

3. Material und Methoden

3.1. Versuchsaufbau, Fütterung und Haltung der Tiere

Zehn Hybrid-Muttersauen der Rasse Duroc x Deutsche Landrasse aus einem Herkunftsbetrieb, die im Institut für Tierernährung an der FU- Berlin gehalten wurden, teilte man in zwei Gruppen auf.

Fünf Sauen bekamen ab dem 25. Trächtigkeitstag eine auf Gerste (543,0 g/kg) und Weizen (306,0 g/kg) basierende Diät in Pelettform verabreicht, der das Probiotikum *Enterococcus faecium* SF 68 (NCIMB 10415, Cylactin®, Roche) in einer Konzentration von 10⁹ KBE/ kg Futter beigemischt wurde und erhielten dieses Futter bis einen Tag ante partum. Die anderen fünf Muttertiere dienten als Kontrollgruppe und bekamen die Weizen- Gerste- Pellets ohne Zusatz. Die Fütterung erfolgte restriktiv in Abhängigkeit vom Körpergewicht.

Die tragenden Sauen wurden mit drei bis vier anderen Sauen in Liegebuchten aus Beton, die eine betonierte Lauffläche aufwiesen, gehalten.

Laktierende Sauen wurden in Kastenstände, die sich auf einem betonierten Fußboden mit Stroh- Einstreu befanden, verbracht. Sie erhielten vom Tag der Geburt der Ferkel an bis zum Absetztag (28. Tag post partum) eine Diät, die sich hauptsächlich aus Gerste (400,0 g/kg Futter), Triticale (149,5 g/kg Futter), Weizenkleie (106,7 g/kg Futter), Weizen (80g/kg Futter) und Sojabohnenmehl (160,0 g/kg Futter) zusammensetzte und ebenfalls in pelletierter Form verabreicht wurde. Die Sauen der Probiotikumgruppe erhielten zusätzlich 10⁹ KBE *E. faecium* SF68/ kg Futter. Die Futtermenge richtete sich nach dem Körpergewicht der Muttersau sowie nach der Anzahl der zu säugenden Ferkel.

Das Klima wurde auf 21,5°C und 65% Luftfeuchtigkeit eingestellt.

Eine 16 stündige Licht – und eine 8 stündige Dunkelperiode wurden kontinuierlich eingehalten.

Die Ferkel einer Sau wurden dann zur Untersuchung herangezogen, wenn die Wurfgröße mindestens zehn betrug und alle Ferkel sowie das Muttertier gesund waren.

Ab dem 15. Lebenstag hatten die Saugferkel freien Zugang zu einem Prästarter- Futter (bestehend aus Weizen (454,7 g/kg Futter), Sojabohnenmehl (274,0 g/kg Futter), Milchpulver (120,0 g/kg Futter) und Haferkleie (100,0 g/kg Futter)), das im Fall der Versuchsgruppe das Probiotikum enthielt. Bis dahin nahmen (hatten Kontakt)die Ferkel das Probiotikum während der Geburt im Geburtskanal und anschließend über den Kot der Muttersau auf.

Nach dem Absetzen bekamen die Ferkel *ad libitum* eine Basaldiät für Ferkel auf Weizen- (568,7 g/kg Futter), Sojabohnenmehl (234,0 g/kg Futter) und Gersten- (130,0 g/kg Futter) Basis. Dieses enthielt für die Versuchsgruppe die gleiche Konzentration an Cylactin® wie das Sauenfutter.

Die Sauen und Ferkel hatten während der gesamten Zeit freien Zugang zu Wasser. Die abgesetzten Ferkel kamen in flat-decks mit Spaltenboden. In der Regel wurden zwei Ferkel pro Box gehalten, in Ausnahmefällen waren es auch ein oder drei Ferkel pro Box.

Die Stalltemperatur lag hier im Durchschnitt bei 26 °C und wurde mit dem Alter der Ferkel reduziert.

3.2. Probengewinnung, -aufbereitung und- aufbewahrung

Die Ferkel wurden am 14. (letzter Tag vor der Zufütterung mit festem Futter), 28. (Absetztag), 35. (eine Woche nach dem Absetzen sowie nach Beginn der Fütterung mit der Basaldiät für Ferkel, die für die Probiotikumgruppe Cylactin ® enthielt) und 56. Lebenstag (drei Wochen nach dem Absetzen und Beginn der Fütterung mit dem Ferkelfutter mit oder ohne Probiotikumzusatz) mit Ketamin (0,2 ml/kg) /Stresnil® (Azaperon) (0,1 ml/kg) anästhesiert und für die Probenentnahme vorbereitet.

Aus jedem Wurf wurde jeweils ein Ferkel in der entsprechenden Altersgruppe gewählt.

Welches Ferkel der Probenentnahme diente, wurde noch vor dem 14. Tag p.p. per Losverfahren entschieden.

Um eine tiefe Narkose zu erreichen, wurden den Tieren ca. 0,5- 1,0 ml/ kg Lebendmasse des Pentobarbital- Präparates Eutha 77® (Firma Essex- Tierarzney) intraperitoneal appliziert. Die Probenentnahmen fanden immer in Zeit von 8.30 bis 9.00 Uhr statt.

Da auch andere Forschergruppen am Versuch beteiligt waren, für die möglichst keimfreie Bedingungen eine Voraussetzung für deren Untersuchungen waren, wurden die Ferkel vor der Probenentnahme am Bauch rasiert und mit einem sterilen OP- Tuch abgedeckt.

Nach der Eröffnung der Bauchhöhle in der Medianen und Aufsuchen des Anfangs- und Endabschnitts des Jejunums, erfolgte ein Hautschnitt, der vom Angulus mandibulae zum Sternum verlief. Dadurch wurde die V. jugularis sichtbar gemacht und die Tiere wurden mit einer Überdosis Pentobarbital, dass in diese Vene injiziert wurde, euthanasiert.

Es erfolgte sogleich die Entnahme von etwa 10 cm langen Gewebestücken aus folgenden Bereichen:

Duodenum descendens- im Bereich zwischen dem Pylorus des Magens und dem caudalen Ende des rechten Pankreasschenkels

1. Jejunum- proximal und distal der Mitte
2. Ileum- distale Hälfte, der Abschnitt, der ins Caecum mündet
3. Caecum- die Caecumspitze
4. Colon ascendens- unmittelbar distal des Caecums
5. Colon descendens- im Bereich des Colon sigmoideum

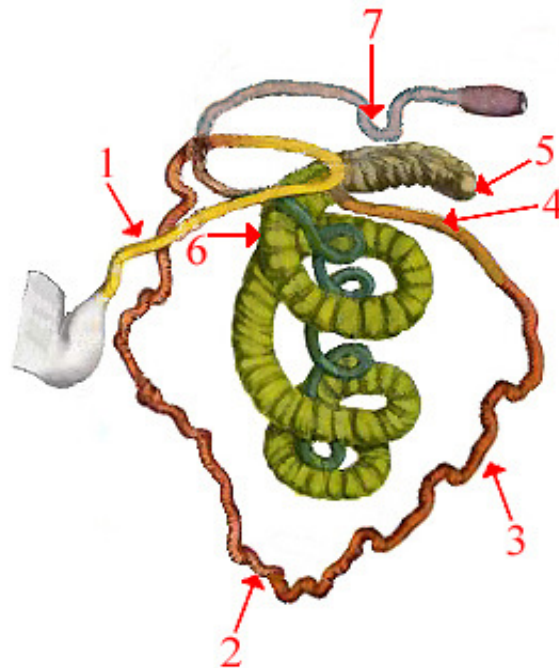


Abb.1: Entnahmestellen der Gewebeproben (nach NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE, 1987 umgezeichnet)

1. Duodenum
2. Jejunum 1
3. Jejunum 2
4. Ileum
5. Caecum
6. Colon ascendens
7. Colon descendens

Die entnommenen Darmabschnitte wurden mit warmer Ringerlösung gespült, um sie grob von ihrem Inhalt zu säubern. Dann wurden sie antimesenterial geöffnet, in kalter Ringerlösung gespült und wie folgt aufbereitet:

Für die Lichtmikroskopie wurden ca. 1cm² große Gewebestücke zurechtgeschnitten, diese wurden entweder mit Igelstacheln auf Korkplättchen aufgespannt und in Fixans gebracht, oder in Alufolie verpackt und in flüssigem Stickstoff bei -196°C tiefgefroren.

Die Fixation erfolgte in modifizierter Bouin- Lösung bei Raumtemperatur für 24 Stunden: 4% Pikrinsäure+ 2,5% Kupferacetat+ 3,5% Formol in Aqua dest..

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden Proben zurechtgeschnitten, die eine Seitenlänge von etwa fünf bis sieben mm hatten und ebenfalls mit Igelstacheln auf Korkplättchen gespannt und sodann in 2% Paraformol + 2,5% Glutaraldehyd in 0,1M Natrium-Cacodylatpuffer pH 7,2 für ca. sechs Stunden bei 4°C fixiert wurden (modifiziert nach KARNOWSKY, 1965).

3.2.1. Zubereitung der Proben für die Paraffineinbettung

Nach der 24 stündigen Fixierung in Bouin- Lösung wurden die Gewebestückchen von den Korkplättchen genommen und zurechtgeschnitten.

Sie wurden sodann, in Einbettkästchen liegend, in 70%igen vergällten Alkohol gebracht und etwa fünfmal mit diesem für jeweils eine Stunde gespült. Die Proben wurden auch über Nacht in 70%igen Alkohol gelagert und am nächsten Tag in 80%igem Alkohol für insgesamt 24 Stunden überführt. Der 80%ige Alkohol wurde alle ein bis zwei Stunden gewechselt, bis die lösliche Pikrinsäure weitgehend herausgespült war.

Am darauf folgenden Tag wurden die Proben aus dem 80igen in 90%igen Alkohol für eine Stunde überführt. Danach wurden sie für zweimal eine Stunde in den 96%igen Alkohol gebracht, bevor sie für dreimal eine Stunde in 100%igem Alkohol kamen. Danach wurden die Proben für zweimal 15 bis 20 min in Xylol gebracht. Nachdem die Proben eine Stunde in Paraffin I verblieben waren, wurden sie über Nacht in Paraffin II (Schmelzpunkt: 44-46°C) im Brutschrank aufbewahrt.

Am nächsten Tag wurden die Präparate bis zur Ausbettung, jedoch für mindestens drei Stunden in Paraffin III (Schmelzpunkt:54-56°C) verbracht.

Nach dem Aushärten wurden von den Gewebelöcken 5µm dicke Schnitte angefertigt und dann entsprechend ihrer weiteren Verwendung mit HE gefärbt oder histochemisch und immunhistochemisch bearbeitet.

3.2.2. Zubereitung der Proben für die Rasterelektronenmikroskopie

Nachdem die Proben sechs Stunden im Fixans (s.o.) fixiert worden waren, wurden sie von den Korkplättchen geschnitten und dreimal in einem Abstand von je zehn Minuten mit 0,1M Natriumcacodylatpuffer pH 7,2- 7,4 mit einem Zusatz von 7% Saccharose gespült.

In dieser Spülflüssigkeit wurde das Gewebe über Nacht bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag erfolgte eine weitere Spülung mit dem Natriumcacodylat- Saccharose – Puffer.

Danach wurden die Proben für vier Stunden in einer Lösung, die aus gleichen Teilen 2% Osmiumsäure (OsO₄) gelöst in Aqua dest. und 0,2 M Cacodylatpuffer pH 7,2 besteht, nachfixiert. Nach der Osmierung wurde viermal in einem Abstand von jeweils 30 Minuten in dem o. g. Spülpuffer gespült. Dann erfolgte eine Entwässerung der Gewebeproben in einer aufsteigenden Alkoholreihe, wobei diese jeweils für zehn Minuten in 50, 70, 80, 90 und 96%igen Äthanol verbracht wurden. Zum Abschluss kamen die Präparate in unvergällten 100%igen Äthanol. Dieser wurde in einem Abstand von 5- 8 min dreimal gewechselt. Aus dem Alkohol wurden die Proben in Hexamethyldisilazan (HDMS, Roth 3840.2) für 3-5 min vorgetrocknet. Eine weitere Vortrocknung erfolgte dann über Nacht auf Filterpapier unter dem Abzug. Am darauf folgendem Tag wurden die Proben mit Leit C (Neubauer Chemikalien) auf Alu- Probenteller geklebt und, nach Aufbewahrung im Vakuumschrank bis zur endgültigen Trocknung der Präparate, im “Sputtercoater“ S150B (Edwards) für 1,5 bis 4min mit Gold besputtert.

3.3. Färbung der Paraffinschnitte

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden 5-7 µm dicke Paraffinschnitte auf Silane- beschichtete Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 40°C getrocknet.

Die weitere Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

Danach wurden die Präparate in der für Färbung mit wasserlösliche Farbstoffe üblichen Weise entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe eingewässert.

3.3.1. Hämatoxylin- Eosin (HE)- Färbung

Für die morphologischen und einen Teil der morphometrischen Untersuchungen wurden die Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin unter Verwendung von saurem Hämalaun nach MAYER (1920) oder EHRLICH (1886) gefärbt und nach der Entwässerung mit Entellan eingedeckt.

3.4. Histochemie

3.4.1. Nachweis von Schleimsubstanzen mittels Alcianblau (2,5)- Perjod- Schiff- Färbung (AB (2,5)- PAS- Färbung)

Die Alcianblau (2,5)- PAS- Färbung ist eine Spezialfärbung für Schleimsubstanzen und dient allgemein zu deren Differenzierung.

Alcianblau färbt bei einem pH von 2,5 die sauren, d.h. die sulfatierten oder karboxylierten Mucosubstanzen dunkelblau an.

Mit PAS werden zunächst die freien 1,2- glykosidischen Gruppen mit der Perjodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert. Diese reagieren sodann mit Schiff'-Reagenz unter Rotfärbung, d.h. es werden hier die neutralen Mucosubstanzen, die keine Sulfat- oder Karboxylgruppe aufweisen sowie neutrale Glyko- und Mucoproteine nachgewiesen.

Die Färbung der Schnitte erfolgte zunächst mit der Alcianblaulösung, wobei 1% Alcianblau 8GX in 3% Essigsäure gelöst wurde. Die Schnitte wurden für drei Minuten mit 3%iger Essigsäure gespült und danach 30 min in der Färbelösung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger in 3%iger Essigsäure von dem überschüssigen Farbstoff befreit und dann fünf Minuten lang mit Aqua bidest. gespült. Als zweiter Schritt zur Darstellung von Mucosubstanzen folgte die Behandlung mit dem Perjod- Schiff' Reagenz. Hierzu wurden die Alcianblau- gefärbten Schnitte zunächst in 1%iger wässriger Perjodsäure 10min lang bei Raumtemperatur getaucht und anschließend dreimal fünf min lang in Aqua bidest. gespült. Sodann wurden sie im Dunkeln mit Schiff'- Reagenz (Merck 9033) 30 min bei Raumtemperatur bedeckt. Nach der Spülung mit einem SO₂- Spülmedium (aus 1,25g Kaliumdisulfit gelöst in 12,5 ml HCL 1N und 236,25ml Aqua bidest.) wurden die Proben erst 15 min lang unter fließendem Leitungswasser und dann für eine Minute in Aqua bidest. gespült. Anschließend wurden die Schnitte, wie oben beschrieben, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und luftdicht in Entellan eingedeckt.

3.5. Immunhistochemie

3.5.1. Nachweis von proliferierenden Zellen mit dem Antikörper MIB- 1

MIB-1 ist ein gegen das Protein Ki67 gerichteter Antikörper.

Ki67 wird in der S- Phase, der G2- Phase und der frühen M- Phase der Mitose exprimiert.

Der Nachweis mit diesem Antikörper dient der Darstellung proliferierender Zellen.

Für diese Methode wurden, wie bei der HE- bzw. AB (2,5)-PAS- Färbung, 5 µm dicke Schnitte verwendet, die auf Silane ((3-Aminopropyl)-Triethoxysilane, Sigma, A 3648) beschichtete Objektträger aufgezogen waren.

Als erstes wurden die Schnitte bei Raumtemperatur ca. 10 min lang in 0,01 M Citratpuffer mit einem pH von 6,1 gespült. Dann wurden sie in eine Target Retrieval Solution (TRS, DAKO, S1700) verbracht und einer Mikrowellenbehandlung unterzogen, d. h. sie wurden ca. 25 min lang bei 300W erhitzt, wobei zwischendurch zweimal die zimmerwarme TRS nachgefüllt werden musste.

Danach wurden die Proben 20 min lang in TRS auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend zweimal je fünf Minuten in einem Waschpuffer aus 0,05M TRIS+ 0,9% NaCl und einem pH von 7,6 (TBS) gespült.

Die Inkubationen mit Antikörpern fanden immer im Dunkeln statt.

Zur Vorinkubation wurden die Schnitte 30 min bei 37°C in ein Gemisch aus 10% normalem Schweineserum (NSwS, DAKO X 0901) und 10% normalem Kaninchenserum (NRS, DAKO X 0902) gelöst in einem Inkubationspuffer, der ein Gemisch aus 0,05M TRIS + 0,9%NaCl + 0,66mM MgCl₂ + 1% BSA (bovine serum albumine, ROTH 8076.2) + 0,1% Gelatine (MERCK 4078) darstellte, bedeckt. Dieser Puffer wurde mit Zellstoff abgesaugt, bevor die Proben 90 min bei 37°C mit je 25 µl der Antikörper- Lösung beschichtet und in der Feuchtkammer inkubiert wurden.

Die Antikörper- Lösung enthielt MIB-1 (Maus-anti-Ki67; DAKO M 7240), der in einem Verhältnis von 1:20 im Inkubationspuffer + 1% NSwS + 1% NRS gelöst war.

Nach der Inkubation wurden die Proben dreimal je drei Minuten lang in TBS bei Raumtemperatur gespült. In dem nächsten Schritt wurden die Schnitte mit Rabbit-anti-Mouse-Immunglobulin (RaMIg, DAKO Z 0259), einen Antikörper, der in einem Verhältnis von 1:25 in Inkubationspuffer + 1% NSwS + 1% NRS gelöst, vorlag, 30 min lang bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert.

Der Inkubation folgte ein Spülvorgang in TBS, zweimal je drei Minuten bei Raumtemperatur. Bei der dritten und letzten Inkubation wurden die Proben 30 min lang bei 37°C in feuchtem Milieu einer Mäuse- Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)- Lösung beschichtet.

Mäuse- PAP (DAKO B 0650) wurde in einem Verhältnis von 1: 200 in Inkubationspuffer + 1% NSwS + 1% NRS gelöst.

Nach einer jeweils dreiminütigen, dreifachen Spülung der Proben in TBS, wurden diese einem Peroxidase- Nachweis 25 min lang im Dunkeln bei Raumtemperatur unterzogen. Zum Peroxidase- Nachweis diente ein Gemisch aus 16 mg DAB (0,25 mg/ml in 0,05M TBS pH 7,6 + 0,5 µl H₂O₂ 30%/ml TBS) gelöst in 80 ml TBS pH 7,7 + 30 µl H₂O₂.

Nach einer dreiminütigen Spülung in TBS und Aqua bidest. wurden die Proben kurz mit Mayer`s Hämalaun gefärbt. Die Bläuung erfolgte durch eine zehnminütige Spülung unter fließendem Leitungswasser. Anschließend wurde nochmals mit Aqua bidest. gespült.

Nach der oben beschriebenen Entwässerung wurden die Proben mit Entellan unter Deckgläschen eingedeckt.

3.5.2. Nachweis apoptotischer Zellen

3.5.2.1. Nachweis mit Apostain

An einigen Proben wurde der Apoptosenachweis mit dem Mauseantikörper Apostain (Maus-Antikörper F7- 26; ALEXIS Biochemicals 804-192-L001), der sich gegen die single strand DNA (ssDNA) richtet, getestet.

Dazu wurden von den in 4%igem neutral gepufferten Formaldehyd fixierten Proben 5 µm Paraffinschnitte angefertigt, auf SILANE- beschichtete Objektträger aufgezogen und bei 40°C über Nacht aufgetrocknet. Dann erfolgte eine Entparaffinierung und eine Einwässerung in der absteigenden Alkoholreihe sowie eine Spülung mit Aqua bidest. (2 min) und TBS (5 min).

Nach einer 20minütigen Inkubation der Schnitte in Saponin (0,1 mg/ml TBS) bei Raumtemperatur wurden diese dreimal für jeweils zwei Minuten in TBS gespült. Danach erfolgte eine Inkubation (20min bei Raumtemperatur) in Proteinkinase K (20 µg/ml in TBS, Fluka 82456) mit nachfolgender dreifacher Spülung mit Aqua bidest. für je eine Minute.

Anschließend wurden die Schnitte in 50%igem Formamid (Sigma F-7503; v/v in Aqua bidest.) bei 56°C für 20 min inkubiert. Dazu wurde die Standküvette mit der Formamid-Lösung in einem Wasserbad auf 56-60°C vorgeheizt. Die Lösungstemperatur sollte exakt

56°C betragen. Nach Ablauf der 20 min wurden die Schnitte 5 min mit eiskalter TBS gespült, und anschließend erfolgte für die gleiche Zeit eine Behandlung mit 3%igem H₂O₂.

Nach der Spülung mit Aqua bidest. wurde eine Inkubation in 3%iger wässriger Trockenmilchpulver- Lösung (Sigma, M-7409) bei Raumtemperatur für 15 min und noch einmal so lange mit dem Maus- Antikörper F7- 26 durchgeführt.

Die Kontrolle erfolgte mit Maus- Normalserum (MNS, DAKO X0910, 1:40 in Inkubationspuffer + 2% NSwS (Normales Schweineserum (DAKO X 0901))).

Nach dreimaliger, zweiminütiger Spülung mit TBS wurden die Schnitte in Rabbit-anti-Mouse- Immunglobulin (RaMIg, DAKO Z 0259, 1:30 in Inkubationspuffer + 2% NSwS) 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, gespült und ein letztes Mal für 30 min bei Raumtemperatur mit Mouse- Peroxidase-anti-Peroxidase (M-PAP, DAKO B0650, 1:200 in Inkubationspuffer + 2% NSwS) inkubiert.

Nach wiederholter Spülung mit TBS erfolgte der Peroxidase- Nachweis s.o.. Nach Spülungen mit TBS und Aqua bidest. sowie der Entwässerung wurden die Schnitte eingedeckt.

3.5.2. Nachweis nach der TUNEL- Methode

Diese beruht auf einer durch TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) vermittelten, nach GAVRIELI et al. (1992) modifizierten, 3-OH-dUTP-End- Markierung.

Von den in Bouin fixierten Gewebeproben wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt, auf SILANE- beschichtete Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 40°C getrocknet.

Nach der Entparaffinierung mit Xylol und der Einwässerung durch die absteigende Alkoholreihe wurden die Schnitte zweimal mit Aqua bidest. gespült und kamen danach für 5 min in einen 0,01 M Citratpuffer. Anschließend wurden die Schnitte entweder in TRS in der Mikrowelle bei 700W für 3 min behandelt, wobei die reine Kochzeit 30 s betrug oder sie kamen für 5 min bei 4°C in 0,1% Tween 20 (Roche) in TBS. Im ersten Fall kühlten die Schnitte für 15 min in dem heißen Puffer auf Raumtemperatur ab. Anschließend wurden alle Schnitte zweimal in TBS gespült und danach für 20 min bei Raumtemperatur mit Proteinkinase K (Fluka 82456) in der feuchten Kammer inkubiert.

Nach erneuter TBS Spülung kamen die Proben 10 min lang bei Raumtemperatur in die feuchte Kammer und wurden dort mit TdT (Boehringer 220 582, 0,1U/ µl) + Biotin- dUTP (0,02 nM/µl, Boehringer 1093 070) in TdT- Puffer (30mM TRIS + 140mM Na- Cacodylat + 1 mM CoCl₂ + End-pH 7,2) eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Kontrolle erfolgte im TdT- Puffer (s.o.) mit Biotin d-UTP (0,02 nM/µl).

Der Puffer wurde mit TBS abgespült, und die Schnitte kamen für insgesamt 12 min zweimal bei Raumtemperatur in TB- Puffer (NaCl 0,3M + NaCitrat 0,03M, pH 8,0). Nach einer fünfminütigen Spülung mit TBS bei Raumtemperatur wurden die Proben für 20 min in der feuchten Kammer ebenfalls bei Raumtemperatur in 3%igen BSA inkubiert. Danach wurden sie 30 min lang bei Raumtemperatur mit einem Streptavidin- Biotin- Komplex- POD (SABC-Kit, DAKO) inkubiert.

Nach der Spülung mit TBS erfolgte der POD- Nachweis mit DAB (s.o.). Nach Spülung mit TBS und Aqua bidest. erfolgte die Kernfärbung mit Mayer's Hämalaun. Nach Entwässerung in einer Alkoholreihe wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckt.

3.5.3. Nachweis der Caspase-3

Auch diese Untersuchungen wurden an 5 µm dicken Paraffinschnitten des Bouin- fixierten Materials vorgenommen. Nach Trocknung, Entparaffinierung und Einwässerung der Schnitte erfolgte eine Spülung mit dem 0,01 M Citratpuffer pH 6,0. Dann wurden die Schnitte in der Mikrowelle für zweimal je 5 min bei 800 W mit TRS erhitzt, blieben zur Abkühlung 20 min in TRS und wurden anschließend mit TBS gespült.

Es erfolgte eine einstündige Vorinkubation bei Raumtemperatur in Inkubationspuffer (0,05 M TBS pH 7,5 + 0,9% NaCl + 0,66 mM MgCl₂ + 1% BSA (Rinderserumalbumin, Roth 8076.2) + 0,1% Gelatine) + 10% ZNS (Ziegen- Normalserum, DAKO X 0907) + 10% NSwS. Dann wurden die Schnitte bei 4°C über Nacht mit RaHCaspase-3 (Serotec AHP476) inkubiert. Die Kontrolle erfolgte mit R-Ig 1:250 (Kaninchen-Ig, DAKO X09032) über Nacht.

Nach der Spülung mit TBS wurden die Schnitte mit GaR-Ig (Goat-anti-Rabbit-Immunglobulin, DAKO Z0421) für 30 min bei Raumtemperatur überdeckt. Nach wiederholter Spülung mit TBS wurden sie mit Rabbit- PAP (DAKO Z113) überschichtet und dann wieder mit TBS gespült.

Der Peroxidase- Nachweis (DAB 20,0 mg in 100ml PBSI + 25 µl H₂O₂ 30%; End-pH 7,6; Filtration durch Filter SS 593) erfolgte ohne Licht bei Raumtemperatur für 20min.

Nach den Spülungen mit TBS und Aqua bidest. erfolgte eine 30 s bis 1 min dauernde Kernfärbung mit Mayer's Hämalaun.

3.6. Auswertung der Proben

3.6.1. Morphometrische Auswertung

Die Längenmessungen, d. h. das Abfahren der Schleimhautoberfläche bzw. der Lamina muscularis mucosae sowie die Zellzählung, wurde an einem Lichtmikroskop durchgeführt, das über eine Kamera mit einem Computer verbunden ist.

Die Kamera überträgt live den Ausschnitt des unter dem Mikroskop liegenden Schnitts auf einen Monitor.

Mit Hilfe des Analyseprogramms „Lucia 32-G Corona 4.11“ (Nokia) wurde mittels der Mouse ein Stift bewegt, mit dem man die zu messenden Strecken abfahren konnte.

Diese Daten wurden gespeichert und ins Microsoft Excel übertragen.

3.6.1.1. Bestimmung der Zottenlänge

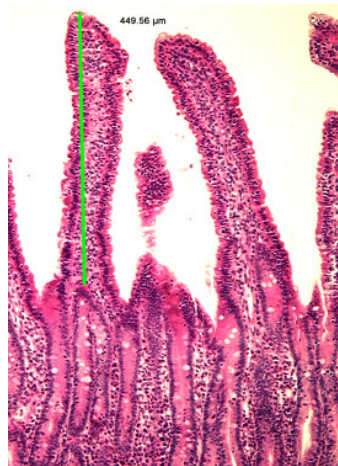


Abb. 2: Bestimmung der Zottenlänge
im Dünndarm (LM, HE, x125)

Die Zottenlänge (Abb. 2) wurde an HE- gefärbten 5-7 µm dicken Paraffinschnitten mit Hilfe eines Lichtmikroskops bei 125facher Vergrößerung und mit dem o. a. Analyseprogramm gemessen.

Zur Auswertung wurden nur vollständig entwickelte, gerade und fingerförmige Zotten herangezogen. Sie wurden von ihrer Basis am Krypteneingang bis zur Spitze gemessen.

Pro Tier und Darmabschnitt wurden je fünf Schnitte ausgewertet, wobei pro Schnitt zehn Zotten gemessen wurden.

3.6.1.2. Bestimmung der Kryptentiefe



Abb. 3: Bestimmung der Kryptentiefe im Dünndarm (LM, HE, x125)

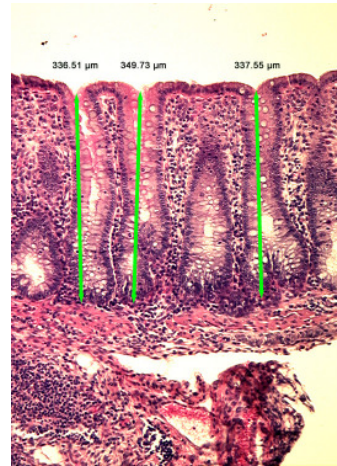


Abb. 4: Bestimmung der Kryptentiefe im Dickdarm (LM, HE, x125)

Auch die Kryptentiefe (Abb. 3 und 4) wurde, wie die Zottenlänge, an 5-7 µm dicken HE-gefärbten Paraffinschnitten bei 125facher Vergrößerung untersucht.

Zur Messung wurden nur Krypten herangezogen, die unverzweigt waren, d.h. die von der Lamina muscularis mucosae bis zur Zottenbasis bzw. im Falle des Dickdarms bis zur Schleimhautoberfläche reichten.

Die Kryptentiefe ergab sich aus der Länge zwischen Zottenbasis/Schleimhautoberfläche und Kryptensohle.

Zur Auswertung kamen 50 Krypten pro Darmabschnitt und Tier.

3.6.1.3. Bestimmung des Vergrößerungsfaktors für die Schleimhautoberfläche durch Zotten- bzw. Kryptenbildung

Da in vielen Schnitten nicht immer ausreichend längs getroffene Zotten bzw. unverzweigte Krypten gefunden wurden, wurde der von Wiese (2003) beschriebene Vergrößerungsfaktor zur weiteren Charakterisierung und Absicherung der Befunde herangezogen.

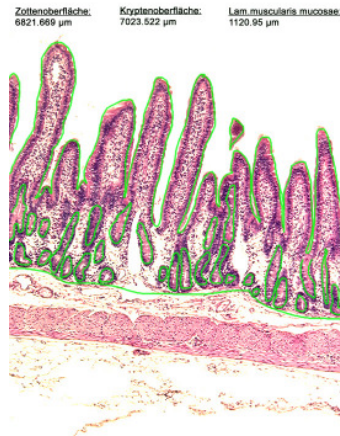


Abb. 5: Bestimmung des Vergrößerungsfaktors für Zotten- bzw. Kryptenoberfläche (LM, HE, x 62,5)

Der Vergrößerungsfaktor (Abb. 5) wurde sowohl für die Zotten- als auch für die Kryptenoberfläche bestimmt.

Der „Faktor für die Darmoberfläche durch Zottenbildung“ ergibt sich aus dem Quotienten der Strecke, die über die Zotten eines Bildausschnittes verläuft, und der Länge der Lamina muscularis mucosae des jeweils untersuchten Bildausschnitts.

Der „Faktor für die Darmoberfläche durch Kryptenbildung“ ist der Quotient aus der Summe der Kryptenumfänge und der Länge der Lamina muscularis mucosae des betreffenden Bildausschnitts.

Beide Messungen wurden bei 62,5facher Vergrößerung durchgeführt. Pro Tier und Darmabschnitt wurden 15 Bildausschnitte vermessen.

In einem Bildausschnitt wurde erst die Länge der Lamina muscularis mucosae, dann die Zottenoberfläche entlang des Bürstensaums und schließlich der Umfang der Krypten entlang der Basallamina gemessen.

Die Werte wurden in eine Excel- Tabelle übertragen, und dort wurde der Vergrößerungsfaktor berechnet.

3.6.1.4. *Qualitative Bestimmung der Becherzellen*

Die Differenzierung der Becherzellen nach ihrem Färbeverhalten wurde an 5-7µm dicken Paraffinschnitten durchgeführt.

Sie fand bei 125facher Vergrößerung statt und stellte eine rein subjektive Bewertung dar. Es wurden saure (blau- violett- gefärbte) und neutrale (purpurrot- gefärbte) Becherzell-Muzine unterschieden.

Es wurden die Becherzellen in den Zotten und in den Krypten ausgewertet.

3.6.1.5. Quantitative Bestimmung der Becherzellen

Die Auszählung der Becherzellen fand an 5 bis 7µm dicken AB (2,5)- PAS- gefärbten Paraffinschnitten bei 125facher Vergrößerung statt.

Es wurde die Anzahl der Becherzellen pro Zottenoberfläche bzw. Kryptenumfang in Dünn- und Dickdarm bestimmt.

Dazu wurde die Oberfläche von 15 möglichst geraden Zotten bzw. unverzweigten Krypten, entsprechend der Vorgehensweise bei der Ermittlung des Vergrößerungsfaktors, umfahren und die darin enthaltenen Becherzellen gezählt. Sodann wurde aus den Einzelwerten der Zottenoberfläche bzw. des Kryptenumfangs die Summe gebildet und mit der Summe der Becherzell-Anzahl ins Verhältnis gesetzt. Anschließend wurde die Anzahl der Becherzellen pro Millimeter Strecke bestimmt.

3.6.2. Quantitative Bestimmung der MIB-1- positiven Zellen

Die Zählung proliferationsaktiver Zellen fand an 5 µm dicken Paraffinschnitten statt.

Die Zählung wurde bei 125facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop in der Weise wie bei der Becherzellzählung vorgenommen.

Da die Proliferation der Enterozyten in den Kryptenbereichen stattfindet, wurde nur deren Umfang umfahren und die darin enthalten positiven, d.h. braun angefärbten Zellkerne, gezählt.

Pro Darmabschnitt und Tier wurden 15 Krypten ausgemessen und die darin enthaltenen MIB-1- positiven Zellen gezählt. Dann wurde jeweils die Summe aller Kryptenumfänge ermittelt und mit der Anzahl der MIB-1-positiven Zellen in Bezug gesetzt. In der gleichen Vorgehensweise wie bei den Becherzellen wurde die Anzahl MIB-1-positiver Zellen pro Millimeter Strecke bestimmt.

3.7. Statistische Auswertung

Die Bestimmung aller Parameter wurde für jedes Schwein sowie jeden Darmabschnitt, soweit morphologisch möglich, durchgeführt.

Pro Tier wurde für jeden Parameter eine bestimmte Anzahl an Werten erhoben.

Aus diesen Einzelwerten wurde dann für jedes Tier ein arithmetisches Mittel pro Parameter gebildet, das der statistischen Auswertung diente.

Um die einzelnen Parameter gruppen- (Fütterungs- und Altersgruppe) sowie darmabschnittsweise vergleichen zu können, wurde, da die Mittelwerte annähernd symmetrisch verteilt waren, eine zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt.

Aufgrund der Wechselwirkungen zwischen Alter und Darmabschnitt wurde zum einen pro Altersgruppe und zum anderen pro Darmabschnitt ausgewertet.

Für die Auswertung pro Altersgruppe wurde ein zweifaktorielles gemischtes hierarisches Modell angewendet (Parameter = Gruppe + Darmabschnitt + Ferkel (Gruppe)). Dabei wurde die Variabel „Ferkel“ als Zufallsfaktor einbezogen. „Gruppe“ und „Darmabschnitt“ sind fixe Faktoren. Bei einem signifikanten Unterschied zwischen den Darmabschnitten, das Signifikanz-Niveau lag bei $p < 0,05$, wurde ein paarweiser Vergleich nach Scheffè durchgeführt.

Für die Auswertung pro Darmabschnitt wurde ein zweifaktorielles Modell mit den Faktoren „Gruppe“, „Alter“ und der Wechselwirkung zwischen Gruppe und Alter gewählt (Parameter = Gruppe + Alter + Gruppe (Alter)).

Bei einem signifikanten Einfluss des Alters ($p < 0,05$) wurden die Altersgruppen paarweise mit Hilfe des Scheffè- Tests verglichen ($p < 0,05$).

Im Falle eines Gruppeneffekts wurden die Gruppen innerhalb der Altersgruppen und der Darmabschnitte mit einem t- Test für unabhängige Stichproben verglichen ($p < 0,05$). Erst dadurch konnte der Unterschied genau definiert werden.

Die Analysen wurden mit Hilfe des Computerprogramms SPSS für Windows 11,5 durchgeführt.