

## 5 Summary

The adaptation changes in the rumen mucosa in response to concentrate feeding were studied using 24 sheep. Beside the hay-fed group (control-group), these animals were assigned to 7 groups according to the duration of concentrate feeding (2, 4 days, 1, 2, 4, 6 and 12 weeks). Macro- and mesoscopic examinations, routine light microscopical staining and immunohistochemical techniques as well as scanning and transmission electron microscopical methods were employed for characterization of rumen epithelium of the different groups. Morphometrical analysis of the ruminal mucosa was carried out with a computerized image analysis program (Lucia 32-G Corona 4.11) (Nikom) for measurements of thickness of different epithelium strata and length of papillary bodies, and calculation of the total surface of papillae.

The total absorptive surface of the rumen-epithelium increased with increasing the duration of intake of concentrate feeding and showed marked structural differences from that of hay-fed sheep. The morphological adaptation of the rumen to concentrate feeding occurred rapidly within 2 days. However, 4 and 6 weeks concentrate-fed groups revealed the most significant structural differences among the different concentrate-fed groups, which can be summarized as follows:

1. Scanning electron microscopy (S.E.M) examination showed a time dependent complete sequence of transitional forms under the influence of the change of diet from small, tongue shaped papillae present in the rumen of hay-fed group to large, heavily cornified, finger and foliate shaped papillae present in the rumen of 4 and 6 weeks concentrate-fed groups, respectively. 4-12 weeks concentrate-fed groups showed deep and numerous grooves present on the surface of the papillae compared to the few shallow grooves present on the surface of papillae of hay-fed group. These deep primary and secondary grooves formed the irregular sides of papillae and the secondary papillae. High magnification of the papillary surface revealed squamous cells with cytoplasmic protrusions, which were well developed and had different shape and arrangement (foliate structure or forming an arrangement of complex cytoplasmic flaps) in sheep fed concentrate for 4-12 weeks compared to the less developed nipple-like projections, which are characteristic for hay fed-sheep.
2. Using quantitative morphological analysis, a remarkable effect of the diet and the duration of the concentrate feeding on the development of the ruminal papillae was observed. Among concentrate-fed groups, the mean length and width of the papillae of 4 weeks concentrate-fed

group was strikingly elevated (4.67 mm, 2.75 mm), respectively, compared to that of hay-fed group (2.21 mm, 1.77 mm). The mean length and width of the papillae of 4 weeks concentrate-fed group were more than 2 and 1.5 times the papillary length and width, respectively, of that of the hay-fed group. The number of papillae of 4 weeks concentrate-fed group (48 papillae / cm<sup>2</sup> mucosa) was higher than that of hay-fed group (38 papillae / cm<sup>2</sup> mucosa); however, these differences were not significant. The enlargement of papillae leads to a significant increase in the total surface of papillae and reached the peak value in the 4 weeks concentrate-fed group (1248.44 mm<sup>2</sup> / cm<sup>2</sup> mucosa), which is about 4 fold that of the hay-fed group (308.21 mm<sup>2</sup> / cm<sup>2</sup> mucosa).

3. 4 and 6 weeks concentrate-fed groups exhibited hypertrophic changes in the ruminal papillae and showed well developed epithelial pegs and papillary bodies. They showed also well developed connective tissue of the lamina propria concomitant with an increasing number of blood vessels, which extended close to the subepithelial surface in-between the epithelial pegs in the form of sinusoidal capillaries.

4. Qualitative morphological analysis showed that concentrate feeding for different time intervals might affect size of the epithelial cells more than their number. The number of epithelial cell layers was slightly increased from 6-8 cell layers in hay-fed animals to 7-10 cell layers in 4-12 weeks concentrate-fed groups. However, the mean thickness of the epithelium was increased significantly in 4 weeks concentrate-fed group (109 µm thick) and reached a maximum value (129 µm thick) in 6 weeks concentrate-fed group compared to that of hay-fed group (74 µm thick).

5. Transmission electron microscopy (T.E.M.) revealed that feeding concentrate diet for 4-6 weeks increased the intercellular spaces in all epithelial strata, particularly at the level of stratum basale and spinosum. Furthermore, it revealed also a well developed desmosome-rich stratum spinosum, a mitochondria-rich stratum basale and spinosum, the appearance of membrane coating granules, which were more concentrated at the upper surface of the most superficial spiny cells and the deep granular cells, and the appearance of thick tonofilaments in the stratum basale and spinosum (in 6 weeks concentrate-fed group). It showed also the development of extensive proximal projections of the basal cells accompanied by deeply folded basal lamina and short distances-located blood capillaries (well developed in 4 and 6 weeks concentrate-fed groups), which allowed to increase the surface area of the proximal portion of the basal cells and improved nutrient exchange processes between epithelial tissue and the circulatory system.

6.  $\alpha$ -smooth muscle actin-immunoreactive cells were detected in the rumen mucosa as a condensed layer at the position equivalent to the Lamina muscularis mucosae. Strong degree of antibody reaction (thick layer) was seen in 2-6 weeks concentrate-fed sheep.

Plasma membrane connexin 43 immunostaining was most intense at the stratum basale and stratum spinosum (deep layers) and decreased in staining intensity through stratum spinosum (superficial layers) to stratum granulosum. However, the stratum corneum was negative for connexin 43. The reaction around the cells gave a syncytial appearance with increased apical-immunostaining concentration. The degree of antibody reaction was weak in hay fed-sheep and in 2 days concentrate-fed sheep, moderate in 4 days and 1 week concentrate-fed sheep, strong in 2 weeks concentrate-fed sheep and very strong in 4 to 12 weeks concentrate-fed sheep.

NHE3-immunostaining exists in all strata of the epithelium except stratum corneum, with increased intenseness at both stratum granulosum (deep layer) and stratum spinosum (superficial layer), predominantly at the apical surface of the cells. The degree of antibody reaction was weak in hay fed-sheep and in all concentrate-fed groups, except in 2 and 4 weeks concentrate-fed groups, in which the degree of the antibody reaction was strong.

On the other hand, some abnormalities were seen in the rumen mucosa of 12 weeks concentrate-fed sheep, which could be summarized in the following: (a) branching of the lamina propria, with resultant formation of dark brown, mushroom-shaped papilla (b) misshaped epithelial pegs (c) evidence of inflammation and parakeratosis in the stratum corneum; the corneal cells formed a cap over the apex of the papilla and showed accumulation of lymphocyte-like cells in addition to the presence of foreign body lesion and leucocytes within the stratum spinosum (d) very wide intercellular spaces (e) appearance of a very thick tonofibrils bundles in both stratum basale and spinosum (f) appearance of keratohyaline granules in stratum spinosum and lipid infiltration within the cytoplasm of all epithelial strata.

## 6 Zusammenfassung

### **Fütterungs-abhängige morphologische Veränderungen des Pansenepithels von Schafen.**

Die anpassungsbedingten Veränderungen der Pansenschleimhaut in Abhängigkeit von unterschiedlich lange verabreichten Kraftfuttergaben wurden an 24 Schafen untersucht. Neben einer mit Heu gefütterten Kontrollgruppe wurden die Tiere in 7 Gruppen unterteilt, denen unterschiedlich lange Kraftfutter angeboten wurde: 2 bzw. 4 Tage sowie 1, 2, 4, 6 bzw. 12 Wochen. Zur Charakterisierung des Pansenepithels in den verschiedenen Futtergruppen wurden makro- und mesoskopische Untersuchungen, lichtmikroskopische Routine-Färbemethoden und Immunhistochemie sowie raster- und transmissionselektronenmikroskopische Methoden angewandt. Eine morphometrische Analyse der Pansenschleimhaut wurde mit Hilfe eines Computer-gestützten Bildverarbeitungsprogramms (Lucia 32-G Corona 4.11, Nikom) erstellt, wobei die Dicke der verschiedenen Epithelschichten sowie die Länge des Papillarkörpers gemessen und die Gesamtoberfläche der Pansenzotten berechnet wurde.

Die resorptive Oberfläche des Pansenepithels nahm mit länger andauernder Aufnahme des Kraftfutters zu und zeigte zusätzlich deutliche strukturelle Unterschiede zu der von Schafen, die nur mit Heu gefüttert wurden. Die durch die Kraftfuttergabe bedingten Anpassungen der Pansenmorphologie erfolgten bereits sehr schnell innerhalb von 2 Tagen. Die Tiere der Gruppe, denen 4 bzw. 6 Wochen Kraftfutter verabreicht wurde, zeigten jedoch die deutlichsten/signifikantesten strukturellen Veränderungen, welche wie folgt zusammengefasst werden können:

1. Die rasterelektronenmikroskopische (REM) Untersuchung zeigte kontinuierliche Veränderungen der Zottenform in Abhängigkeit von der Fütterungsdauer und der Futterart auf: von schmalen, zungenartig geformten Zotten im Pansen der heugefütterten Tiere bis hin zu großen, stark verhornten finger- bzw. blattartigen Zotten an der Pansenoberfläche der 4 bis 12 Wochen lang mit Kraftfutter versorgten Tiere. Einige geringfügige Vertiefungen an der Zottenoberfläche der zunächst mit Heu gefütterten Tiere wurden in Abhängigkeit von der Dauer der Kraftfuttergabe (4 bis 12 Wochen) tiefer und zahlreicher. Diese tiefen primären und sekundären Vertiefungen gestalteten die unregelmäßige Oberfläche der Papillen und Sekundärpapillen. Eine starke Vergrößerung der Papillarkörperoberfläche zeigte schuppenförmige, abgeflachte Zellen mit Zytoplasma-Protrusionen, welche bei Tieren aus

den Kraftfuttergruppen (4 bis 12 Wochen) gut entwickelt waren und verschiedene Formen und Strukturen aufwiesen (entweder blattartige Struktur bzw. ein komplexes Arrangement von Cytoplasmaausläufern), während bei den Heu gefütterten Tieren wenig entwickelte warzenartige Zytoplasmaausläufer charakteristisch waren.

2. Die quantitative morphologische Analyse zeigte einen beachtlichen Einfluss der Kraftfuttergabe sowie der Fütterungsdauer auf die Entwicklung der Pansenzotten. In der Gruppe der mit Kraftfutter versorgten Tiere vergrößerten sich die Mittelwerte der Länge und Breite der Zotten nach 4 Wochen langer Kraftfuttergabe deutlich auf 4,67 mm, 2,75 mm im Vergleich zu den nur mit Heu gefütterten Tieren (2,21 mm, 1,77 mm). Die Mittelwerte der Zottenlänge bzw. -breite erreicht im Vergleich zu den mit Heu gefütterten Tieren das 1,5- bzw. 2fache. Die Pappillendichte war bei Tieren aus den Kraftfuttergruppen nach 4 Wochen ebenfalls größer (48 Zotten / cm<sup>2</sup> Schleimhaut) als bei den Heu-gefütterten Tieren (38 Zotten / cm<sup>2</sup> Schleimhaut); allerdings waren diese Unterschiede nicht signifikant. Die Zunahme der Zottenanzahl und -größe verursachte eine signifikante Vergrößerung der Gesamtzottenoberfläche und erreichte mit 1248,44 mm<sup>2</sup> / cm<sup>2</sup> die größte Ausdehnung bei den Tieren, welchen 4 Wochen Kraftfutter verabreicht wurde. Dieser Wert stellt etwa das 4fache des entsprechenden Wertes der nur mit Heu gefütterten Tiere dar.

3. In den Gruppen der 4 bzw. 6 Wochen lang mit Kraftfutter versorgten Tiere zeigten sich hypertrophe Veränderungen in den Pansenzotten sowie gut entwickelte Epithelzapfen mit entsprechendem Papillarkörper. Auch das Bindegewebe der Lamina propria war gut entwickelt, vergesellschaftet mit einer zunehmenden Dichte von Kapillaren, die innerhalb des Papillarkörpers in Form von sinusoidalen Austauschgefäßen bis tief zwischen die Epithelzapfen zogen.

4. Die qualitative morphologische Analyse zeigte, dass die Kraftfuttergabe über die verschiedenen Zeiträume die Größe der Epithelzellen stärker beeinflusst als deren Anzahl. Die Anzahl der Epithelschichten vergrößerte sich leicht von 6 bis 8 Schichten bei mit Heu gefütterten Tieren zu 7 bis 10 bei Tieren aus den 4 bis 12 Wochen mit Kraftfutter versorgten Gruppen. Der Mittelwert der Epitheldicke erhöhte sich jedoch signifikant (109 µm Dicke) bei Kraftfuttergabe nach 4 Wochen und erreichte einen Maximalwert (129 µm) nach 6 Wochen im Vergleich zu den nur mit Heu gefütterten Tieren (74 µm).

5. Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zeigte, dass bei Tieren, die für 4 bis 6 Wochen mit Kraftfutter versorgt wurden, die Interzellularräume in allen Epithelschichten größer wurden, und zwar insbesondere im Stratum basale und Str. spinosum. Zusätzlich konnten ein gut entwickeltes, desmosomenreiches Str. spinosum, ein mitochondrienreiches

Str. basale und Str. spinosum, das Auftreten von Membrane Coating Granules (MCGs) - diese besonders konzentriert in der obersten Lage der Spinosazellen und der tiefen Lage der Granulosazellen - und das Auftreten dicker Tonofilamente im Str. basale und Str. spinosum (Gruppe der 6 Wochen lang mit Kraftfutter versorgten Tiere) demonstriert werden. Außerdem konnte dargestellt werden, dass die Basalzellen weitreichende, proximal ausgerichtete Ausläufer bilden, begleitet von einer tief eingefalteten Basallamina mit dazwischen liegenden kurzen Kapillarschleifen (vor allem in den 4 bzw. 6 Wochen lang mit Kraftfutter versorgten Gruppen). Diese Veränderungen sorgen für eine vergrößerte Kontaktfläche im unteren Basalzellbereich und ermöglichen so einen verbesserten Nährstoffaustausch zwischen Epithelgewebe und dem Blutkreislauf.

6.  $\alpha$ -Smooth-Muscle-Aktin-immunoreaktive Zellen konnten innerhalb der Pansenschleimhaut als verdichtete Schicht als Äquivalent der Lamina muscularis mucosae nachgewiesen werden. Eine sehr starke Reaktion auf den Antikörper (dicke reaktive Schicht) wurde vor allem bei Tieren nachgewiesen, die 2 bzw. 4 Wochen mit Kraftfutter versorgt wurden.

Eine Immunreaktion auf das Plasmamembran-ständige Connexin 43 wurde insbesondere im Stratum basale und Str. spinosum (tiefe Schichten) nachgewiesen, eine schwächere Reaktion fand sich innerhalb der oberflächlichen Schichten des Str. spinosum sowie des Str. granulosum. Die Hornzellschicht blieb jedoch immun-negativ hinsichtlich des Connexin 43. In Bereichen mit positivem Immunnachweis ergab die Reaktion rund um die Zellen ein synzytielles Muster mit verstärkter Färbung im apikalen Bereich. Die Immunreaktivität war insgesamt bei mit Heu gefütterten sowie bei nur 2 Tage mit Kraftfutter versorgten Tieren schwach, bei 4 Tage bzw. 1 Woche mit Kraftfutter versorgten Tieren mittel, bei 2 Wochen mit Kraftfutter versorgten Tieren stark, und sehr stark in den Gruppen, die 4 bis 12 Wochen mit Kraftfutter versorgt wurden.

Eine Immunreaktivität für NHE3 konnte in allen Epithelschichten außer dem Stratum corneum nachgewiesen werden, wobei die intensivste Reaktion sowohl im Str. granulosum (tiefe Schicht) als auch im Str. spinosum (oberflächliche Schicht) vorlag, mit besonderer Intensität an der apikalen Zelloberfläche. Die Reaktion war schwach bei allen Tieren, die nur mit Heu gefüttert wurden sowie in allen Kraftfutter-versorgten Tieren außer derjenigen der Gruppen, die für 2 bzw. 4 Wochen mit Kraftfutter versorgt waren: hier war die Antikörper-Reaktion stark.

Tiere, die für 12 Wochen mit Kraftfutter versorgt wurden, zeigten einige Auffälligkeiten der Pansenmucosa, die wie folgt zusammengefasst werden können: (a) Verzweigungen der Lamina propria, die zur Entwicklung von dunkelbraun gefärbten, pilzartig-geformten Zotten

fürten (b) missgestaltete Epithelzapfen (c) Hinweise auf Entzündungen und Parakeratose im Stratum corneum; die Hornzellen formierten sich zu einer Art Kappe über der Zottenspitze, während das Str. spinosum Ansammlungen von lymphozytären Zellen begleitet von Fremdkörperreaktion und Leukozyteninfiltration zeigte (d) sehr stark erweiterte Interzellularräume (e) Auftreten von sehr dicken Tonofilamentbündeln sowohl im Str. basale als auch im Str. spinosum (f) Auftreten von Keratohyalin granula im Str. spinosum, Lipidinfiltration im Zytoplasma aller Epithelschichten.