

3. Material und Methoden

3.1. Versuchsaufbau

In drei Fütterungsversuchen wurde im Rahmen des DFG-Forschungsprojektes „Integrative Analyse der Wirkungsmechanismen von Probiotika beim Schwein“ der Einfluss der beiden Probiotika *Enterococcus faecium* und *Bacillus cereus* var. *toyoi* als Futterergänzung unter Berücksichtigung verschiedener Supplementierungsstrategien auf die Enzyme Saure und Alkalische Phosphatase und die Hormone Gastrin, Somatostatin und Serotonin in der Darmschleimhaut von Ferkeln untersucht.

Hierbei sollte also sowohl der Einfluss der unterschiedlichen Probiotika als auch der Einfluss des Probiotikums bezogen auf den Fütterungsbeginn der Sauen und der Ferkel untersucht werden (Tab.8).

	1. Fütterungsversuch Enterococcus faecium	2. Fütterungsversuch Bacillus cereus	3. Fütterungsversuch Enterococcus faecium
Tragende Sauen ab 90 d.a.p.	x	x	
Laktierende Sauen	x	x	
Saugende Ferkel ab 15 d.p.p.	x	x	
Abgesetzte Ferkel ab 29	x	x	X

Tab.8: Übersicht über die in den verschiedenen Versuchen verwendeten Supplementierungsstrategien

Im ersten und zweiten Fütterungsversuch wurden jeweils 40 Ferkel untersucht. Hiervon wurden jeweils 20 Tiere mit Probiotikum gefüttert und jeweils 20 Tiere dienten als Kontrolltiere.

Im dritten Fütterungsversuch wurden insgesamt 20 Tiere untersucht. Das Probiotikum erhielten aber wiederum nur die Hälfte der Tiere. Die anderen zehn Tiere wurden wie in den ersten beiden Versuchen als Kontrolltiere verwendet.

Um einen möglichst genauen Überblick über die zeitliche Abfolge der eventuell festzustellenden Veränderungen zu erhalten, wurden die Versuchstiere in den ersten beiden Versuchen in vier Altersgruppen unterteilt (Tab.9). In jeder Altersgruppe wurden also fünf Versuchstiere und fünf Kontrolltiere untersucht.

Altersgruppe 1	14 Tage post Partum
Altersgruppe 2	28 Tage post Partum
Altersgruppe 3	35 Tage post Partum
Altersgruppe 4	56 Tage post Partum

Tab.9: Übersicht über die untersuchten Altersgruppen

Im dritten Fütterungsversuch beschränkten sich die Untersuchungen auf die Altersgruppen drei und vier, da in diesem die Supplementierung mit dem Probiotikum erst ab dem Tag nach dem Absetzen (29.Tag p.p.) erfolgte (Tab.10).

In diesen beiden Altersgruppen wurden wiederum fünf Versuchstiere und fünf Kontrolltiere untersucht.

	1. Fütterungsversuch	2.Fütterungsversuch	3. Fütterungsversuch
Altersgruppe 1	x	x	
Altersgruppe 2	x	x	
Altersgruppe 3	x	x	x
Altersgruppe 4	x	x	x

Tab.10: Übersicht über die in den jeweiligen Fütterungsversuchen untersuchten Ferkel

Die Untersuchung der enteroendokrinen Zellen beschränkte sich nur auf den ersten Fütterungsversuch. Der photometrische Nachweis der Alkalische Phosphatase und die semiquantitativen Untersuchungen der Sauren Phosphatase der Darmschleimhaut wurden in allen drei Fütterungsversuchen durchgeführt (Tab.11).

	1.Fütterungsversuch	2.Fütterungsversuch	3.Fütterungsversuch
Qualitativer u. photometrischer Nachweis der Alkalischen Phosphatase	x	x	x
Saure Phosphatase (semiquantitativ)	x	x	x
Gastrin	x		
Somatostatin	x		
Serotonin	x		

Tab.11: Umfang der untersuchten Parameter in den verschiedenen Fütterungsversuchen

3.2. Auswahl Versuchstiere

Für alle drei Fütterungsversuche wurden Ferkel aus Würfen von Sauen verwendet, die sich in erster oder maximal zweiter Gestation (Versuch 1: 1,5 vs.1,7 (\pm 0,13 SEM); Versuch 2: 1,9 vs. 2,9 (\pm 0,27 SEM); Versuch 3: 2,6 (\pm 0,68 SEM)) befanden. Die verwendeten Sauen waren Kreuzungen aus den Rassen Deutsche Landrasse und Duroc.

Es wurden nur Ferkel eines Wurfes in eine der Versuchsgruppen aufgenommen, wenn der Wurf 24 Stunden nach Abschluss der Geburt noch mindestens neun lebende, saugende Ferkel aufwies. Im ersten und zweiten Fütterungsversuch wurden die Ferkel zufällig den unterschiedlichen Versuchsgruppen zugeteilt.

Im dritten Fütterungsversuch wurde außerdem bei der Auswahl der einzelnen Ferkel darauf geachtet, dass möglichst annähernd gleichschwere Tiere pro Wurf verglichen wurden.

3.3. Haltung

Für alle drei Fütterungsversuche waren die Haltungsbedingungen für die Sauen und die Ferkel identisch.

Die Einstallung der Sauen erfolgte am Institut für Tierernährung des Fachbereiches Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin.

Die Sauen wurden während der Gestation in Gruppen zu drei bis vier Tieren in Boxen mit Betonboden ohne Einstreu gehalten.

Die Umstallung in die Abferkelbucht erfolgte 10 Tage vor dem Geburtstermin.

Nach 28 Tagen wurden die Ferkel von der Muttersau abgesetzt und in Flat-Decks verbracht, in denen sie dann bis zum Tötungstermin blieben. Die Ferkel der Kontrollgruppe wurden in räumlich streng getrennten Ställen von den Tieren der Probiotika-Gruppe aufgezogen. Klimatisch und hinsichtlich der Raumausstattung waren die Buchten und Ställe der beiden Versuchsgruppen jedoch immer identisch. In beiden Ställen wurden identische Beleuchtungsprogramme mit 16 Stunden Licht gefolgt von 8 Stunden Dunkelheit verwendet. Die Raumtemperatur und relative Luftfeuchtigkeit wurde während des gesamten jeweiligen Versuchsdurchganges bis zum Absetzen der Ferkel konstant auf 21,5 Grad Celsius und 65% gehalten. Die Raumtemperatur in den Flat-Decks betrug direkt nach dem Absetzen ca. 26 Grad Celsius und wurde mit zunehmendem Alter der Ferkel reduziert.

3.4. Fütterung

Bei der Fütterung der Versuchstiere wurden unterschieden:

1. Grundfutter
2. Probiotika als Futterzusatzstoffe

In allen drei Fütterungsversuchen wurde nahezu identisches Grundfutter verwendet (Tab.12).

Inhaltsstoffe g/kg	Tragende Sauen 114.-1.Tag a.p.	Laktierende Sauen 0.-28.Tag p.p.	Säugende Ferkel 15.-28.Tag p.p.	Abgesetzte Ferkel 29.-56.Tag p.p.
Gerste	543	400	-	130
Triticale	-	149,5	-	-
Weizenkleie	306	106,7	-	-
Zuckerrübenmelasse	106	-	-	-
Weizen	-	80	454,7	568,7
Sojabohnenmehl 48% Rohprotein	7,7	160	274	234
Milchpulver	-	-	120	-
Haferflocken	-	-	100	-
Erbsen	-	50	-	-
Calziumcarbonat	10,4	14,7	11	18,4
Pflanzliches Fett	-	17,3	10	13
Rohrzuckermolasse	15	-	-	-
Premix	7,5 ^b	10 ^c	12 ^d	12 ^d
Monocalciumphosphat	2,9	9,3	13	18
Natriumchlorid	-	1,3	-	-
L-Lysin-HCL	1,5	0,8	3	3,4
DL-Methionin	-	0,4	1,6	0,9
L-Threonin	-	-	-	0,9
L-Tryptophan	-	-	0,7	0,7
Analys. Futterzusammensetzung Fütterungsversuch I u. II				
ME, Mj/kg (errechnet)	10,5	13	13,8	13,2
Rohprotein	133,6	168,6	252,5	213,8
Rohfaser	86,3	62,1	44,4	54,1
Rohfett	23,8	28,3	22,6	23,1
Kalzium	6,4	7,6	10,9	11,5
Phosphor	6,7	7	8,1	7,8
L-Lysin (errechnet)	6,1	10	16,3	13
Analys. Futterzusammensetzung Fütterungsversuch III				
ME, Mj/kg (errechnet)	10,5	13	13,8	13,2
Rohprotein	135,6	179,8	259,3	222,9
Rohfaser	75,4	51,1	36,9	47
Rohfett	21,3	32,2	26,1	13,4
Kalzium	6,9	8,5	9,75	11,2
Phosphor	5,8	6,8	7,3	7,3
L-Lysin (errechnet)	6,1	10	16,3	13

Tab.12: Futterinhaltsstoffe der verschiedenen Sauen- und Ferkelfutter (TARAS et al. 2005)

b Enthält pro Kilogramm: 12.000 IU Vit. A, 1.500 IU Vit. D3, 45mg Vit. E, 2,6 mg Vit. K3, 1,5 mg Thiamin, 4,5 mg Riboflavin, 3 mg Vit. B6, 28,5 mg Vit. B12, 18,8 mg Nikotinsäure, 112,5 mg Biotin, 7,5 mg Pantothensäure, 0,9 mg Folsäure, 300 mg Cholinchlorid, 75 mg Zink als ZnSO₄, 150 mg Eisen als FeSO₄, 60 mg Mangan als MnO, 23,3 mg Kupfer als CuSO₄, 0,6 mg Kobalt als CoSO₄, 0,3 mg Selen als NaSeO₃, 1,5 mg Jod als NaI, 1,5 g Natrium als NaCl, 825 mg Kalzium als CaCO₃

c Enthält pro Kilogramm: 16.000 IU Vit. A, 2.000 IU Vit. D3, 60mg Vit. E, 3,5 mg Vit. K3, 2 mg Thiamin, 6 mg Riboflavin, 4 mg Vit. B6, 38 mg Vit. B12, 25 mg Nikotinsäure, 150 mg Biotin, 10 mg Pantothensäure, 1,2 mg Folsäure, 400 mg Cholinchlorid, 100 mg Zink als ZnSO₄, 200 mg Eisen als FeSO₄, 80 mg Mangan als MnO, 31 mg Kupfer als CuSO₄, 0,8 mg Kobalt als CoSO₄, 0,4 mg Selen als NaSeO₃, 2 mg Jod als NaI, 2 g Natrium als NaCl, 1,1 g Kalzium als CaCO₃

d Enthält pro Kilogramm: 4.800 IU Vit. A, 480 IU Vit. D3, 50,4mg Vit.E, 2,4mg Vit. K3, 2,4 mg Thiamin, 3 mg Riboflavin, 4,8 mg Vit. B6, 36 mg Vit. B12, 42 mg Nikotinsäure, 240 mg Biotin, 18 mg Pantothensäure, 1,2 mg Folsäure, 960 mg Cholinchlorid, 60 mg Zink als ZnSO₄, 24 mg Eisen als FeSO₄, 60 mg Mangan als MnO, 14,4 mg Kupfer als CuSO₄, 480 mg Kobalt als CoSO₄, 420 mg Selen als NaSeO₃, 0,6 mg Jod als NaI, 1,5 g Natrium als NaCl, 0,6 g Magnesium

Während das verwendete Grundfutter der Sauen hauptsächlich auf Gerste und Weizen basierte, war die Grundlage des Grundfutters der Ferkel Weizen- und Sojabohnen-Mehl.

Die Saugferkel aller drei Versuchsdurchgänge und die abgesetzten Ferkel aus dem ersten Fütterungsversuch bekamen ihr Futter in Mehlform. Die abgesetzten Ferkel der Fütterungsversuche II und III erhielten ihr Futter in pelletierter Form.

Die Fütterung der Sauen erfolgte zweimal täglich. Die Futtermenge war bei tragenden Sauen abhängig von ihrem Körpergewicht, und bei laktierenden Sauen zusätzlich abhängig von der Anzahl der saugenden Ferkel.

Gesäugte Ferkel hatten ad libitum Zugang zu dem „Pre-Starter“-Grundfutter vom 15. bis zum 28.Tag nach der Geburt. Die Ferkel wurden am 28.Tag von der Sau abgesetzt und erhielten anschließend ab dem 29. Tag ad libitum Zugang zu dem Futter.

Alle Tiere hatten jederzeit freien Zugang zu Trinkwasser.

3.4.1. Supplementierung im Fütterungsversuch I

Im ersten Fütterungsversuch wurde das Probiotikum *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (Cylactin®), auch als „*E. faecium* SF68“ (Wunderlich et al. 1989; Männer and Spieler 1997; Benyacoup et al. 2003) bezeichnet, in unterschiedlichen Konzentration dem verabreichten Basisfutter in der Versuchsgruppe beigemischt (Tab.13). In der Kontrollgruppe erhielten weder die Sauen, noch die Ferkel ein probiotikumhaltiges Futter.

Die Supplementierung des Futters mit dem Probiotikum erfolgte für die tragenden Sauen ab dem 24. Tag nach der Paarung. Die Ferkel erhielten ab dem 15. Tag nach Geburt ein mit dem Probiotikum vermengtes „Pre-Starter“-Futter. Die Zuteilung der Sauen in die Versuchs- oder Kontroll-Gruppe erfolgte zufällig.

3.4.2. Supplementierung im Fütterungsversuch II

Im zweiten Fütterungsversuch wurde der Keim *Bacillus cereus* var. *toyoi* (CNCM I-1012/NCIMB 40112) im Präparat ToyoCerin® (Charge 001562) von Lohmann Animal Health verwendet. Die Supplementierung des Futters mit dem Probiotikum erfolgte für die tragenden Sauen, wie im ersten Fütterungsversuch, ab dem 24. Tag nach der Paarung. Die Ferkel erhielten ab dem 15. Tag nach Geburt ein mit dem Probiotikum vermengtes „Pre-Starter“-Futter (Tab.13).

Die Zuteilung der Sauen in die Versuchs- oder Kontroll-Gruppe erfolgte ebenso zufällig.

3.4.3. Supplementierung im Fütterungsversuch III

Im dritten Fütterungsversuch wurde wieder der Keim *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (Cylactin®) eingesetzt.

Die Supplementierung erfolgte in diesem Versuch allerdings nur für die abgesetzten Ferkel ab dem 29. Tag nach der Geburt. Die Keimzahl pro Gramm Futter betrug $3,2 (\pm 0,4) \times 10^6$ Zellen (TARAS 2007) (Tab.13). Die Sauen erhielten nur die unter 3.4. genannte Grundfuttermischung ohne Zusatz des Probiotikums.

Bei der Zuteilung der einzelnen Ferkel in die Versuchs- oder Kontroll-Gruppe, wurde darauf geachtet, dass kein zu großer Gewichtsunterschied zwischen den zu vergleichenden Ferkeln bestand.

	Fütterungsversuch I Zellen pro g Futter	Fütterungsversuch II Zellen pro g Futter	Fütterungsversuch Zellen pro g Futter
Tragende Sauen	$1,6 (\pm 0,5) \times 10^6$	$2,6 (\pm 0,3) \times 10^5$	
Laktierende Sauen	$1,2 (\pm 0,3) \times 10^6$	$4,0 (\pm 0,6) \times 10^5$	
Gesäugte Ferkel	$1,7 (\pm 0,8) \times 10^5$	$1,3 (\pm 0,4) \times 10^6$	
Abgesetzte Ferkel	$2,0 (\pm 0,4) \times 10^5$	$1,4 (\pm 0,2) \times 10^6$	$3,2 (\pm 0,4) \times 10^6$

Tab.13: Ermittelte beigemengte Keimzahlen in den unterschiedlichen Versuchsstadien (MACHA et al. 2004; TARAS et al. 2005; TARAS 2007)

3.5. Probengewinnung, -aufbereitung und -aufbewahrung

Die Tötung der Ferkel (BMELV Genehmigungs-Nr.: G0037/02) erfolgte im Institut für Tierernährung des Fachbereiches Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin morgens um 8.30 Uhr in einem geschlossenen Raum .

Der Ablauf der Tötung der Tiere und die Probenentnahme waren bei allen Ferkeln als Tierversuch genehmigt und immer identisch.

Die Sedierung wurde mit Ketamin (Ketamin, 10%ig, Heinrich Fromme GmbH) in einer Dosierung von 0,2ml/kg KGW und Azaperon (Stresnil® von Janssen-Cilag) in einer Dosierung von 0,1ml/kg KGW im Verhältnis 2:1 vorgenommen. Die Narkose erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (Eutha 77® von Essex) in einer Dosierung von 0,8ml/kg KGW. Über einen Zugang zu einer Vena jugularis wurde das Tier dann durch die Injektion einer Überdosis von Pentobarbital getötet. Die Eröffnung der Bauchhöhle wurde entlang der Linea alba am rasierten und durch ein steriles OP-Tuch abgedeckten Bauch durchgeführt.

Die Entnahme der Darmproben erfolgte immer nach vorherigem Abklemmen proximal und distal des zu untersuchenden Darmabschnittes (Abb.3). Pro Darmabschnitt wurde ein ca. 10cm langes Teilstück entnommen. Nach dem Freipräparieren vom Gekröse wurden die zu untersuchenden Darmproben mit 60ml lauwarmer Ringer-Lösung durchspült. Unmittelbar nach der Spülung wurden die Darmproben longitudinal eröffnet, in mehrere ca. 1,5cm² große Gewebestücke geschnitten, auf Korkplättchen mit Igelstacheln aufgespannt und in die Fixierungslösung gegeben bzw. in flüssigem Stickstoff bei -196°C eingefroren.

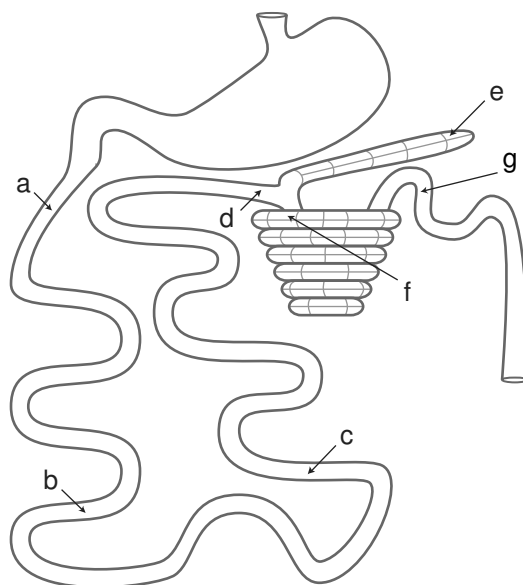


Abb.3: Entnahmestellen der Gewebeproben:

- a: Duodenum descendens, b: proximales Jejunum,
- c: distales Jejunum, d: distales Ileum,
- e: Caecumspitze, f: Colon ascendens,
- g: Colon descendens im Bereich der flexura sigmoidea

3.6. Histochemische und Immunhistochemische Untersuchungen der Paraffin- und Kryostatschnitte

3.6.1. Alkalische Phosphatase

Zur qualitativen Auswertung der Alkalischen Phosphatase wurde mit Hilfe einer nach GOMORI (1952) und BURSTONE (1962) modifizierten Methode verfahren, wobei als Substrat Na β -Glycerophosphat bzw. Naphtol-AS-MX-Phosphat zum Einsatz kam.

3.6.2. Saure Phosphatase

Aus allen Schweinen wurden Darmproben zur Bestimmung der Sauren Phosphatase in den Zellen der Darmschleimhaut entnommen. Es wurden die Darmabschnitte Duodenum, proximales Jejunum, distales Jejunum, Ileum, Caecum, Colon ascendens und Colon descendens untersucht, wobei sich die Untersuchungen im dritten Fütterungsdurchgang auf die Darmabschnitte Duodenum und proximales Jejunum beschränkten. In den ersten beiden Fütterungsversuchen wurden alle oben genannten Darmabschnitte untersucht.

Die Aufbereitung der entnommenen Proben erfolgte im Institut für Anatomie des Fachbereiches Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin.

Der Nachweis der Sauren Phosphatase am histologischen Schnitt erfolgte nach der Methode nach BARKA (1963).

Hierzu wurden die entnommenen Darmproben drei Stunden bei 0 °C in 2% Glutaraldehyd in 0,1M Cacodylatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4 fixiert. Anschließend erfolgte eine Spülung der Proben für fünf Tage in Holt'schem Gemisch bei 4 °C. Die Proben wurden hierauf mit Tissue Tec umhüllt und in flüssigem Stickstoff bei -196 °C eingefroren. Die Herstellung der histologischen Schnitte erfolgte an einem Kryostat-Mikrotom (Fa. Microm). Die auf SILANE-beschichtete Objektträger aufgezogenen 5µm-Schnitte wurden für bis zu 3,5 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt bevor sie bis zur weiteren Inkubation bei 4 °C meist über Nacht gelagert wurden.

Die Schnitte wurden in das Inkubationsmedium (Tab.14) eingestellt, nachdem dieses zuvor durch einen harten Filter (Mod.S85593 Schleicher und Schüll) filtriert worden war. Die Inkubation erfolgte für 45 Minuten bei 37 °C. Zuvor waren die Präparate gründlich mit Aqua bidest. gespült worden. Anschließend wurden diese über Nacht in 0,9% NaCl bei 4 °C bis zur Kernfärbung gelagert.

Die Kernfärbung erfolgte für 1,5 Minuten in Mayers Hämalaun mit anschließender Bläuung in fließendem Leitungswasser für 10 Minuten. Dann wurden die Präparate mit Aqua bidest. gespült und die Deckgläser mit Glyceringelantine eingedeckt.

Bei der diesen Nachweis begleitenden Kontrolle wurde die Aktivität der Sauren Phosphatase durch Zusatz von 50mM NaF [0,105g/50ml] zum Inkubationsmedium für eine Zeit von 45 Minuten bei 37 °C gehemmt.

Das Nachweisverfahren und die Kontrollen wurden an Präparaten durchgeführt, die in Serie geschnitten worden waren.

Naphtol-AS-MX-Phosphat	mg	45	(1,1mM)
Dimethylformamid	ml	5	(0,65mM)
Veronal-Acetat-Stammlösung	ml	25	(36mM)
Aqua bidest.	ml	87	
HPR	ml	8	5mM
End-pH 5,0	ml	100	

Tab.14: Inkubationsmedium für den Nachweis der Sauren Phosphatase nach BARKA (1963)

3.6.3. Inkubation der Paraffinschnitte zur Darstellung der Hormone in den endokrinen Zellen

Die Fixierung der entnommenen Darmproben erfolgte in, mit Kupferacetat statt Essigsäure, modifizierter Bouinscher Lösung (siehe 10.4. Anhang).

Die Entwässerung und Paraffineinbettung wurde wie folgt vorgenommen:

Entwässerung bei Raumtemperatur

70% Ethanol	5 Chargen je 1 Std., anschl. in 80% Ethanol oder Aufbewahrung in 70% Ethanol über Nacht
80% Ethanol	5 Chargen je 1 Std., anschl. Aufbewahrung in 80% Ethanol über Nacht
90% Ethanol	1 Std.
96% Ethanol	2x1 Std.
100% Ethanol	3x 1 Std.
Ethanol / Xylol 1:1	40 min.
Xylol	2x 20 min.

Infiltration im Brutschrank bei 58°C

Xylol/Paraffin 1:1	über Nacht
Paraffin I	2h
Paraffin II, III	je mind. 1 Std.

Ausbettung

in Paraffin mit 5% Bienenwachs

Zur lichtmikroskopischen Darstellung der Hormone wurden von den Darmproben 3-5 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt und auf Silane-beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Trocknung erfolgte über Nacht bei 40°C.

Für die Nachweisreaktionen der endokrinen Zellen wurde die so genannte PAP-Methode nach STERNBERGER (1986) angewandt.

Bei den Untersuchungen der endokrinen Zellen wurde für jede Probe und jeden Hormonnachweis eine Kontrollreaktion mittels dem normalen Rabbit-Ig (DAKO X0903) durchgeführt.

3.6.3.1. Gastrin-Nachweis an Paraffinschnitten

Die Gastrin-produzierenden Zellen wurden mittels eines gegen Gastrin (Typus humanus) gerichteten polyklonalen Antikörpers (RahGastrin, DAKO A.568) dargestellt.

Es wurden 3 µm dicke Paraffinschnitte verwendet. Die Inkubation der Proben auf den Objektträgern mit dem Antikörper wurde wie folgt durchgeführt (siehe: 10.4. Anhang; für Zusammensetzung der Puffer sowie Verdünnung der Antikörper):

- Spülung der Proben im Waschpuffer (TBS) für 5min. bei Raumtemperatur
- Vorinkubation in 10%igem Ziegen-Normalserum (ZNS) und 10%igem Schweine-Normalserum (NSwS) für zwei Stunden im Inkubationspuffer bei 4°C
- Inkubation mit RahGastrin über Nacht bei 4°C
- dreimalige Spülung in TBS für 3 min. bei Raumtemperatur
- Inkubation mit GaR-Ig DAKO Z 0421 für 30 min. im Dunkeln bei Raumtemperatur
- dreimalige Spülung in TBS für 3 min. bei Raumtemperatur
- Inkubation in Rabbit-PAP DAKO Z 113 für 30 min. im Dunkeln bei Raumtemperatur
- dreimalige Spülung in TBS für 3 min. bei Raumtemperatur
- POD-Nachweis für 20 min. im Dunkeln bei Raumtemperatur
- Spülung für je 5 min. in TBS und Aqua bidest. bei Raumtemperatur
- Färbung mit Mayers Hämalaun für 30 min. bei Raumtemperatur
- Bläuing unter fließendem Leitungswasser für 10 min.
- Entwässerung, Ausbettung in Paraffin

3.6.3.2. Somatostatin-Nachweis an Paraffinschnitten

Die Inkubation erfolgte durch einen mit synthetischem Somatostatin im Kaninchen erzeugten polyklonalen Antikörper (RaSomatostatin, Amersham RPN.1612 /synthetisch Som 14).

Es wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte verwendet. Die Inkubation der Proben auf den Objektträgern mit den Antikörpern wurde wie folgt durchgeführt:

- Inkubation mit Methanol für 10 min. bei Raumtemperatur
- zweimalige Spülung für 2 min. in Aqua bidest.
- Spülung für 5 min. in Citratpuffer
- Mikrowellenbehandlung (Fa. Samsung) für 5 min. bei 800 Watt im Citratpuffer
- Abkühlung für 15 min. bei Raumtemperatur im verwendeten Citratpuffer
- dreimalige Spülung in TBS für 3min. bei Raumtemperatur
- Vorinkubation in 10%iger ZNS und 10%iger NSwS für 20 min. im Inkubationspuffer bei Raumtemperatur
- Inkubation mit RaSomatostatin für eine Stunde bei 37°C

Die darauf folgenden Spülungen und Inkubation mit GaR-Ig erfolgten wie zuvor beim Gastrin-Nachweis.

3.6.3.3. Serotonin-Nachweis an Paraffinschnitten

Der Nachweis von Serotonin wurde mit dem polyklonalen Antikörper RahSerotonin (BioPrime SE-100) geführt.

Es wurden 3 µm dicke Paraffinschnitte verwendet. Die Inkubation der Proben auf den Objektträgern mit den Antikörpern wurde unter prinzipiell gleichen Bedingungen wie bei dem Somatostatin-Nachweis durchgeführt. Die Inkubation mit RaSerotonin erfolgte nach Vorinkubation für eine Stunde bei 37° C.

3.7. Photometrische Bestimmung der intestinalen Alkalischen Phosphatase

Der quantitative Nachweis der Intestinalen Alkalischen Phosphatase wurde in allen drei Fütterungsversuchen an den Darmabschnitten Duodenum und proximalem Jejunum durchgeführt.

Das Versuchsprinzip basiert auf der Fähigkeit der Alkalischen Phosphatase, das als Substrat verwendete, farblose p-Nitrophenylphosphat enzymatisch zu Nitrophenol abzubauen. Die Bestimmung der Konzentration des Nitrophenols ist dann durch eine photometrische Messung möglich. Für den Nachweis wurde ein modifiziertes Diagnostik-Kit der Firma Sigma® (Phosphatases, Alkaline, Acid, Prostatic Acid; Procedure No. 104) benutzt.

Die Versuchsdurchführung war bei allen drei Fütterungsversuchen identisch.

3.7.1. Kalibrierung

Um die später bei den Untersuchungen ermittelten Absorbtionswerte der richtigen Enzymkonzentration zuordnen zu können, wurde eine Kalibrierungskurve erstellt.

Die Kalibrierung des Photometers wurde durch die Messung von sechs Proben (Tab.15) gegen 0.02M Natronlauge als Referenz bei 410nm durchgeführt. Die verdünnte p-Nitrophenol-Lösung wurde aus 0.5ml p-Nitrophenol (Sigma p-Nitrophenol Standard Solution Catalog No.104-4; p-Nitrophenol, 10µmol/ml) und 99,5ml 0.02M Natronlauge hergestellt.

Probe Nr.	Verdünnte p-Nitrophenol-Lösung (ml)	0.02M NaOH (ml)	Phosphatase-Aktivität in IU/ml
1	1	10	1
2	2	9	2
3	4	7	4
4	6	5	6
5	8	3	8
6	10	1	10

Tab.15: Übersicht über die verwendeten Inhaltsstoffe der Kalibrierproben

3.7.2. Verwendetes Probenmaterial

Für den ersten und zweiten Fütterungsversuch wurde pro Darmabschnitt jeweils eine Probe herangezogen. Es wurden rechteckig ausgeschnittene Proben mit einer Fläche von ungefähr 1,5 cm² verwendet.

Im dritten Durchgang wurden jeweils zwei Proben pro Tier und Darmabschnitt untersucht.

Die Darmschleimhaut wurde direkt nach der Entnahme auf einem Korkunterlage ausgebreitet, und es wurden mit einer runden Lochstanze mit einem Durchmesser von genau 12mm jeweils zwei Proben pro Darmabschnitt aus dem Darmgewebe ausgestanzt und bis zur photometrischen Bestimmung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.7.3. Versuchsdurchführung

Unmittelbar nach der Entnahme der Proben aus dem flüssigen Stickstoff wurde das Gewicht bestimmt, und die Probe sofort in einem sterilen 15ml Röhrchen auf Eis gelagert. Alle weiteren Schritte bis zur Inkubation fanden unter durchgehender Kühlung bei 4 °C statt.

Die Gewebeproben wurden in 1ml eiskaltem Wasser 60 sec. mit einem Ultraturax homogenisiert. Dem Homogenat wurde sofort anschließend 4ml kaltes Wasser zugegeben und 5 min. bei 500xg bei 4 °C zentrifugiert. Dann wurden 4ml des Überstandes ohne die obere Fettphase in ein separates steriles 15ml Röhrchen gegeben.

Das Zentrifugat wurde nochmals 30sec. mit dem Ultraturax homogenisiert und anschließend wiederum 5 min. bei 500xg bei 4 °C zentrifugiert. Es wurden noch mal 800µl Überstand in die bereits entnommenen 4ml pipettiert. Von diesen 4,8ml Überstand wurden 1ml in ein steriles 1,5ml Eppendorfröhrchen gegeben und 10 min. bei 13000 UpM bei 4 °C zentrifugiert.

Die Inkubation fand in einem 1,5ml Eppendorfröhrchen bei 37 °C statt. Hierzu wurden 50 µl des Überstandes in eine zuvor für 5min. bei 37 °C äquilibrierte Lösung aus 250µl Substratlösung und 250 µl Alkaline Substrat Buffer (Sigma® Catalog No.221) entspricht: 2-Amino-2-methyl-1-propanol, 1.5 mol/l, pH 10.3 bei 25 °C statt.

Die Inkubationszeit betrug für die Proben aus dem Duodenum 15 min. und für die Proben aus dem proximalen Jejunum durchgehend 5 min. Nach der genannten Zeit wurde die Reaktion mit 1000µl 0,25 M Natronlauge gestoppt.

Im Photometer wurden 800µl dieser Lösung bei 410nm gegen einen Leerwert gemessen und anschließend mit 200µl von 1Molarer Salzsäure aufgefüllt. Hiermit wurde die unerwünscht gemessene Standard-Absorption des p-Nitrophenol entfernt. Weitere 800µl wurden entnommen und noch einmal bei 410nm im Photometer gegen einen Leerwert gemessen.

3.7.4. Berechnung der Konzentration der alkalischen Phosphatase

Die Berechnung der Phosphatase-Aktivität erfolgte pro 100mg Feuchtmasse.

Die ermittelten Absorbtionswerte konnten mit Hilfe der Kalibrierungskurve als Phosphatase-Aktivität in IU/ml abgelesen werden.

Nach Subtraktion des nach Zugabe der Salzsäure ermittelten Wertes von dem als erstes ermittelten Wertes erhielt man den reinen Wert der Alkalischen Phosphatase-Aktivität der Enterozyten. Abschließend wurde die verwendete Verdünnung heraus gerechnet.

3.8. Semiquantitative Bestimmung der Sauren Phosphatase anhand histologischer Schnitte

Die Anzahl der Zellen die die Hydrolase Saure Phosphatase in der Dünndarmschleimhaut produzieren sowie die Intensität der Reaktion dieser Enzyme in den Zellen wurden in allen drei Fütterungsversuchen untersucht.

Während in den ersten beiden Versuchsdurchgängen alle entnommenen Darmabschnittsproben untersucht wurden, beschränkten sich die Untersuchungen im dritten Versuchsdurchgang allerdings wieder nur auf die Darmabschnitte Duodenum und proximales Jejunum. Zur Auswertung gelangten die nach der Methode nach BARKA (1963) gefärbten histologischen Schnitte (Abb.4).

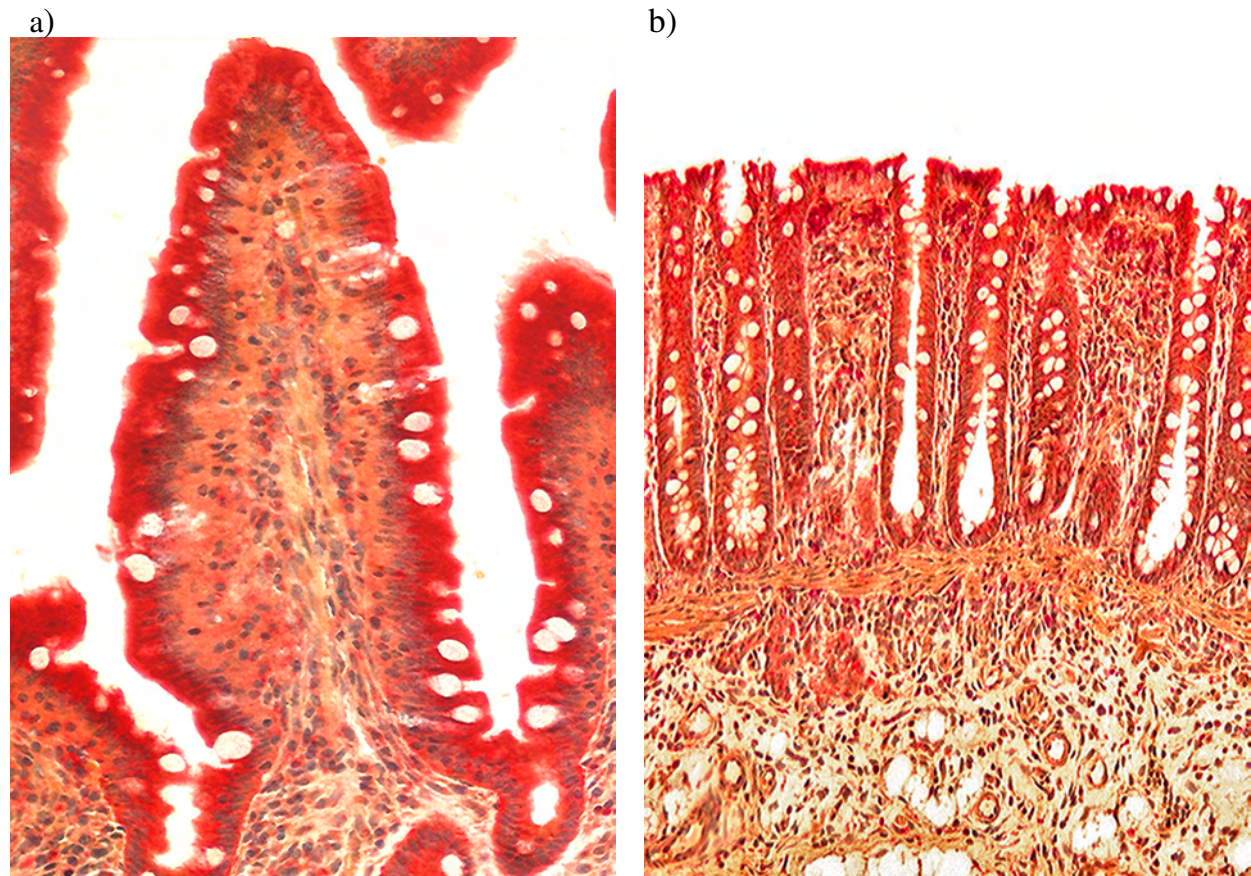


Abb.4: Histologische Schnitte von a: distalem Jejunum und b: Colon descendens; Färbung nach BARKA (1963)

Es wurden folgenden Bewertungspunkte der Sauren Phosphatase am histologischen Schnitt untersucht (Abb.5):

- 1) Supranukleäre Aktivität der Enterozyten der Schleimhautoberfläche
- 2) Supranukleäre Aktivität in den Kryptenzellen des Kryptenepithels
- 3) Aktivität der SP basal an den Kryptenepithelzellen
- 4) Anzahl der SP-positiven Zellen in der Propria mucosae des Zottenbereichs
- 5) Grad der Aktivität der SP-positiven Zellen in der Propria mucosae des Zottenbereichs
- 6) Anzahl der SP-positiven Zellen in der Propria mucosae des Kryptenbereichs
- 7) Grad der Aktivität der SP-positiven Zellen in der Propria mucosae des Kryptenbereichs

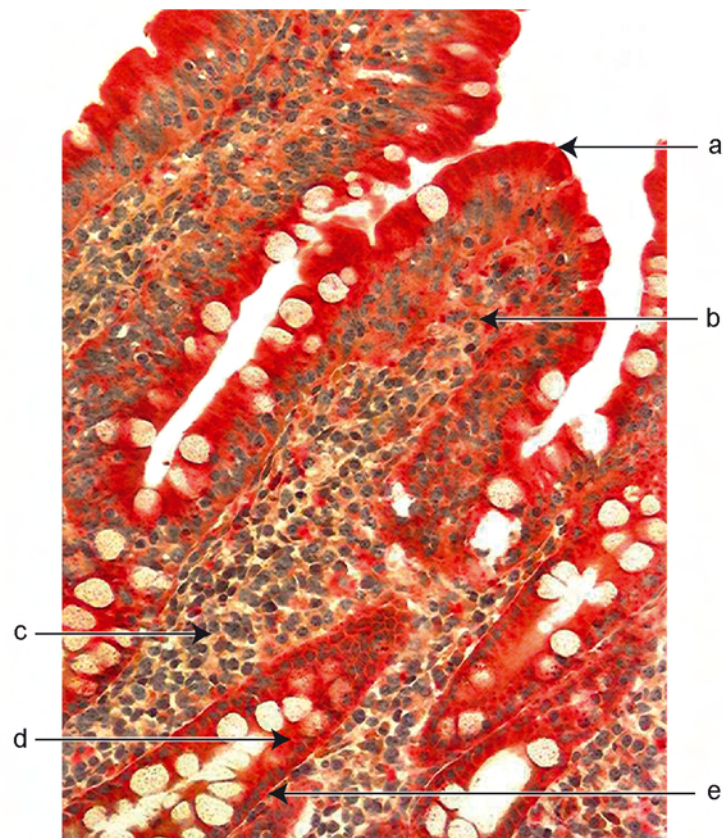


Abb.5: Darstellung der unterschiedlichen Bewertungskriterien:

- a: Supranukleäre Aktivität der Enterozyten der Schleimhautoberfläche,
 b: Anzahl und Grad der Aktivität der SP-positiven Zellen in der Propria mucosae des Zottenbereichs, c: Anzahl und Grad der Aktivität der SP-positiven Zellen in der Propria mucosae des Kryptenbereichs,
 d: Supranukleäre Aktivität in den Kryptenzellen des Kryptenepithels,
 e: Aktivität der SP basal an den Kryptenepithelzellen

Die Einteilung der Aktivität SP-positiver Zellen, sowie deren Anzahl in den verschiedenen Lokalisationen der Schleimhaut erfolgte anhand einer Skala von null bis vier, die auch eine Abstufung zwischen zwei Werten zuließ.

Die Auswertung wurde ohne Kenntnis vom Fütterungsstatus des getöteten Tieres durchgeführt.

3.9. Untersuchung der endokrinen Zellen

Es wurden nur im ersten Fütterungsversuch die Auswirkungen der probiotischen Supplementierung des Futters auf die Entwicklung der endokrinen Zellen in der Darmschleimhaut untersucht. Die Untersuchungen fanden an den, wie unter 3.6. genannt, gefärbten histologischen Schnitten statt.

Die Betrachtung der Schnitte fand mit einem Mikroskop (Zeiss, Germany, Typ Axioskop) statt. Mithilfe einer Kamera (Sony 3 CCD, Modell DXC 930 P) wurden die Bilder digitalisiert und auf einen Monitor übertragen. Die Messungen wurden dann mit dem Morphometrieprogramm Lucia 32-G, Corona Version 4.11 der Firma Nikon, Deutschland durchgeführt.

Es wurden die Gastrin-, Somatostatin- und Serotonin-produzierenden Zellen untersucht. In Tab.15 sind alle untersuchten Darmabschnitte und dazugehörigen Hormone dargestellt.

	Gastrin	Somatostatin	Serotonin
Duodenum	x	x	x
prox. Jejunum	x	x	x
dist. Jejunum	x	x	x
Ileum	x	x	
Caecum		x	
Colon asc.		x	
Colon desc.	x	x	

Tab.16: Darstellung der untersuchten Darmabschnitte und die darin untersuchten Hormone sowie die Darstellung der Methode

Gemessen wurde die Anzahl an Hormon-positiven Zellen pro Flächeneinheit, wobei die gemessene Fläche basal durch die Lamina muscularis mucosae und luminal durch das Epithel auf den Zotten begrenzt wurde (Abb.6). Die seitlichen Begrenzungen wurden durch die Bildauschnitte vorgegeben.

Es wurden pro untersuchtem Hormon und Darmabschnitt bei jeder Probe jeweils 20 Sichtfelder bei gleich bleibender Vergrößerung betrachtet.

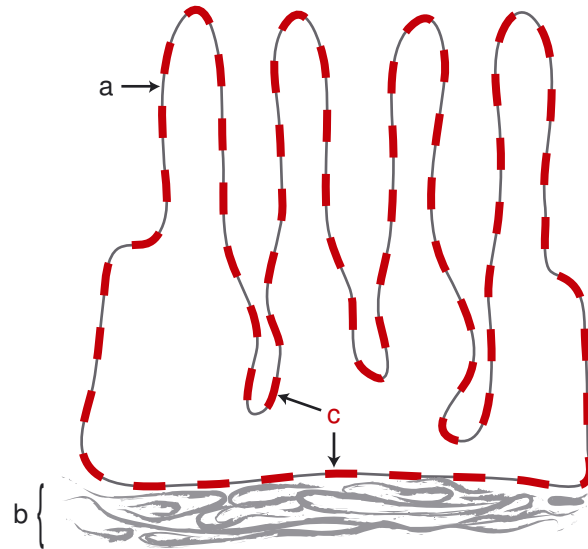


Abb.6: Schematische Darstellung der Flächen-Messmethode;
a: Zottenepithel, b: Lamina muscularis mucosae,
c: gemessene Fläche