von 25 bzw. 5 ng GM-CSF/ml Kulturmedium inhibiert die proliferative Aktivität der natürlichen, frisch isolierten Epithelzellen aus dem Mäusedarm. Eine Konzentration von 1ng GM-CSF/ml dagegen stimuliert sie signifikant (SENNIKOV et al., 2002).

Im Zusammenhang mit der Malabsorbtion beim abgesetzten Ferkel wurde von KENWORTHY (1976) eine ansteigende Mitose der Kryptenzellen beschrieben, die eine Kryptenhyperplasie zur Folge hat.

MILLER et al. (1984) fütterten abgesetzte Ferkel mit einer Casein- bzw. Sojaproteindiät und bestätigten die Erkenntnisse von KENWORTHY.

In verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Versuchen wurde herausgefunden, dass kurzkettige Fettsäuren, v. a. Butyrat (BLOTTIÈRE et al., 2003), aber auch Propionat und Valerat (SIAVOSHIAN et al., 1997b), die Zellproliferation regulieren. Sie wirken über drei Mechanismen. Zum einen ist Butyrat die Hauptenergiequelle der Colonozyten. Eine butyrathaltige Diät stimuliert daher eher die Proliferation als eine energiefreie oder –ärmere Diät (BLOTTIÈRE et al., 2003). Weiterhin können kurzkettige Fettsäuren die Freisetzung gastrointestinaler Peptide und von Wachstumsfaktoren stimulieren und damit die Proliferation, abhängig vom Vorhandensein von Rezeptoren und second messengers (Botenstoffen), beeinflussen. Durch ihre Wirkung auf den vaskulären Tonus können sie außerdem den Blutfluss verändern (MORTENSEN et al., 1990).

Schließlich wirken kurzkettige Fettsäuren direkt auf einzelne Gene, über die sie die Zellproliferation inhibieren und die Zelldifferenzierung sowie die Apoptose stimulieren können (BLOTTIÈRE et al., 2003).

Legehennen, die einer Fastenperiode von 12 Stunden bis zu 20 Tagen unterzogen wurden, zeigten eine Reduktion der Mitoserate im proximalen Darm. Als sie nach dem Fasten wieder gefüttert wurden, erreichte die Mitoserate bald wieder das Anfangslevel. Die Ergebnisse zeigen einen Zusammenhang der Zottenhöhe mit der Anzahl der epithelialen Zellen. Bei abnehmender Mitoserate werden auch die Zotten kürzer. Andererseits nimmt die Zottenlänge wieder zu, sobald die Mitoserate gestiegen ist (YAMAUCHI et al., 1996).

Beim Geflügel findet die Proliferation, im Gegensatz zu den Säugetieren, auch in den Zotten statt. UNI et al. (1998) wiesen proliferierende Zellen mit PCNA nach und fanden sowohl in den Krypten als auch in den Zotten positive Zellen. Allerdings war die Aktivität in den Krypten weitaus größer und nahm in Richtung Zottenspitze immer weiter ab.

COOK und BIRD (1973) untersuchten eine Woche alte, konventionell gehaltene Hühner und verglichen sie mit älteren, keimfrei gehaltenen Hühnern. Sie fanden heraus, dass der aktive Proliferationspool in den Krypten der konventionell gehaltenen Hühner mehr als doppelt so groß wie die analogen proliferativen Kompartimente der keimfrei gehaltenen Hühner war. Die Epithelzellen der konventionellen Hühner wanderten in der Krypten- Zottenverbindung etwa 1,7mal schneller als bei den keimfreien Tieren.

Ähnliche Ergebnisse erzielten GORDON (1960); REYNIERS et al. (1960); SPRINZ (1962); ABRAMS et al. (1963) und DUBOIS (1965). Sie fanden bei konventionell gehaltenen Hühnern und Rodentien einen größeren Anteil proliferierender Zellen in der Lamina propria als bei keimfrei gehaltenen Tieren. Ratten, denen während der Säugeperiode die Milch entzogen wurde, zeigten eine Abnahme der Zellproliferation. Im Gegensatz dazu zeigte der

Futterentzug bei frisch abgesetzten Ratten keinen Einfluss auf die Proliferation (PALANCH, ALVARES, 1998).

Wird aber wiederum erwachsenen Ratten das Futter entzogen, so hat das auch einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation im Darm (STEVENS- HOOPER et al., 1958; ALTMANN, 1972).

Die Proliferation kann auch durch physikalische Einflüsse, z. B. mit Bestrahlung, gehemmt werden. Bei einer Bestrahlung mit einem Gray ist der mitotische Index im Mäusedarm sehr klein (1-2%) und nach einer Bestrahlung mit acht Gray sind keine Mitosen mehr zu sehen (MARTIN et al., 1998).

Die Proliferation scheint auch von der Art der Fütterung abhängig zu sein. So hatten Schweine, die 100%ig parenteral ernährt wurden, weniger PCNA- positive Zellen in ihren Krypten als die Schweine der Kontrollgruppe, die 100%ig enteral gefüttert wurden (CONOUR et al.2002). Auch Mäuse, die total parenteral gefüttert wurden, hatten, im Vergleich zu den Kontrolltieren, 44,7% weniger BrdU (Brom-Desoxyuridin)- positive Zellen. Die Lokalisation der proliferierenden Zellen war in beiden Gruppen in den Lieberkühn' Krypten des Dünndarms (YANG et al., 2003).

Bestimmte Arzneimittel haben ebenfalls einen Einfluss auf den Zellumsatz im Darm. Bei Mitomycin-C behandelten Ratten waren die BrdU- positiven (proliferativen) Zellen, nicht wie bei den Kontrolltieren, nur in den Krypten lokalisiert, sondern man fand drei Tage nach der Injektion des Antibiotikums auch in den oberen Teilen der Zotten markierte Zellen. Am dritten Tag war der BrdU Labeling Index der behandelten Ratten am größten ($33,3 \pm 6,1$), sowohl im Vergleich zu den anderen Tagen als auch im Vergleich zu den Kontrolltieren ($10,2 \pm 1,7$). Am siebenten Tag ($5,0 \pm 0,7$) war er dann signifikant kleiner als am dritten Tag und auch signifikant kleiner als bei den Kontrollratten ($10,2 \pm 3,4$). Am 11.Tag nach der MMC- Injektion zeigten beide Gruppen ähnliche Werte in der Anzahl der proliferierenden Zellen (MORIMOTO et al, 2002).

Der Zellumsatz scheint auch von der Tageszeit und vom Geschlecht abhängig zu sein (BARBEITO et al., 2003). So zeigten sieben Tage alte, saugende, männliche Mäuse im Duodenum um 4.00 Uhr morgens die höchste mitotische Aktivität und um 16.00 Uhr die geringste. Die weiblichen Tiere gleichen Alters hatten mittags um 12.00 Uhr ihren Peak und um 20.00 Uhr zeigten sie den kleinsten Wert des mitotischen Indexes. Die 14 Tage alten Mäuse beider Geschlechter zeigten um 20.00 Uhr die stärkste Mitoserate. Das Minimum lag bei den männlichen Tieren um 12.00 Uhr und bei den weiblichen Tieren um 8.00 Uhr.

Insgesamt sah man bei beiden Geschlechtern, dass die älteren Tiere eine höhere Mitoserate hatten als die jüngeren.

2.8. Apoptose

Das Wort „Apoptose“ stammt aus dem griechischen (*αποπτωσις*) und bedeutet soviel wie „Laub abwerfen“ (POPOV, KOROCKIN, 2004).

Apoptose ist der morphologische Ausdruck des programmierten Zelltods (PZT).

Sie wird als genetisch kontrollierte Selbstzerstörung oder als Zellsuizid angesehen und ist ein zentrales Ereignis in der Gewebemorphogenese bei der Entwicklung der Tiere sowie in der Gewebemorphostase beim Adulten (POTTEN et al., 1997).

Durch sie werden ungewollte gesunde und zerstörte einzelne Zellen, z. B. Lymphozyten nach einigen Tagen, Tumorzellen und virusinfizierte Zellen (STELLER, 1995; KOROCKIN, 1999), entfernt, um den Embryo, das erwachsene Tier oder ein Gewebe zu schützen.

Der PZT ist ein selektiver Prozess von physiologischem Zellabbau (WYLLIE, 1981; UMANSKY 1982; BRUSCH et al. 1990; UCKER 1991). Er spielt eine wichtige Rolle bei der Form- und Größenkontrolle normaler und abnormaler Prozesse (KERR et al., 1972, 1987; MARTZ und HOWELL, 1989; WILLIAMS, 1991; UCKER, 1991). Der PZT stellt eine homöostatische Funktion dar, die in Relation zur Gewebedynamik steht und ein „steady state“ bei einem sich kontinuierlich erneuernden Gewebe beibehält. Es ist eine Balance zwischen Zellteilung und Zelltod.

Am besten lässt sich die Apoptose mit dem Elektronenmikroskop identifizieren. Hier sieht man die typischen morphologischen Merkmale einer Apoptose am deutlichsten. Anfangs schrumpft das Zytoplasma und die Zelle wird von den benachbarten Zellen zusammen gedrückt. Danach verschwinden die Mikrovilli (JONES, GORES, 1997), im Kern kondensiert rund um die Kernwand das Chromatin und erscheint als halbmondförmiges Gebilde.

Schließlich teilen sich die Zelle und ihr Kern in kleinere Vesikel (POTTEN et al., 1997) und erscheinen als gestielte Protuberanzen (apoptotic bodies) an der Zelloberfläche (KERR, 1980; WYLLIE, 1984), wo sie von den Nachbarzellen (POTTEN et al., 1997) oder professionellen phagozytierenden Zellen (JONES, GORES, 1997) phagozytiert werden.

Die Apoptose wird intrazellulär reguliert (RUSTIN, 2002) und verlangt die Synthese bestimmter Proteine, z. B. Annexin. Daher ist sie im Endeffekt von den Genen, die diese Proteine synthetisieren, abhängig (POPOV, KOROCKIN, 2004).

Im gesunden, erwachsenen Dünndarm ist die Häufigkeit der Apoptose gering und v. a. in den Krypten als spontane Apoptose zu sehen (POTTEN et al., 1997). Sie findet in der Region statt, in der sich auch die Stammzellen befinden. Die Kontrolle der Stammzellzahl, die durch ein Zusammenspiel von Proliferation und Apoptose ermöglicht wird, ist die Basis für das Erhalten des Gleichgewichts des zellulären outputs der Krypten und Zotten und damit einer stabile Kryptengröße (POTTEN et al., 1997). Eine Reduktion der Zellzahl wird durch eine Abnahme der Proliferation und / oder Zunahme der Apoptose erreicht und für eine ansteigende Zellzahl ist eine Zunahme der Proliferation und / oder eine Abnahme des Zelltods notwendig (POTTEN et al., 1997). Man geht davon aus, dass 10% der Stammzellen durch Apoptose zugrunde gehen. Eine solche apoptotische Zelle sieht man durchschnittlich in jeder fünften longitudinal geschnittenen Krypte (POTTEN et al., 1997). Der Zellverlust an den Zotten kann auch Anoikis genannt werden. Hier verlieren die Zellen durch Apoptose ihre Adhäsionsfähigkeit, die sich anfänglich durch den Verlust der Integrin- Funktion (MONTGOMERY et al., 1994; BATES et al., 1995; BOUDREAU et al., 1995) oder durch eine veränderte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, die man z. B. durch eine ansteigende Tenascin- Expression, einer extrazellulären Matrix- Komponente mit anti-adhäsiven Eigenschaften, erkennen kann, zeigt (PROBSTMEIER et al., 1990).

Die Apoptose an den Zottenspitzen des Dünndarms ist ein physiologisches Ereignis bei allen Spezies, allerdings unterscheidet sie sich in dem Prozessablauf.

So werden bei den Rodentien die „apoptotic bodies“ von der Zottenspitze aus ins Lumen entlassen (UDIN et al., 1984; TRABER et al., 1991; HODIN et al., 1995; COOPERSMITH et al., 1997). Bei Meerschweinchen und Affen dagegen werden die apoptotischen Zellen von Makrophagen phagozytiert, die sich in der Lamina propria unter dem Epithel ansammeln (HAN et al., 1993). Ein weitere Hinweis dafür, dass auch an der Zottenspitze Apoptose stattfindet, ist der, dass BAX, ein Zelltod-Gen, außer zwischen den Krypten auch an der Zottenspitze exprimiert wird (WILSON und POTTEN, 1987).

Im Lichtmikroskop ist es sehr schwer, einen in situ Zelluntergang zu erkennen (KERR, 1987), da das Erscheinen einer apoptotischen Zelle nur wenige Minuten dauert (RUSSELL et al., 1972; SANDERSON, 1976; MATTER, 1979; KERR et al., 1987). Das Auftreten der „apoptotic bodies“ in diversen Formen ist nur wenige Stunden sichtbar, bevor sie phagozytiert werden (WYLLIE, 1980; BUSCH, 1990).

Ein weiteres kennzeichnendes Ereignis der Apoptose ist die internucleosomale Spaltung der DNA in spezielle Fragmente durch calcium- und magnesiumabhängige Endonukleasen.

Diese DNA- Fragmente können dann mit Hilfe verschiedener Techniken, z. B. ISEL/ TUNEL- Methode (GRAVRIELI et al., 1992), die die freien Enden der gespaltenen DNA markieren, den Nachweis für apoptotische Zellen liefern. Es ist zu bemerken, dass die DNA- Fragmente nicht nur in histologisch definierten Apoptosezellen auftreten. Man findet sie mit dieser Methode auch in morphologisch intakten Zellen, die durch den Prozess des PZT gehen (UMANSKY 1982; MOTYKA und REYNOLDS, 1991). Man kann mit der TUNEL- Methode im Ablauf der Apoptose schon eher Zellen sehen, die unter dem Bild des PZT zugrunde gehen, als dass bei der morphologischen Untersuchung der Fall ist.

KERR (1987) konnte morphologisch keine apoptotischen Zellen an der Zottenspitze ausmachen. Bei der TUNEL- Methode allerdings wurde eine deutliche Demarkation der Zellkerne an der erwarteten Stelle gefunden.

POTTEN (1977) konnte bei Mäusen einen zirkadianen Rhythmus der Apoptose zuordnen. Das Maximum liegt in den frühen Morgenstunden, direkt im Anschluss der Mitte der Dunkelperiode mit 12 Stunden Licht-/Dunkelheitszyklus.

Andere Autoren fanden heraus, dass die ornithine Decarboxylase eine wichtige Rolle beim Zellumsatz spielt. Sie kontrolliert die Proliferation, ihre Aktivität unterliegt einem zirkadianen Rhythmus (FUJIMOTO et al., 1978; TABATA et al., 1986) und wird durch die Futteraufnahme stimuliert (SEPULVEDA et al., 1982; TABATA et al., 1986).

Nach einer Irritation des Darms wurden besonders in den tieferen Kryptenregionen Anzeichen für eine p53- Expression gefunden, obwohl dieses Gen bei normalen Tieren nicht im Dünndarm vorkommt (POTTEN, 1997; POTTEN et al., 1994). Daraus wurde geschlossen, dass p53 bei der Erkennung der DNA- Zerstörung beteiligt sein muss und die Einleitung der Apoptose durch Entdeckung der zytotoxischen Agentien induziert (MORIMOTO et al., 2002).

POTTEN (1992) ist der Meinung, dass die schnelle Antwort auf zytotoxische Agentien eine beschleunigte Zellzyklusaktivität und/oder ein Abnahme der Apoptose der benachbarten Stammzellen ist.

Die Apoptose wird durch eine Kaskade verschiedener Enzyme, u. a. auch durch Caspase 1-9 genannte Proteasen, ausgelöst. Diese enthalten in ihrem aktiven Zentrum Cystein und schneiden die Proteine nach der Aminosäure **Aspartat**, woraus sich auch ihr Name zusammensetzt. Eine auch zum Nachweis oft verwendete Protease ist die Caspase 3. Sie aktiviert eine Endonuklease, die dann die DNA in 80 bis 120 Basenpaar große Oligonukleotide spaltet (COHEN, 1997; KIECHLE und ZHANG, 1998).

In neueren Untersuchungen wurde nun entgegen der bisherigen Annahme, dass die Caspase-Apoptose der Standard- PZT ist, gezeigt, dass die morphologische Apoptose auch ohne Beteiligung von Caspasen stattfinden kann (GUIMARÀES, LINDEN, 2004).

Das heißt, die autophagische Ausführung des Weges des PZT findet entweder ohne Beteiligung der Caspasen oder ohne Beteiligung der morphologischen Zeichen der Apoptose statt. Es wurden Komponenten auf Molekularebene identifiziert, die annehmen lassen, dass es ein intrazelluläres Programm gibt, das unter einem Kommando steht (GUIMARÀES, LINDEN, 2004).

2.8.1. Einfluss der Fütterung auf die Apoptose

Die Apoptose wird, wie auch die anderen Kriterien, durch verschiedene Faktoren, z. B. Fütterung, physikalische Noxen, Arzneimittel, Alter usw., beeinflusst.

Sie scheint bei Schweinen nicht durch eine parenterale Fütterung beeinflusst zu werden. So hatten Schweine, die total parenteral gefüttert wurden, ähnliche Werte positiv gefärbter TUNEL- Zellen wie die Schweine, die total enteral gefüttert wurden. Man konnte aber eine progressive Zunahme der Apoptose in der Kontrollgruppe mit dem Alter erkennen (CONOUR et al., 2002).

Andererseits konnte bei Mäusen, die total parenteral gefüttert wurden, festgestellt werden, dass der Anteil der epithelialen Zell- Apoptose signifikant um ein dreifaches im Vergleich zu den Kontrolltieren anstieg. TUNEL-positiv gefärbte Zellen wurden in den Zotten und Krypten sowohl bei den Kontroll- als auch bei den TPN- ernährten Mäusen gesehen (YANG et al., 2003).

In einem Versuch (HOLT et al., 1998) wurden junge (vier bis fünf Monate alt) und ältere Ratten (24- 25 Monate alt) untersucht. Sie erhielten eine ad libitum Fütterung oder eine Diät, bei der sie nur 60% der Kalorien bekamen, die die ad libitum- Ratten aufnahmen. Im Dünndarm wurden nur in den oberen 20% der Zotten- Krypten- Säule positive TUNEL- Zellen gefunden. Im Gegensatz zu den anderen Gruppen (1,8% bis 3,6% apoptotische Zellen) hatten die älteren Ratten, die eine kalorienreduzierte Diät bekamen, einen signifikant höheren apoptotischen Index (10,2%) im Jejunum. Im Colon war der apoptotische Index in allen Gruppen höher als im Jejunum, und auch hier war wieder der Anteil der apoptotischen Zellen der älteren, kalorienreduziert- gefütterten Ratten signifikant größer als bei den jüngeren und ad libidum- gefütterten Ratten.

Eine andere Studie (HOLT et al., 1984) zeigt, dass der Dünn- und Dickdarm älterer Ratten im allgemein eine höhere Anzahl Kryptenzellen hat, so dass man bei ihnen auch von einer ansteigenden Zellproduktionsrate und damit einhergehenden Zellumsatz ausgehen muss. IWAKIRI et al. (2001) untersuchten den Einfluss des Fastens auf Apoptosevorgänge bei Ratten, die 24 Stunden kein Futter bekommen hatten. Apoptotische Zellen waren in dem oberen Drittel der Darmzotten lokalisiert. Die DNA- Fragmentierung hatte in der Zeit zwischen 9.00 und 12.00 Uhr ihren Peak. Der prozentuale Anteil der DNA- Fragmentierung war bei den Ratten, die fasten mussten (32% im Ileum, 25% im Jejunum), größer als bei den Tieren, die gefüttert wurden (9% in Ileum und Jejunum).

Bei den gefütterten Tieren zeigte sich noch der Effekt, dass es im Duodenum erst sechs Stunden nach der Fütterung zu einer Zunahme der DNA- Fragmentierung kam, die nach 12 Stunden am höchsten war, danach wieder abnahm und nach 24 Stunden wieder das Anfangslevel erreichte. Im Jejunum und Ileum stieg die DNA- Fragmentierung im Verlauf der Zeit nach der Fütterung kontinuierlich an.

2.8.2. Einfluss anderer Faktoren auf die Apoptose im Darm

CHERLA et al. (2003) untersuchten den Einfluss von Shigatoxinen auf die Apoptose in verschiedenen Zelllinien. Das Toxin aktiviert die Kaskade des programmierten Zelltods. CHERLA et al. fanden heraus, dass dieser durch verschiedene Mechanismen einleitet wird. Es wurden verschiedene Zelllinien, wie Epithelzellen, Endotheliale Zellen, B- Lymphom-Zelllinien, Astrocytom- Zellen, monocytische Zelllinien, neutrophile und amniotische Zelllinien untersucht, und alle reagierten unterschiedlich auf eine Infektion mit Shigatoxin. So fehlt z. B. in den T84- Zellen (eine humane intestinale Epithelzelllinie) der Toxin-Glykolipidrezeptor. Diese Zellen werden in vitro nicht durch das Toxin getötet. Sie können sogar das Toxin von der apikalen zur basolateralen Oberfläche versetzen (HURLEY et al., 1999).

Bovine Kryptenepithelzellen hingegen exprimieren Gb3, einen Glykolipidrezeptor. Sie werden trotzdem nicht durch Shigatoxin getötet, da sie die Fähigkeit haben, das Toxin erst zu den Lysosomen und dann ins endoplasmatische Retikulum zu schleusen (HOEY et al., 2003). Behandelt man HCT8 (eine humane intestinale Epithelzelllinie) mit Shigatoxin 1, kommt es zur Aktivierung der stressaktiven Kinase- Kaskaden INK/SAPK und p38 sowie der Caspase-3 und endet schließlich in einer Apoptose mit einer DNA- Fragmentierung.

Mit Hilfe eines p38- Kinase- Hemmers (SB202190) konnten die Caspase-3- Aktivierung und damit die Zytotoxizität blockiert werden (SMITH et al., 2003).

Es ist bekannt, dass eine Mitomycin C- Therapie eine Toxizität im Dünndarm hervorrufen kann. Ratten, die mit Mitomycin C (MMC) behandelt wurden (MORIMOTO et al., 2002), hatten im Vergleich zu den Kontrolltieren, v. a. am dritten Tag post infectionem, in den Positionen vier bis sechs der Krypten viele TUNEL- positive, d.h. apoptotische Zellen. An den Zottenspitzen wurden dagegen nur wenige apoptotische Zellen gefunden. Bei den Kontrolltieren war es genau umgekehrt. Am siebenten Tag nach der Behandlung nahm die Zahl der positiv- reagierenden Zellen ab, und die Lokalisation war eher im mittleren Teil der Zotten. Am 11.Tag nach der MMC- Injektion erreichte die Anzahl TUNEL- positiver Zellen das Level der Kontrolltiere, und der Anteil der apoptotischen Zellen nahm zu.

In der Elektronenmikroskopie fanden die Untersucher in den Krypten der MMC- behandelten Ratten und an den Zottenspitzen der Kontrolltiere die typischen morphologischen Merkmale der Apoptose, wie die Chromatin- Kondensation, ein reduziertes Zellvolumen und apoptotic bodies. Auch im Lumen des Darms wurden einige apoptotic bodies gefunden.

ROWE et al. (2003) untersuchten apoptotische Zellen bei gesunden Pferden oder Pferden mit leichter oder kompletter (strangulierender) Obstruktion im Dün- oder Dickdarm. Sie fanden apoptotische Kerne, die sie mit der TUNEL- Methode nachwiesen, in der Mucosa, in der zirkulären und longitudinalen Muskulatur sowie in der Serosa. Bei Pferden, die eine starke Obstruktion hatten, wurden mehr apoptotische Zellen, vor allem im Obstruktionsbereich oder im Gewebe, das seitlich der Obstruktion lag, gefunden, als bei Pferden, die nur eine leichte Obstruktion hatten.

Bei Ratten, die mit dem Nematoden *Nippostrongylus brasiliensis* infiziert wurden (HYOH et al., 1999), kam es zu einem Anstieg der Apoptose im Zottenepithel am siebenten bis zehnten Tag post infectionem, assoziiert mit einer Zottenatrophie. Vierzehn Tage nach der Infektion erreichten, nachdem der Wurm ausgeschieden wurde, die Zotten wieder ihre normale Länge, und die Anzahl der apoptotischen Zellen den Wert wie zu Beginn der Untersuchung.

Eine weitere Studie (LI et al., 1997) konzentrierte sich auf die von dem Toxin T2 induzierte Apoptose in den Kryptenepithelzellen im Dün- und Dickdarm von Mäusen.

Der Apoptosenachweis wurde mit einer modifizierten TUNEL- Methode durchgeführt.

Positive Zellen wurden sporadisch im Kryptenepithel gefunden. Im Elektronenmikroskop zeigten diese Zellen die typischen morphologischen Eigenschaften der Apoptose. Die Anzahl der apoptotischen Zellen stieg signifikant und dosisabhängig in den Krypten der untersuchten Darmabschnitte (Jejunum, Ileum, Colon). Der Anteil apoptotischer Zellen war während des

gesamten Versuchs bei den T2-Toxin- behandelten Mäusen größer als bei den Kontrolltieren. In der T2-Toxin- Gruppe stieg der apoptotische Index mit dem Verlauf der Zeit und dosisabhängig.

In einem Versuch von KIM et al. (2000) wurden Ferkel mit dem Transmissiblen Gastroenteritis (TGE) - Virus infiziert. Für den Nachweis der Apoptose wurde die TUNEL-Methode und eine DNA- Elektrophorese zum Nachweis der DNA- Fragmentierung durchgeführt. Das Jejunum und das Ileum wurden zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion untersucht und es wurden weder positive Zellen gesehen, noch fand eine DNA- Fragmentierung statt. Dieses Ergebnis veranlasste die Autoren anzunehmen, dass es in den Enterozyten TGEV- infizierter Ferkel keine Apoptosen gibt und dass die TGEV- induzierte Zerstörung der Enterozyten durch einen anderen Mechanismus als die Apoptose stattfinden muss. Vielleicht hat TGEV Strategien entwickelt, sich gegen Apoptose zu schützen; das würde die hohe Zahl des Virus in den Zellen bei einer akuten Infektion erklären. Denn das Virus verteilt sich rasant schnell in den Zottenenterozyten und zerstört diese innerhalb von 24- 48 Stunden nach der Infektion (SAIF und WESLEY, 1999).

2.8.3. Nekrose

Im Gegensatz zur Apoptose ist die Nekrose kein physiologischer Prozess. Sie tritt meist in Zusammenhang mit akuten Entzündungen oder anderen pathologischen Gewebereaktionen auf.

Im Prozess der Nekrose ist, im Gegensatz zur Apoptose, bei der meist nur einzelne zerstreute Zellen betroffen sind, oft eine ganze Gruppe der anliegenden Zellen involviert. Sie ist gekennzeichnet durch die Ruptur der Zellmembran und das daraus resultierende Ausfließen des Zellplasmas (PROSKURYAKOV et al., 2002).

Verschiedene Stimuli (Cytokine, Ischämie, Hitze, Irritation, Pathogene) können jedoch eine Apoptose und eine Nekrose innerhalb der gleichen Zellpopulation hervorrufen (PROSKURYAKOV et al., 2002).

Einige signalisierende Abläufe und Zeichen, wie das Vorhandensein bestimmter Rezeptoren, die Kinase- Kaskade und Veränderungen der Mitochondrien, kommen in beiden Prozessen vor. Durch Veränderungen dieser Abläufe ist es möglich, zwischen Apoptose und Nekrose zu wechseln (PROSKURYAKOV et al., 2002). So gibt es auch bestimmte antiapoptotische

Mechanismen (Bcl-2/ Bcl-X- Proteine), die auch im Schutz gegen Nekrose effektiv sind (PROSKURYAKOV et al., 2002).

Nekrose zusammen mit Apoptose scheinen nach Ansicht von PROSKURYAKOV et al. (2002) eine spezielle Form der ausführenden Phase des PZT zu sein. Aber in der Wirkung auf den Organismus unterscheiden sich beide. Da bei der Nekrose der cytosolische Inhalt durch die Plasmamembran in den Extrazellulärraum tritt, kommt es zu einer Antwort des Immunsystems, d. h. es läuft eine Entzündungskaskade ab. Bei der Apoptose hingegen werden die Produkte, die entstehen, durch eine Membran geschützt und dann durch Nachbarzellen oder Makrophagen phagozytiert.

Ein weiterer Unterschied ist der, dass die Nekrose unabhängig von der Expression bestimmter Gene ist. Die Apoptose aber braucht verschiedene Proteine und ist daher von der Expression der entsprechenden Gene abhängig.

Entgegen der allgemeinen Meinung sagt PROSKURYAKOV (2002), dass Nekrose nicht nur in pathologischen, sondern auch bei physiologischen Prozessen eine Rolle spielt.

So tragen Apoptose und Nekrose der Enterozyten zum Zellverlust bei der Erneuerung des Dünndarms bei (MAYHEW et al., 1999).

Auch im Dickdarm wurden in niedrigen Kryptenregionen isolierte nekrotische Colonozyten gefunden, so dass auch hier angenommen wird, dass die Nekrose an dem normalen Zellverlust beteiligt ist (BARKLA, GIBSON, 1999).

2.8.4. Apoptosenachweise und ihre Eignung

Apoptose kann mit verschiedenen Techniken nachgewiesen werden.

Die zuverlässigsten Methoden sind die Lichtmikroskopie und die Transelektronenmikroskopie, bei denen man direkt die toten Zellen anhand ihrer Morphologie identifizieren kann. Eine weitere Möglichkeit ist die Untersuchung mit dem Rasterelektronenmikroskop. Sie ist vorteilhaft, wenn man vor allem die Ausbreitung des epithelialen Zelltods zeigen möchte.

Allerdings werden die typischen morphologischen Merkmale nicht in allen apoptotischen Zellen gefunden (SANDERS, 1997), und sie zeigen sie, wenn überhaupt, erst in den letzten Kaskaden des Apoptosevorgangs. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Zellen sehr schnell von Makrophagen und/oder den Nachbarzellen phagozytiert oder aber ins Dünndarmlumen abgestoßen werden und es daher schwierig ist, den richtigen Zeitpunkt abzapassen, um Apoptosen sehen zu können (HALL et al. 1994).

Aus diesem Grund wurden zyto- und biochemische Methoden entwickelt, die apoptotische Zellen in den früheren Phasen der Apoptose markieren (GROOS et al., 2003).

Die älteste ist die von GAVRIELI (1992) entwickelte TUNEL- Methode oder „Terminal deoxynucleotidyl Transferase – mediated Biotin-deoxy Uracil Tri Phosphat Nick End Labeling- Methode. Sie weist DNA- Bruchstücke nach, die während der Apoptose entstehen. Man markiert diese Bruchstücke durch die enzymatische Belegung (mit der Terminal deoxynucleotidyl Transferase) freier OH-Gruppen mit modifizierten Nucleotiden (an Biotin gekoppeltes deoxy Uracil Tri Phosphat).

WIJSMAN (1993) modifiziert diese Methode, um auch Zellen in situ untersuchen zu können und nannte sie ISEL (in situ nick end labeling)- Methode.

Laut GROOS et al. (2003), die alle Techniken auf ihre Zuverlässigkeit hin an Ratten- und Menschen- Dünndärmen testeten, ist die TUNEL- Methoden wenig zuverlässig. Sie mussten, obwohl sie ein kommerzielles Fertigkit verwendeten, für jede Spezies eine eigene Nachweisteknik herausfinden. Ein weiteres Problem ist, dass man mit dieser Methode die Apoptose nicht von der Onkose unterscheiden kann (URASE et al., 1999).

Eine weitere Technik beruht auf den Nachweis der ss- (single stranded)- DNA, die während der Apoptose nach der Formamid- Denaturierung auftritt.

Sie wird mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers markiert, der sie spezifisch erkennt (FRANKFURT et al., 1996). Die Methode des anti-ss- DNA- Antikörpers wird von GROOS et al. (2003) als zuverlässiger als die TUNEL- Methode beurteilt, jedoch fordern die einzelnen FärbeprozEDUREN ein gut erhaltenes Gewebe.

Weiterhin kann die Aktivität der Caspase-3 (SAUNDERS et al, 2000), eine von neun Cystein-Aspartat- abhängigen Proteasen, die u. a. für die Fragmentation der DNA verantwortlich ist, die schließlich zum Zelluntergang führt, nachgewiesen werden. Dies geschieht mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers, der gegen die Caspase-3 gerichtet ist. Der Antigen-Antikörperkomplex wird dann mit der modifizierten PAP (Peroxidase-Anti-Peroxidase)- Methode nach STERNBERGER (1986) sichtbar gemacht. GROOS et al. (2003) beurteilten diese moderne Methode als zuverlässig im Nachweis von toten und sterbenden Zellen in frisch präparierten und fixierten Paraffin- Dünndarmproben von Mensch und Ratte.

Ein Vorteil dieser Methode ist, dass sie sehr spezifisch für die Apoptose ist, da bisher bei der Onkose noch keine Caspase-3 aufgetreten ist (GUO and HAY, 1999).