

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß viskositätsbildender Nicht-Stärke-Polysaccharide auf die Morphologie der Dünndarmschleimhaut von sieben Wochen alten Schweinen geprüft. Dabei kamen licht-, raster- und transelektronenmikroskopische Techniken sowie immunhistochemische und morphometrische Methoden zum Einsatz.

Die untersuchten Dünndarmproben stammten von 24 Ferkeln, die im Alter von vier Wochen abgesetzt und in vier Gruppen eingeteilt worden waren. Während der anschließenden dreiwöchigen Fütterungsperiode erhielten die Tiere pro Gruppe eine von vier verschiedenen Diäten. Zwei der verfütterten Diäten waren semisynthetisch und basierten auf Maisstärke und Sojaprotein-Isolat. In der einen dieser semisynthetischen Diäten wurden 2% der kristallinen Zellulose gegen hochvisköse Karboximethylzellulose ausgetauscht. Die beiden anderen Rationen basierten auf einer Roggen-Weizen-Mischung und Sojaprotein-Isolat, wobei einer ein Xylanase-Präparat (Zy 68; 0.4 g/kg) zugesetzt war.

Neben der Lebendmasse wurden nach dem Töten der Tiere Länge und Gewicht des Darmtraktes bestimmt. Ferner wurde die Viskosität von duodenaler, jejunaler und ilealer Digesta gemessen. Zur Untersuchung der Teilungsaktivität der Epithelzellen wurde der Proliferationsmarker Bromodesoxyuridin eingesetzt. Um die Apoptose-Rate zu bestimmen, wurde sowohl die TUNEL-Methode angewendet als auch ein immunhistochemischer Nachweis des Enzyms Caspase-3 durchgeführt. Ausgehend von den morphologischen Befunden wurden neue morphometrische Parameter entwickelt, die mit den funktionell wichtigen Größen Resorptionskapazität und fraktioneller Proteinsynthese-Rate der Dünndarmschleimhaut im Zusammenhang stehen.

Die Ferkel, die mit einer semisynthetischen Ration gefüttert wurden, erzielten während der dreiwöchigen Fütterungsphase eine größere Lebendmassenzunahme als die Tiere, die die auf Getreide basierende Diät ohne Enzym-Zusatz erhielten. Bei Letztgenannten war ferner der Dünndarm relativ zur Lebendmasse schwerer.

Die Viskosität der Digesta war bei den Tieren am höchsten, die mit der semisynthetischen, Karboximethylzellulose-haltigen Diät gefüttert wurden. Sie betrug im Duodenum 2.57 mPas, im Jejunum 306 mPas und im Ileum 684 mPas. Die Digestaviskosität der Gruppe, die die Getreide-Diät ohne Enzymzusatz erhielt, war ebenfalls deutlich höher als die der beiden anderen Gruppen (Duodenum: 3.51 mPas; Jejunum: 53.8 mPas; Ileum: 215 mPas). In der Gruppe, die mit der semisynthetischen Ration ohne Karboximethylzellulose gefüttert wurde, betrug sie im Duodenum 0.93 mPas, im Jejunum 1.26 mPas und im Ileum 2.10 mPas. Für Tiere, die die Getreide-Ration mit Enzym-Zusatz erhielten, wurden im Duodenum 1.89 mPas, im Jejunum 39.4 mPas und im Ileum 8.76 mPas ermittelt.

Die Schleimhautoberfläche stellte sich generell variabel und inhomogen dar. Ein Einfluß der Futterzusammensetzung oder der Digestaviskosität auf die Morphologie der Schleimhautoberfläche konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Die duodenalen Zotten waren tendenziell zungenförmig mit variierender Breite und Dicke. Ferner wurden finger- und blattförmige Zotten gefunden sowie solche, die an ihrem freien Ende gefurcht oder gegabelt waren. Die jejunalen Zotten ähnelten regional denen des Duodenums; vermehrt traten jedoch sehr breite, Bogen- oder Gebirgskamm-ähnliche Zotten auf, die einander teilweise umgriffen oder seitliche Verzweigungen aufwiesen. Im Ileum waren ebenfalls Bereiche mit gleichförmig Zungen-ähnlichen Zotten zu finden. In Schleimhautregionen hingegen, die Lymphfollikel enthielten, war die Oberfläche sehr inhomogen. Sie bildete wulstige Leisten oder Käme, die teilweise in einander verschlungen waren und die gesamte Oberfläche zerklüftet erscheinen ließen. Typisch für solche Bereiche waren kuppelförmige Vorwölbungen von Lymphfollikeln an die Schleimhautoberfläche.

Die Lieberkühn-Krypten des Dünndarmes der hier untersuchten Ferkel formten ein in der Propria dreidimensional aufgeschlängelttes Schlauchsystem, wobei auch Verzweigungen auftraten. Die Auswertung der histologischen Präparate, an denen die Apoptose-Nachweise (TUNEL-Methode oder Caspase-3-Nachweis) durchgeführt wurden und die transelektronenmikroskopischen Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass Enterozyten ohne nachweisbare Kennzeichen einer Apoptose sterben. Stattdessen zeigen sie histologische Merkmale von Einzelzellnekrosen. Enterozyten können den Epithelverband sowohl in den Krypten als auch in der Zottenregion verlassen.

Um ein Maß für das Verhältnis der Zottenoberfläche zur basalen Schleimhautfläche, repräsentiert durch die Lamina muscularis mucosae, zu erhalten, wurde der Vergrößerungsfaktor der Schleimhautoberfläche durch Zottenbildung entwickelt. Der morphometrisch ermittelte Faktor betrug für das Duodenum durchschnittlich 3.31, für das Jejunum 3.72 und für das Ileum 2.71. Ein Einfluß der Rationszusammensetzung oder der Digestaviskosität wurde nicht festgestellt.

Der ebenfalls neu entwickelte Vergrößerungsfaktor der Schleimhautoberfläche durch Kryptenbildung betrug für das Duodenum 9.07, für das Jejunum 8.94 und für das Ileum 6.53. Generell war die Kryptenoberfläche der Schweine, die mit einer auf Getreide-basierenden Diät gefüttert wurden größer als die der Tiere, die eine semisynthetische Ration erhielten. Die Erhöhung der Digestaviskosität allein blieb ohne Auswirkung auf die Ausdehnung der Kryptenoberfläche.

Die Anzahl der proliferationsaktiven Epithelzellen pro mm Kryptenumfang - hier als relative Proliferationsrate bezeichnet - betrug im Duodenum 32.9, im Jejunum 34.8 und im Ileum 50.8. Unterschiede zwischen den verschiedenen Fütterungsgruppen wurden nicht gefunden.

Mittels des erstmals bestimmten epithelialen Erneuerungsindex wurden für das Duodenum 100, für das Jejunum 89.3 und das Ileum 133 teilungsaktive Epithelzellen pro mm Zottenoberfläche ermittelt. Für die Dünndarmproben der mit den Roggen-Weizen-Diäten gefütterten Ferkel wurden tendenziell höhere Werte gefunden als in den Proben der Tiere, die eine semisynthetische Ration erhielten. Sowohl der Karboximethylzellulose- als auch der Xylanase-Zusatz blieb ohne Auswirkung auf den epithelialen Erneuerungsindex.

7 Summary

The influence of viscosity forming non-starch polysaccharides on the morphology of the small intestinal mucosa of piglets

In the presented study the influence of viscosity producing non-starch polysaccharides on the morphology of the small intestine of seven week old pigs was examined. For this purpose light, scanning and transmission electron microscopic techniques as well as immuno-histochemical and morphometrical methods were applied.

The examined small intestinal specimens were taken from 24 piglets, which had been weaned at the age of four weeks and divided into four groups. During the following three week feeding period the animals received one of four different diets per group. Two of the diets were semi-synthetic and based on corn starch and a soy-protein-isolate. In one of those semisynthetic diets 2% of the crystalline cellulose was exchanged by highly viscous carboxymethylcellulose (CMC). The remaining two diets were based on rye and wheat and a soy-protein-isolate, with an additional xylanase-preparation in one of them.

The body weight of the animals and after sacrificing, the length and weight of the intestinal tract were determined. Furthermore, the viscosity of duodenal, jejunal and ileal digesta were measured.

In order to examine the proliferative activity of the epithelial cells, the proliferation marker bromodesoxyuridin was used. For determination of the rate of apoptosis both, the TUNEL-method and an immunohistochemical detection of caspase-3-enzyme was applied.

Based on the morphological findings new morphometric parameters were established, which correspond with the functionally important resorption capacity and the rate of fractional protein synthesis of the small intestinal mucosa.

The piglets fed a semisynthetic diet had a higher increase in body weight during the three week feeding period than those fed a cereal-based diet without enzyme supplementation. Moreover, in the latter the weight of the small intestine was higher in relation to their body weight.

The viscosity of the digesta was highest in animals fed the semisynthetic diet containing CMC. It was 2.75 mPas for the duodenum, 306 mPas for the jejunum, and 684 mPas for the ileum. The digesta viscosity of the group fed the cereal-based diet without enzyme supplementation was also significantly higher compared to the remaining two groups (duodenum: 3.51 mPas; jejunum: 53.8 mPas; ileum: 215 mPas).

In the group fed the semisynthetic diet without CMC it was 0.93, 1.26, and 2.10 mPas for duodenum, jejunum, and ileum, respectively. In those animals fed the cereal-based diet with the added enzyme a viscosity of 1.89, 39.4, and 8.76 mPas was determined for the duodenal, jejunal, and ileal digesta, respectively.

The mucosal surface was in general variable and inhomogeneous. An influence of the diet composition or the digesta viscosity on the morphology of the mucosal surface was not detectable. Duodenal villi had a tendency to be tongue-shaped with varying width and thickness. Furthermore, finger- and leaflike villi were found, some were ridged or branched at their free end.

Sometimes, the jejunal villi resembled those of the duodenum, however wide arched or crest-like villi were present, partly encompassing each other or showing lateral ramification.

In some regions of the ileum also tongue-shaped villi were found. In mucosal regions containing lymph follicles, the surface was inhomogeneous. It formed bulged ledges or crests, partly meandering-like folds, making the surface appear rugged. Typical for those regions were dome-like protrusions of lymph follicles towards the mucosal surface.

In the propria of the examined piglets, the small intestinal crypts of Lieberkühn built up a three-dimensional tubular system, sometimes branched.

Histological analysis of the sections stained for the detection of apoptosis (TUNEL, caspase-3) and trans electron microscopic examination showed that enterocytes die with no detectable signs of apoptosis. Instead, they had histological features of single cell necrosis. Enterocytes are able to leave the epithelial layer in both, the crypt and the villus region.

The relation of the villus surface to the basal mucosal areal, represented by the lamina muscularis mucosae, was determined by the enlargement factor for the villus surface. Morphometric measurements resulted in an average factor of 3.31 for duodenum, 3.72 for the jejunum, and 2.71 for ileum. No influence of the ratio-composition or digesta viscosity was detectable.

The other newly established enlargement factor for the crypt surface was 9.07, 8.94, 6.53 for duodenum, jejunum, and ileum, respectively. In general, the crypt surface of piglets fed the cereal-based diets was larger compared to those fed the semisynthetic diets. The increase in digesta viscosity alone had no effect on the expansion of the crypt surface.

The number of proliferative active epithelial cells per mm crypt perimeter - named relative proliferation rate - was 32.9, 34.8, and 50.8 for duodenum, jejunum, and ileum, respectively. There were no variations between the different feeding groups.

Finally, by using the newly established epithelial renewal index, 100 proliferative active epithelial cells per mm villus surface were determined for the duodenum, 89.3 for the jejunum, and 133 for the ileum. These factors tended to be higher in the small intestinal specimens of the piglets fed the rye and wheat diets compared to the factors of the semisynthetic fed animals. Both, the CMC and xylanase addition had no effect on the epithelial renewal index.