

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsaufbau, Tiermaterial, Haltung und Fütterung

In zwei Versuchsdurchgängen wurde der Einfluß der Digestaviskosität auf Morphologie und Histologie des Dünndarms von Schweinen untersucht. Dazu wurde jeweils eine Kontroll- und eine Versuchsgruppe bestehend aus je sechs Schweinen gebildet. Im ersten Versuchsdurchgang wurde eine semisynthetische Ration verfüttert, die auf Maisstärke und Sojaprotein-Isolat basierte (Diät C). Zur Erhöhung der Digestaviskosität wurden 2% der kristallinen Zellulose gegen das hochvisköse Modellsubstrat Karboximethylzellulose (Diät CMC) substituiert. Im zweiten Versuchsdurchgang wurde eine Diät verfüttert, die hauptsächlich aus Roggen und Weizen bestand und damit natürliche viskositätserhöhende Faktoren enthielt (Diät K). Die Viskosität der Digesta der Versuchsgruppe (Diät E) wurde durch Zusatz eines Xylanase-haltigen Enzympräparates gesenkt (Zy 68; 480 IE/kg Futter). Tabelle 1 zeigt die Zusammensetzungen der verschiedenen Diäten; in Tabelle 2 sind die Nährstoffgehalte sowie die jeweiligen Extraktviskositäten angegeben.

Tabelle 1: Zusammensetzung der semisynthetischen Diäten C und CMC sowie der auf Getreide basierenden Diäten K und E.

Komponenten [g/kg uS]	Diät C	Diät CMC	Diät K	Diät E
Maisstärke	680	680	-	-
Roggen	-	-	658	658
Weizen	-	-	200	200
Sojaprotein-Isolat	134	134	73	73
Zellulose, kristalline¹	50	30	-	-
Karboximethylzellulose²	-	20	-	-
Glukose	50	50	-	-
Sojaöl	20	20	20	20
Monokalziumphosphat	30	30	19	19
Futterkalk, kohlenaurer	10	10	13	13
Prämix³	15	15	12	12
Kaliumhydrogenkarbonat	7.5	7.5	-	-
Magnesiumoxid	1	1	-	-
Lysin	0.4	0.4	2.6	2.6
Methionin	1.4	1.4	1.1	1.1
Threonin	0.8	0.8	1.1	1.1
Tryptophan	-	-	0.2	0.2
Zy 68⁴	-	-	-	0.4

1 Viva Pur ® Typ 200; Rettmaier & Söhne Faserstoff-Werke, Ellwangen-Holzmühlen

2 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

3 Lohmann Animal Health & Co.KG, Cuxhaven; Gehalt pro kg: 1.2 mio IU Vit A; 120.000 IU Vit D3; 4 g Vit E; 200 mg Vit B1; 600 mg Vit B2; 2500 mg Niacin; 400 mg Vit B6; 4.5 mg Vit B12; 20 mg Biotin; 1800 mg Pantothenensäure; 160 g Natrium; 50 g Magnesium; 10 g Zink; 7.5 g Eisen; 7.5 g Mangan; 150 mg Jod; 70 mg Kobalt; 40 mg Selen

4 Lohmann Animal Health & Co.KG, Cuxhaven; Zy 68 enthält 1192 IU Xylanase-Aktivität pro g

Tabelle 2: Analysierte und berechnete Nährstoffgehalte der semisynthetischen Diäten C und CMC sowie der auf Getreide basierenden Diäten K und E.

Komponenten [g/kg uS]	Diät C	Diät CMC	Diät K	Diät E
Trockensubstanz	900.7	896.6	901.9	898.9
Rohprotein	115.0	116.2	131.9	131.9
Rohfett	19.9	25.3	32.9	31.4
Asche	44.6	32.8	51.3	49.7
Rohfaser	(50) ⁴	(30) ⁴	17.0	17.3
NfE	671.2	692.3	668.6	668.6
NDF	*	*	145.9	134.6
ADF	*	*	27.4	28.0
Total NSP¹ (löslich)	*	*	103.4 (24.8)	102.6 (30.5)
Arabinose (löslich)	*	*	19.4 (4.7)	19.1 (4.9)
Xylose (löslich)	*	*	50.2 (11.8)	49.4 (13.0)
Mannose (löslich)	*	*	4.0 (1.5)	2.7 (0.8)
Glukose (löslich)	*	*	26.0 (5.7)	27.8 (9.8)
Galaktose (löslich)	*	*	3.8 (1.1)	3.6 (2.0)
Umsetzbare Energie [MJ/kg uS]²	13.4	13.4	13.4	13.4
Scheinbar präzäkal verdauliches Rohprotein³	100.4	100.4	108.1	108.1
Extraktviskosität [mPas]	0.9	333.1	20.6	18.5

¹ bestimmt wie beschrieben in Bartelt et al. (2002)

² berechnet nach den Energiegehalten der einzelnen Komponenten (DLG, 1991)

³ berechnet nach Gehalts- und Verdaulichkeitsangaben für Rohprotein in Roggen, Weizen und Sojaprotein-Isolat in CVB (1996) und Grala et al. (1998)

⁴ entspricht dem Gehalt der Diät an kristalliner Zellulose

* nicht bestimmt

Die 24 Versuchstiere waren Schweine aus dem Schaumann-Programm. In diesem Zuchtprogramm werden Kreuzungsprodukte der Rassen Deutsche Landrasse und Duroc als Mutterlinie und Kreuzungsprodukte der Rassen Landrasse B und Hampshire als Vaterlinie verwendet. Alle Ferkel erhielten im Alter von drei Tagen eine Eisen-Dextran-Injektion; die männlichen Tiere wurden am 15. Lebenstag kastriert. Aus jeweils zwei zeitgleichen Würfen wurden je sechs Ferkel zufällig und ohne Beachtung des Geschlechts ausgewählt und am 28. Lebenstag abgesetzt. Die sechs Wurfgeschwister wurden gleichmäßig auf Kontroll- und Versuchsgruppe aufgeteilt (C oder CMC beziehungsweise K oder E). Die Fütterungsperiode dauerte in beiden Versuchsdurchgängen drei Wochen.

Die Schweine wurden in Einzelboxen mit einer Grundfläche von 1.20 x 1.60 m mit Vollspaltenboden untergebracht. Zwischen benachbarten Boxen bestand Sichtkontakt. Schweine verschiedener Gruppen hatten keine unmittelbaren Kontaktmöglichkeiten.

Täglich um 8.00 und um 16.00 Uhr erfolgte die Fütterung, wobei das mehlartige Futter mit der dreifachen Menge Wasser verrührt wurde. Die Rationsmenge wurde der ad-libitum-Futteraufnahme angepaßt, sodass sie am ersten Tag 100 g, am letzten Versuchstag durchschnittlich 1100 g betrug.

Vor der Nachmittagsfütterung wurden die Boxen jeden Tag mit Wasser gereinigt. In dieser Zeit wurden je drei Boxen einer Futtergruppe miteinander verbunden. Das Allgemeinbefinden der Schweine wurde täglich kontrolliert.

Während der drei Wochen des Versuchs stand den Schweinen diverser Spielzeug wie Bälle, abgerundete Metallstangen oder Plastikscheiben zur Verfügung.

Die Tiere wurden sowohl zu Versuchsbeginn, am 28. Lebenstag, als auch einen Tag vor Versuchsende gewogen.

3.2 Probenentnahme

Am Tag der Probengewinnung erfolgte die Fütterung um 6.00 Uhr. Eine Stunde vor der Tötung (um 10.00 Uhr) wurde der Proliferationsmarker Bromodesoxyuridin (BrdU) in einer Konzentration von 15 mg/kg intraperitoneal injiziert. Unmittelbar nach der Tötung durch intrakardiale Injektion von T61 wurde die Bauchhöhle in der Linea alba eröffnet. Folgende, je etwa 2 cm lange Darmstücke wurden für die Lichtmikroskopie entnommen:

1. proximales Duodenum, 7 cm distal des Pylorus
2. proximales Jejunum
3. mittleres Jejunum; im ersten Versuchsdurchgang etwa Mitte Jejunum; im zweiten Versuchsdurchgang etwa 60 cm proximal des Ileumanfangs
4. proximales Ileum
5. distales Ileum, unmittelbar proximal des Ostium ileale

An den Stellen 1, 2, 4 und 5 wurden darüber hinaus etwa 1 cm lange Darmproben für die Transmissionselektronenmikroskopie, an den Stellen 1, 3 und 5 etwa 1.5 x 1.5 cm große Proben für die Rasterelektronenmikroskopie gewonnen.

Die Entnahme dieser Gewebeproben dauerte nicht länger als 10 Minuten. Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Darmproben longitudinal eröffnet, in eiskalter Ringerlösung gespült und wie unten beschrieben fixiert.

Aus den den Entnahmestellen benachbarten (Jejunum) beziehungsweise von ihnen begrenzten (Duodenum und Ileum) Darmabschnitten wurden Digestaproben zur Bestimmung der Viskosität entnommen. Anschließend wurde das gesamte Darmkonvolut (Pylorus bis Anus) aus dem Tierkörper entnommen. Das Gekröse wurde am Darmansatz abgetrennt, der gesamte Darm entleert,

danach longitudinal geöffnet und schließlich dreimal in handwarmer physiologischer Natriumchlorid-Lösung gespült. Die Darmteile wurden zur Längenmessung auf Papierhandtüchern ausgebreitet und zum Trocknen etwa fünf Minuten dort belassen. Anschließend wurden die einzelnen Abschnitte gewogen. Alle Einzelschritte wurden jeweils von der selben Person durchgeführt. Während der ganzen Prozedur wurde auf Besonderheiten und makroskopisch erkennbare, pathologische Prozesse geachtet.

Aus den erhobenen Parametern Gewicht und Länge der einzelnen Darmabschnitte wurden zu einem späteren Zeitpunkt das Gewicht und die Länge der einzelnen Darmabschnitte im Verhältnis zum Körpergewicht errechnet. Ferner wurde der Quotient aus Länge und Gewicht als Maß für die Wanddicke von Dünn- und Dickdarm erfaßt.

3.3 Messung der Digestaviskosität

Die entnommene Digesta wurde unmittelbar nach ihrer Gewinnung in Eis gekühlt, bis die Proben bei 13000 U/min (Relative Zentrifugalbeschleunigung 13600 g) für 10 Minuten zentrifugiert wurden (Zentrifuge Typ 5415 C der Firma Eppendorf, Deutschland). Von 0.5 ml des Überstandes wurde mit Hilfe eines Viskosimeters (Typ LVDV II; Meßkopf Typ Cone spindle CP-40; temperiert auf 40.0°C, Firma Brookfield, USA) die Viskosität bestimmt. Wenn genügend Probenmaterial zur Verfügung stand, wurden Doppelmessungen durchgeführt. Bei fünf Tieren war zum Zeitpunkt der Probenentnahme im Ileum keine Digesta vorhanden.

3.4 Probenbearbeitung

3.4.1 Lichtmikroskopische Proben

Für die Fixierung (20 Stunden bei Raumtemperatur) in modifizierter Bouinscher Lösung (4% Pikrinsäure + 2.5% Kupferacetat + 3.5% Formol) wurden die Gewebeproben mit Igelstacheln auf Korkplättchen aufgespannt. Danach wurde mit 70%igem Ethanol über 24 Stunden mehrmals gespült. Die weitere Entwässerung der Präparate erfolgte über insgesamt 48 Stunden mittels einer ansteigenden Alkoholreihe (4 mal 2 Stunden 80%, 30 Minuten 90%, 2 mal 30 Minuten 96%, 4 mal 1 Stunde 100%igem Ethanol; Klärung mit Xylol I, II und III jeweils 20 Minuten; jeweils bei Raumtemperatur). Nach Bädern in weichem Paraffin mit einem Schmelzpunkt von 46°C wurden die Proben in 60°C warmes, hartes Paraffin (Schmelzpunkt 57°C) ausgebettet.

3.4.2 Transelektronenmikroskopische Proben

Die auf eine Größe von etwa 5 x 2 x 2 mm zurecht geschnittenen Gewebeproben wurden über 5 Stunden bei 4°C mit Yellow fix (Ito und Karnovsky, 1968) fixiert (2% Paraformaldehyd + 2.5% Glutaraldehyd + 0.2% Pikrinsäure in 0.1 M Cacodylatpuffer, pH 7.2) und anschließend über insgesamt drei Tage mehrfach mit Spülpuffer (0.1 M Cacodylatpuffer, pH 7.2 + 7% Saccharose) gespült. Mit 1%igem Osmiumtetroxid, gelöst in 0.1 M Cacodylatpuffer, erfolgte über 100 Minuten bei 4°C die Nachfixierung, gefolgt von mehrfachem Auswaschen mit Hilfe des Spülpuffers. Danach wurden die Proben in einer aufsteigender Alkoholreihe (je 15 Minuten 50, 70, 80, 90 und 96%, 2 mal 10 Minuten 100%igem Ethanol; jeweils bei Raumtemperatur) entwässert, in Propylenoxid (5 Minuten) und Propylenoxid-Epon-Gemische (1:2 und 2:1, je 1 Stunde) überführt und in Epon (Epon 812, Firma Serva) ausgebettet. Die Polymerisierung erfolgte bei 60°C über 16 Stunden.

Zunächst wurden zur Beurteilung und zur Orientierung 700 nm dicke Semidünnschnitte hergestellt (geschnitten an einem Mikrotom, Typ Ultracut UCT, Firma Leica) und nach Richardson (Romeis, 1989) gefärbt. Zur transelektronenmikroskopischen Untersuchung wurden 80 nm dicke Ultradünnschnitte angefertigt. Diese wurden auf befilmte Kupfernetze aufgezogen und mit Bleizitrat (2%ig) und Uranylacetat (5%ig) kontrastiert.

3.4.3 Rasterelektronenmikroskopische Proben

Auf Korkplättchen aufgespannte, etwa 1.5 cm² große Gewebeproben wurden über 24 Stunden in folgender Lösung fixiert: 2% Paraformaldehyd + 2.5% Glutaraldehyd in 0.1 M Cacodylatpuffer, pH 7.2. Anschließend wurden sie mit dem im Kapitel 3.4.2 genannten Spülpuffer mehrfach gespült und mit der entsprechenden Osmiumtetroxid-Lösung über 2 Stunden bei Raumtemperatur nachfixiert. Nach wiederholtem Spülen wurden die Proben über eine aufsteigende Alkoholreihe (2 mal 30 Minuten 50 und 70%; 30 Minuten 80%igem Ethanol I, 16 Stunden 80%igem Ethanol II, 2 mal 30 Minuten 90 und 96% und 4 mal 30 Minuten 100%igem Ethanol; jeweils bei 4°C) entwässert. Anschließend folgte eine 2-stündige Behandlung mit HMDS (1-1-1-3-3-3-Hexamethyldisilazan; Roth 3840.2) bei Raumtemperatur, bevor die Präparate über Nacht abdampften (Raumtemperatur). Nach dem Aufkleben der Präparate mit Leitzinn (Plano) auf Probenteller wurden sie bis zur Besputterung (eine Minute; Sputter Coater S150B, Firma Edwards, England) im Vakuumschrank aufbewahrt.

3.5 Übersichtsfärbungen sowie Proliferations- und Apoptose-Nachweise für die Lichtmikroskopie

Für die morphologischen und morphometrischen Untersuchungen wurden 5 µm dicke Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Desweiteren wurden Schnitte gleicher Dicke mit Periodsäure-Schiff-Reagenz-Alzianblau (PAS-AB), pH 2.5, gefärbt. Die hierbei verwendeten Farbstoffe färben die Schleimsubstanzen (Muzine) in den Becherzellen je nach ihrem pH-Wert unterschiedlich an. Dadurch wird zum einen die Erkennung der Becherzelle sehr vereinfacht, zum anderen stellen sich saure Muzine blau, neutrale Muzine hingegen rot dar (Romeis, 1989). Eine weitere Differenzierung der Muzine wurde nicht vorgenommen.

Zur Bestimmung der Proliferations- und Apoptoserate wurden spezielle Nachweise durchgeführt, die im Folgenden einzeln beschrieben werden.

3.5.1 Nachweis der proliferationsaktiven Zellen

Prinzip der Nachweismethode

Das Thymidin-Analogon Bromodesoxyuridin (BrdU) wurde den Schweinen eine Stunde ante mortem in einer Konzentration von 15 mg/kg Lebendmasse intraperitoneal verabreicht. Das veränderte Uridin wurde in dieser Stunde von Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befanden, in ihre Erbsubstanz eingebaut. Die inkorporierten BrdUridine werden durch monoklonale Antikörper aus einer Maus markiert. Die gebundenen Primärantikörper werden mit der Peroxidase-anti-Peroxidase-Methode (PAP) sichtbar gemacht, wobei ein Immunglobulin aus einem Kaninchen als Brückenantikörper dient (Romeis, 1989). BrdU-enthaltende Kerne stellen sich braun dar.

Die dazu verwendeten Reagentien waren folgende:

SILANE: Objektträger wurden nach Vorschrift der Firma Sigma A3648 beschichtet.

TBS I: Waschpuffer I (TRIS-buffered-saline); 0.1 M TRIS + 0.1 M NaCl + 0.05 M MgCl₂; pH 7.5

Inkubationspuffer: 0.05 M TRIS + 0.9% NaCl + 0.66 mM MgCl₂ + 1% BSA + 0.1% Gelatine (Merck 4078)

TBS II : Waschpuffer II; 0.05 M TRIS + 0.9% NaCl; pH 7.6

Trypsin: 0.1% + 0.1% CaCl₂ in TBS I (pH 7.6 bis 7.8)

SwNS: Schweine-Normalserum (DAKO X 0901); zur Vorinkubation 20%ig in TBS I

Nachweisreagentien (Inkubation):

Inkubation I: MaBrdU (DAKO M 07444; monoklonaler Antikörper einer Maus gegen BrdU); 1:25 in Inkubationspuffer + 2% SwNS

Inkubation II: RaMIg (DAKO Z 0259; Antikörper eines Kaninchens gegen Immunglobuline der Maus); 1:40 in Inkubationspuffer + 2% SwNS

Inkubation III: Mäuse-PAP (DAKO B 0650); 1:250 in Inkubationspuffer + 2% SwNS

BSA: bovines Serum-Albumin (Roth 8076.2)

M-Ig-G1: Immunglobulin Typ G1 aus einer Maus; DAKO X0931

Peroxidase-Nachweis: 40 mg Diaminobenzidin (DAB) in 210 ml TBS II + 50 µl H₂O₂ (30% ig);
pH 7.7

Lagerung aller Antikörper sowie des BSAs erfolgte bei 4°C

Durchführung

Von den Paraffinblöcken wurden 3µm dicke Schnitte angefertigt, die auf entfettete und mit SILANE beschichtete Objektträger aufgezogen und bei 40°C getrocknet wurden. Mit zwei fünfminütigen Xylolbädern wurde das Paraffin herausgelöst. Zur Einwässerung wurde eine absteigende Alkoholreihe (zwei mal 100, 96, 90, 80, 70% Ethanol; jeweils drei bis fünf Minuten) benutzt und abschließend mit Aqua bidest (zweimal drei Minuten) und TBS I (fünf Minuten) gespült.

Um die eingebauten Bromodesoxyuridine für den Antikörper zugänglich zu machen, wurden zunächst Kernproteine mittels siebenminütiger Trypsinierung bei 37°C gespalten, die durch Spülungen mit Aqua bidest (zwei mal eine Minute bei Raumtemperatur) gestoppt wurde. Anschließend wurde die Erbsubstanz (DNS) mit 4 M HCl denaturiert (2.5 Minuten bei Raumtemperatur). Es folgten mehrere Spülungen (jeweils drei bis fünf Minuten) mit TBS I.

Zur Vorinkubation wurden die Objektträger dann für 30 bis 45 Minuten bei Raumtemperatur in den Inkubationspuffer verbracht, dem 20% SwNS zugesetzt wurde. Für die Inkubation I, die 30 Minuten dauerte und während der die Proben in einer 37°C warmen, feuchten Kammer verweilten, wurden je Objektträger 100 µl der oben genannten Antikörperlösung (MaBrdU) verwendet. Nach mehrfachem Spülen mit TBS I bei Raumtemperatur erfolgte eine weitere Inkubation mit RaMIg (Inkubation II) ebenfalls bei 37°C in einer feuchten Kammer. Gespült wurde anschließend mit TBS II, wieder bei Raumtemperatur. Genauso wie die zweite Inkubation erfolgte schließlich eine dritte mit Mäuse-PAP. Gespült wurde ebenfalls mit TBS II. Der Peroxidase-Nachweis dauerte 25 Minuten und wurde im Dunklen bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach wiederholten Spülungen mit TBS II und Aqua bidest wurde eine Kernfärbung mit Mayers Häma-laun (2.5 Minuten) durchgeführt (Romeis, 1989). Nach zehnminütiger Bläuung unter Leitungswasser und abschließenden Spülungen mit Aqua bidest erfolgte eine erneute Entwässerung (steigende Alkoholreihe und Klärung mit Xylol) und schließlich die Eindeckung mit Entellan.

Zur Überprüfung der Spezifität der angewendeten Methode wurde eine Negativ-Kontrolle durchgeführt. Dazu wurde der monoklonale Antikörper einer Maus gegen das BrdU durch ein beliebiges Immunglobulin des gleichen Typs aus einer Maus (M-Ig-G1) ersetzt.

3.5.2 Apoptose-Nachweise

Prinzipien der Nachweismethoden

Bei der Apoptose entstehen durch die Aktivität zelleigener Endonukleasen charakteristische DNS-Fragmente. Eine Möglichkeit des histologischen Nachweises dieser Fragmente ist die von Gavrieli et al. (1992) beschriebene TUNEL-Methode (terminal-deoxynucleotidyl-transferase-(TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling). Sie basiert auf der spezifischen Bindung des Enzyms Terminal-desoxinukleotidyl-Transferase (TdT) zu den 3'-OH-Enden der DNS. Dieses Enzym koppelt Biotin-markierte Desoxyuridintriphosphate (Biotin-dUTP) an die DNS-Fragment-Enden. Das Biotin wird letztlich entsprechend der PAP-Methode sichtbar gemacht. Der hierbei verwendete Streptavidin-Biotin-Komplex, an den Peroxidasen chemisch gekoppelt sind, ersetzt die Antikörper (Gavrieli et al., 1992).

In einem anderen Verfahren wird die Anwesenheit eines für die Apoptose typischen Enzyms, der Caspase-3, nachgewiesen. Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers aus einem Kaninchen werden die zytoplasmaständigen Enzyme markiert. Nach der bereits erwähnten PAP-Methode werden die Primärantikörper sichtbar gemacht. Der in diesem Fall eingesetzte Brückenantikörper stammt aus einer Ziege.

Die für den TUNEL verwendeten Reagentien waren folgende:

TBS: 0.05 M TRIS-HCl (pH 7.6) + 0.9% NaCl

TdT-Puffer: 30 mM TRIS + 140 mM NaCacodylat + 1 mM CoCl₂; pH 7.2

TB-Puffer: 0.3 M NaCl + 0.03 M NaCitrat; pH 8.0

Biotin-dUTP: Boehringer 1093 070, Originallösung (50 nM/50 µl) verdünnt 1:10 mit PBS; eingesetzte Lösung 5 nM/50 µl (portioniert gelagert bei -20°C)

TdT: Boehringer 220 582, Kälberthymus; Originallösung (500 U/20 µl) 1:25 verdünnt mit 50% Glycerol in PBS; eingesetzte Lösung 500 U/500 µl (portioniert gelagert bei -20°C)

BSA: Bovines Serum-Albumin (Roth 8076.2; Lagerung bei 4°C)

SABC-KIT: Streptavidin-Biotin-Komplex (DAKO K0377; Lagerung bei 4°C)

DAB: 37.5 mg Diaminobenzidin/150 ml TBS + 70 µl H₂O₂ 30%

Proteinkinase; FLUKA 82456; 5, 10, 15, 20, 50 oder 100 µl/ml TBS

DNase: 0.5 U/µl (Boehringer Mannheim, 776785)

Durchführung

Die 3 µm dicken Paraffinschnitte wurden wie für den Proliferationsnachweis auf entsprechende Objektträger aufgezogen und eingewässert. Die Präparate wurden dann in Methanol mit 0.3% Wasserstoffperoxid gebleicht (30 Minuten) und anschließend mit Aqua bidest gespült. Zur

Freilegung der DNS-Bruchstücke wurden die Präparate Mikrowellen ausgesetzt. Während dieser Behandlung standen die Objektträger in 0.01 M Citratpuffer, pH 6.0. Die Mikrowelleneinwirkung erfolgte in 2 bis 4 Pulsen à 30 Sekunden bei 800 Watt. In den jeweils einminütigen Pausen wurde die Pufferlösung nachgefüllt. Insgesamt dauerte dieser Arbeitsschritt 6 Minuten. Nach 15-minütigem Abkühlen des Citratpuffers auf Raumtemperatur erfolgte eine erneute Spülung mit TBS. Anstelle der Mikrowellenbehandlung wurde in einigen Kontrolldurchläufen eine zehnminütige Inkubation einer Proteinkinase-Lösung (10 µg/ml TBS) durchgeführt.

Nach zehnminütigem Verbleib der Schnitte in TdT-Puffer wurden TdT und Biotin-dUTP zugesetzt. Nach einer Stunde bei 37°C wurden die beiden Zusätze mit TB-Puffer und anschließend mit TBS ausgespült. Dann wurden die Schnitte für 20 oder 30 Minuten in ein 3%iges BSA-Bad gefolgt von einem SABC-Bad bei Raumtemperatur verbracht, wobei jeweils eine TBS-Spülung zwischenfolgte. Der Peroxidase-Nachweis wurde mit DAB durchgeführt. Den Abschluß bildete eine Kernfärbung mit Mayers Hämalaun (5 Minuten, Romeis, 1989). Nach zehnminütiger Bläuung unter Leitungswasser und abschließenden Spülungen mit Aqua bidest wurden die Präparate erneut mittels aufsteigender Alkoholreihe und Xylol entwässert und schließlich mit Entellan eingedeckt.

Zur Überprüfung der Wirksamkeit der Reagentien wurden sowohl eine Positiv- als auch eine Negativ-Kontrolle durchgeführt. Bei sonst gleichen Arbeitsschritten wurde für die Positiv-Kontrolle eine zehnminütige DNase-Inkubation (0.5 U/µl) vorgeschaltet. Bei der Herstellung der Negativ-Kontrolle wurde auf den Zusatz von TdT verzichtet.

Für den Caspase-3-Nachweis wurden folgende Reagentien verwendet:

Citratpuffer: 0.01 M; pH 6.0

PBS: Phosphat-buffered saline; ohne Ca- und Mg-Ionen; pH 7.4

BSA: Bovines Serum-Albumin (ROTH 8076.2; Lagerung bei 4°C)

NSfS: Normales Schafserum (DAKO X0503; Lagerung bei 4°C)

ZNS: Ziegen-Normal-Serum (DAKO X0907; Lagerung bei 4°C)

Kaninchen-Serum: DAKO X0902; Lagerung bei 4°C

DAB: 20 mg Diaminobenzidin/100 ml PBS + 25 µl H₂O₂, 30%; pH 7.6

Verwendete Antikörper:

RahCaspase-3: Serotec AHP476 (Antikörper eines Kaninchens gegen humane Caspase-3);

1:100 in PBS + 2.5% ZNS + 0.1% BSA (Lagerung bei 4°C)

GaR-Ig: DAKO Z0421 (Antikörper einer Ziege gegen Immunglobuline eines Kaninchens);

1:20 in PBS + 1% BSA (Lagerung bei 4°C)

Rabbit-PAP: DAKO Z113; 1:40 in PBS + 1% BSA (Lagerung bei 4°C)

Durchführung

Einschließlich der Spülung nach der Mikrowellenbehandlung, die auch in 2 bis 4 Pulsen à 30 Sekunden bei 800 Watt erfolgte, wurde genauso verfahren wie bei der TUNEL-Methode, mit dem Unterschied, dass statt mit TBS mit PBS gespült und anstelle des 0.3%igen mit 1.8%igem Wasserstoffperoxid gebleicht wurde. Eine Proteinkinase-Behandlung wurde nicht durchgeführt. Nach einer halbstündigen Vorinkubation mit 10% NSfS + 2% BSA in PBS wurde Rah-Caspase-3 für eine Dauer von 18 Stunden bei 4°C zugesetzt und dann mit PBS ausgespült. Die Inkubationen mit GaR-Ig und Rabbit-PAP erfolgten nacheinander für 30 Minuten, jeweils gefolgt von Spülungen mit PBS. Der POD-Nachweis, die Kernfärbung, das Entwässern und das Eindecken erfolgte, wie bei der TUNEL-Methode bereits beschrieben, wobei hier anstelle des TBS PBS als Spülpuffer benutzt wurde und die Gegenfärbung mit Hämalaun 15 Minuten dauerte. Alle verwendeten Reagentien hatten Raumtemperatur.

Bei der diesen Nachweis begleitenden Negativ-Kontrolle wurde der spezifische Kaninchen-Antikörper gegen die humane Caspase-3 durch beliebiges Kaninchenserum ausgetauscht.

Die besonderen Nachweisverfahren wurden an Präparaten durchgeführt, die in Serie geschnitten wurden. An dem jeweils ersten Schnitt einer solchen Serie wurde der Proliferationsnachweis, am zweiten der TUNEL und am dritten der Caspase-3-Nachweis durchgeführt. Ein vierter Schnitt wurde zu Kontrollzwecken mit HE gefärbt.

3.6 Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden mit Hilfe eines Axioskops der Firma Zeiss, Deutschland durchgeführt. Bei der Untersuchung der HE-gefärbten Schnitte wurde neben Auffälligkeiten besonders auf Zottenform, Kryptenverlauf sowie auf Hinweise auf das Vorkommen von Apoptosen geachtet. Die PAS-AB(pH2.5)-gefärbten Schnitte wurden hinsichtlich der Verteilung der Becherzellen sowie der auftretenden Muzin-pH-Werte ausgewertet. Vor der Beurteilung der Präparate, an denen die speziellen Nachweise (Proliferation und Apoptose) durchgeführt worden waren, wurde zunächst anhand der Positiv- beziehungsweise Negativ-Kontrollen die Spezifität der Methode überprüft. Anschließend wurde vor allem auf Vorkommen und Lokalisation der nachzuweisenden Strukturen geachtet.

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung wurde an einem Gerät der Firma Bausch & Lomb, Kanada, Typ Nanolab 2000, durchgeführt. Die Auswertung der transelektronenmikroskopischen Proben erfolgte an einem Gerät Typ EM 10 CR der Firma Zeiss, Deutschland.

3.7 Morphometrie

Die histologischen Präparate wurden vom Mikroskop (Zeiss, Germany, Typ Axioskop) mittels einer Kamera (Sony 3 CCD, Modell DXC 930 P) digitalisiert und auf den Computerbildschirm übertragen. Mit dem Morphometrieprogramm Lucia 32-G, Corona Version 4.11 der Firma Nikon, Deutschland, wurden folgende Parameter erhoben:

- a.) Vergrößerungsfaktor der Schleimhautoberfläche durch Zottenbildung
- b.) Vergrößerungsfaktor der Schleimhautoberfläche durch Kryptenbildung
- c.) Relative Proliferationsrate

Alle Messungen wurden an Bereichen durchgeführt, in denen keinerlei Schleimhautfalten vorkamen und in denen sowohl die Darmwand als auch die Mehrzahl der Zotten axial getroffen waren. Desweiteren wurde darauf geachtet, dass die Lamina muscularis mucosae durchgängig vorhanden war. Bei der Auswertung mehrerer Schnitte der selben Probe waren diese mindestens 25 µm von einander entfernt. Es wurden von jedem Tier die Proben des proximalen Duodenums, des proximalen Jejunums und des distalen Ileums morphometrisch untersucht.

Die Parameter a. und b. wurden an HE-gefärbten Schnitten bei 30-facher Vergrößerung ermittelt; die Proliferationsrate wurde bei 120-facher Vergrößerung von solchen Präparaten erhoben, an denen der Proliferationsnachweis durchgeführt worden war.

Zur Ermittlung der Parameter wurde die Schleimhautoberfläche interaktiv markiert und ihre Länge gemessen. In einem zweiten Schritt wurde in dem selben Bildausschnitt die Länge der Lamina muscularis mucosae ermittelt. Anschließend wurden die Umrisse aller Kryptenanschnitte ermittelt und zu einer Länge addiert (dieses Maß entspricht der Länge der Basalmembran im Kryptenbereich des jeweiligen Bildausschnittes). Insgesamt wurde je Tier und Darmabschnitt eine Gesamtlänge der Lamina muscularis mucosae von mindestens 10 mm vermessen. Der Vergrößerungsfaktor der Schleimhautoberfläche durch Zottenbildung errechnete sich über Division der Länge der Zottenoberfläche und der Länge der darunter liegenden Lamina muscularis mucosae.

Der Vergrößerungsfaktor der Schleimhautoberfläche durch Kryptenbildung wird ausgedrückt als Quotient der Länge der Kryptenumrisse und der Länge der Lamina muscularis mucosae des selben Bildausschnitts.

Um Werte zu erhalten, die mit Ergebnissen anderer Untersuchungen vergleichbar sind, wurde der Quotient aus den beiden Vergrößerungsfaktoren gebildet. Damit diese Verhältniszahl größer als eins wird, wurde der Faktor der Kryptenoberfläche durch den der Zottenoberfläche dividiert.

Zur Ermittlung der relativen Proliferationsrate wurde die Anzahl der proliferierenden Zellen in den Krypten sowie die Länge der dazugehörigen Basalmembran bestimmt. Es wurden nur solche Kryptenanschnitte berücksichtigt, in denen die positiven Zellen klar von einander abgrenzbar waren. Insgesamt wurde ein Kryptenumfang von mindestens 20 mm ausgezählt. Der Parameter

wurde schließlich in Anzahl der Proliferationen pro mm Kryptenumfang ausgedrückt. Darüber hinaus wurde die Gesamtmenge der teilungsaktiven Epithelzellen innerhalb eines bestimmten Schleimhautabschnitts kalkuliert, indem die relative Proliferationsrate mit dem dazugehörigen Vergrößerungsfaktor der Schleimhautoberfläche durch Kryptenbildung multipliziert wurde. Der daraus resultierende Wert drückt aus, wieviele Proliferationen im Kryptenepithel innerhalb einer bestimmten Länge der Lamina muscularis mucosae vorhanden sind. Schließlich wurde der epitheliale Erneuerungsindex berechnet. Dazu wurde die Gesamtmenge der teilungsaktiven Epithelzellen ins Verhältnis gesetzt zur Größe der Zottenoberfläche. Der Erneuerungsindex gibt an, wieviele Epithelzellen im Verhältnis zur Zottenoberfläche neu entstehen [Proliferationen/mm Zottenoberfläche].

3.8 Statistische Analysen

Alle Parameter wurden an jedem Schwein und in allen drei Darmabschnitten ermittelt. In Einzelfällen waren die entnommenen Proben unbrauchbar. Aus den für jedes Tier und jeden Abschnitt mehrfach erhobenen Werten des selben Parameters wurde jeweils der Mittelwert gebildet. Um die sechs Schweine einer Gruppe zusammenzufassen, wurde ebenfalls das arithmetische Mittel bestimmt.

Die Vergleiche der einzelnen Parameter zwischen den Gruppen wurden mittels Zweifaktorieller Varianzanalyse durchgeführt. Das Signifikanz-Niveau lag bei 0.05. Zur Berücksichtigung von Wurfeffekten wurde der Faktor „Wurf“ in dem Faktor „Gruppe“ genestet. Im Anschluß daran wurde mit den standardisierten Residuen ein Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest durchgeführt, um das Vorliegen einer Normalverteilung zu überprüfen. Für alle Parameter konnte von einer Normalverteilung ausgegangen werden.

Um die Unterschiede der Parameter zwischen den einzelnen Dünndarmabschnitten zu untersuchen, wurden zunächst die Werte aller Schweine gemittelt. Anschließend wurde ein t-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt, wobei das Signifikanz-Niveau ebenfalls bei 0.05 lag.

Die Analysen wurden mit Hilfe des Computerprogramms SPSS für Windows, 9.0.1, 1999, durchgeführt.