## Aus dem Institut für Tierernährung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

# Etablierung eines histologischen Protokolls zur intestinalen Mukusdarstellung sowie Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Zinkaufnahmen auf den Mukus im Darm von Absetzferkeln

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von Friedrich Joseph Hüttner Tierarzt aus Berlin

> Berlin 2017 Journal-Nr.: 3987

# Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopfleisch

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

piglets; jejunum; colon; intestinal mucosa; zinc oxide; mucus; mucins; morphology; fixation; staining; histology; polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 13.07.2017

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek* 

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <a href="http://dnb.ddb.de">http://dnb.ddb.de</a> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-824-5

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2017** Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2017 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de - www.menschundbuch.de

Meiner Familie und meinen guten F	Freunden	

# <u>Inhaltsverzeichnis</u>

nh	altsverze	ichnis	.l
Γal	pellenverz	zeichnis	V
	ŭ	erzeichnisV	
٩bl	kürzungs	verzeichnis	X
1.		Kapitel I: Einleitung	
2.		Kapitel II: Literaturübersicht	
	2.1	Funktionen des Verdauungsapparats	
	2.2	Das Immunsystem des Schweins	
2	2.3	Mukus und Muzine	
	2.3.1	Historische Betrachtung des Mukus	5
	2.3.2	Zusammensetzung des intestinalen Mukus	5
	2.3.3	Sekretion des intestinalen Mukus	6
	2.3.4	Die Schichtung des intestinalen Mukus	6
	2.3.5	Einteilung von Muzinen	7
	2.3.6	Der Aufbau von Muzinen	9
	2.3.7	Abgrenzung von Muzinen zu mucin-like molecules	0
	2.3.8	Funktionen der Muzine1	0
	2.3.9	Verteilung der Muzine im Verdauungstrakt1	1
	2.3.10	Expression des Muzins MUC2	2
2	2.4	Einfluss der Fütterung auf den intestinalen Mukus	3
2	2.5	Nachweis des intestinalen Mukus1	4
	2.5.1	Versuchstiere und Probensegment	7
	2.5.2	Fütterung der Versuchstiere1	7
	2.5.3	Methoden zum Nachweis des Mukus1	7
	2.5.4	Entnahme der Gewebeproben	7
	2.5.5	Präparation des Probenmaterials1	8
	2.5.6	Fixierung des Probenmaterials	8
	2.5.7	Schneiden der Gewebeproben1	9

		2.5.8	Auswahl der Objektträger	20
		2.5.9	Trocknung und weitere Behandlung der histologischen Schnitte	20
		2.5.10	Färbung der histologischen Schnitte	21
		2.5.11	Auswertung der Mukusschichtdicke	21
	2.6		Rolle des Spurenelements Zink im Gastrointestinaltrakt	23
	2.7		Fazit	
3.			Kapitel III: Material und Methoden	28
	3.1		Versuchsplan, Tiere und Haltung	28
	3.2		Fütterung der Versuchstiere und Futterzusammensetzung	29
	3.3		Futtermitteluntersuchung	31
		3.3.1	Weender Analyse	31
		3.3.2	Stärke	32
		3.3.3	Mineralstoffbestimmung	32
		3.3.4	Säurebindungskapazität	32
		3.3.5	Ergebnisse der Futtermittelzusammensetzung	32
	3.4		Leistungsparameter der Versuchstiere	34
	3.5		Sektionsgang und Probenentnahme	35
	3.6		Histologische Untersuchungen	36
		3.6.1	Gefrierfixierung des Probenmaterials sowie anschließende histologische	
			Schritte	36
		3.6.2	Chemische Fixierung des Probenmaterials sowie anschließende histologisch	ne
			Schritte	38
		3.6.3	Färbung der Gefrierschnitte	40
		3.6.4	Färbung der Paraffinschnitte	40
		3.6.5	Morphometrische Auswertung der Mukusdicke an Gefrierschnitten	41
		3.6.6	Morphometrische Auswertung der Mukusdicke an Methacarn-fixierten	
			Schnitten	42
		3.6.7	Morphometrische Auswertung der Kryptentiefe an Methacarn-fixierten	
			Schnitten	43
		3.6.8	Übersicht der gemessenen Schnitte	45

3.	7	Molekularbiologische Untersuchungen (PCR)	.46
	3.7.1	Probenentnahme	.46
	3.7.2	Probenaufbereitung und Einwaage	.46
	3.7.3	RNA-Extraktion	.46
	3.7.4	Bestimmung der Qualität und Quantität der RNA	.46
	3.7.5	Herstellung der cDNA	.46
	3.7.6	Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR	.47
3.8	В	Statistische Auswertung der Daten	.49
4.		Kapitel IV: Ergebnisse	.50
4.	1	Erarbeitung einer histologischen Methode zur Darstellung des Mukus im Jejunum und Kolon von Ferkeln nach dem Absetzen	.50
	4.1.1	Vergleich einer chemischen Fixierung mit einer Gefrierfixierung	.50
	4.1.2	Vergleich von drei Postfixationen an histologischen Gefrierschnitten	.53
	4.1.3	Vergleich verschiedener Färbungen an histologischen Gefrierschnitten	.61
	4.1.4	Vergleich einer Integralmessung mit einer Zehnpunktemessung der	
		Mukusschichtdicke	.64
4.2	2	Einfluss verschiedener Zinkkonzentrationen im Futter auf die Morphometrie u	
		mRNA-Expression im Jejunum und Kolon von Ferkeln nach dem Absetzen	.67
	4.2.1	Ergebnisse der morphometrischen Messungen im Kolon	.67
	4.2.2	Untersuchungen zur mRNA-Expression im Jejunum und Kolon	.71
5.		Kapitel V: Diskussion	.83
5.	1	Hintergrund und Zielstellung	.83
5.2	2	Kritik an der Methode	.84
	5.2.1	Kritik an der Etablierung eines Fixierungs- und Färbeprotokolls zur	
		histologischen Darstellung von Mukus im Darm	.84
	5.2.2	Kritik am Fütterungsversuch verschiedener Zinkkonzentrationen an	
		Absetzferkeln	.84
5.3	3	Fixierungs- und Färbeprotokoll zur histologischen Darstellung von Mukus im Darm von Absetzferkeln	.85
	5.3.1	Versuchstiere, Fütterung und Probenauswahl	.85
	532	Geweheentnahme für die histologischen Untersuchungen	87

	5.3.3	Gewebepräparation der histologischen Proben	87
	5.3.4	Gefrierfixierung des Probenmaterials	88
	5.3.5	Chemische Fixierung des Probenmaterials	89
	5.3.6	Histologische Schritte nach der Gefrierfixierung	90
	5.3.7	Histologische Schritte nach der chemischen Fixierung	94
	5.3.8	Anzahl der Mukusschichten	95
5.		Einfluss unterschiedlicher Zinkkonzentrationen im Futter auf die Mukusschichtdicke und Kryptentiefe des Kolons von Absetzferkeln	97
	5.4.1	Einfluss unterschiedlicher Zinkkonzentrationen im Futter auf die Mukusdicke	97
	5.4.2	Einfluss unterschiedlicher Zinkkonzentrationen im Futter auf die Kryptentiefe	
5.	5	Einfluss unterschiedlicher Zinkkonzentrationen im Futter auf die mRNA- Expression verschiedener Gene im Jejunum und Kolon von Absetzferkeln .	99
	5.5.1	Expression der mRNA von MUC2	99
	5.5.2	Expression der mRNA von TFF3	99
	5.5.3	Expression der mRNA von beta-Defensin 3	100
5.	6	Schlussfolgerungen und Ausblick	101
6.		Kapitel VI: Zusammenfassung / Summary	102
6.	1	Zusammenfassung	102
6.	2	Summary	105
7.		Protokolle	111
7.	1	Protokolle der Gefrierfixierung	111
	7.1.1	Postfixationsprotokolle der Gefrierschnitte	111
	7.1.2	Protokolle zur Färbung der Gefrierschnitte	112
7.	2	Protokolle der chemischen Fixierungen	117
	7.2.1	Protokolle zur Probenvorbereitung	117
	7.2.2	Protokolle zur Färbung der Schnitte	117
8.		Literaturverzeichnis	120
Dan	ksagun	g	131
Solh	ctctänd	iakaitearkläruna	133

# **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Zusammenfassung bislang entdeckter MUC-Gene '
Tabelle 2: Auflistung der im Verdauungsapparat vorkommenden Muzine (tierartübergreifend) <sup>1</sup> 11
Tabelle 3: Einflussfaktoren der MUC-Gen-Expression12
Tabelle 4: Ergebnisse von Messungen der Mukusdicke im Verdauungstrakt verschiedener Spezies22
Tabelle 5: Effekte der Fütterung hoher Dosen Zink auf Ferkel nach dem Absetzen <sup>1</sup> 24
Tabelle 6: Charakterisierung der Versuchsgruppen28
Tabelle 7: Berechnete Rationszusammensetzung und Inhaltsstoffe der Basismischung des Futters (Alleinfutter für Aufzuchtferkel: 25. bis 38. Lebenstag)30
Tabelle 8: Analysierte Nährstoffgehalte (g/kg) im Alleinfutter der Absetzferkel33
Tabelle 9: Für die Futtermitteluntersuchungen eingesetzte Geräte und Chemikalien33
Tabelle 10: Effekte unterschiedlicher Zinkverbindungen auf die zootechnischen Leistungen der Absetzferkel34
Tabelle 11: Übersicht morphometrisch erfasster histologischer Schnitte45
Tabelle 12: Ausgewählte Primer für die quantitative Reverse-Transkriptase-PCR47
Tabelle 13: Ergebnisse des Vergleichs der Schichtdicke des Mukus (in µm) nach Gefrier- und Methacarnfixierung von Gewebeproben aus dem Kolon von Absetzferkeln (n=10)52
Tabelle 14: Qualitative Bewertung von Serienschnitten gefrierfixierter Gewebeproben aus dem Kolon von Absetzferkeln nach Verwendung unterschiedlicher  Postfixationen
Tabelle 15: Ergebnisse des Vergleichs der Schichtdicke des Mukus (in µm) nach PFA- und Ethanolfixation von Gefrierschnitten im Kolon von Absetzferkeln (n=10)56
Tabelle 16: Ergebnisse des Vergleichs der Schichtdicke des Mukus (in µm) nach PFA- und 4%NBF-Fixation von Gefrierschnitten im Kolon von Absetzferkeln (n=10)58
Tabelle 17: Ergebnisse des Vergleichs der Schichtdicke des Mukus (in µm) an  Serienschnitten nach PFA-Fixation von Gefrierschnitten im Kolon von  Absetzferkeln (n=10)

Tabelle 18: Er	gebnisse des Vergleichs der Schichtdicke des Mukus (in µm) nach PFA- Fixation der Gefrierschnitte mit AB pH 2,5-PAS- und AB pH 0,5-PAS-Färbung im Kolon von Absetzferkeln (n=10)63
Tabelle 19: Er	rgebnisse des Vergleichs der Schichtdicke des Mukus (in μm) nach Integral- und Zehnpunktemessung von Gewebeproben aus dem Kolon von Absetzferkeln (n=24)66
Tabelle 20: Er	gebnisse des Vergleichs der Schichtdicke des Mukus (in µm) im Kolon von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)
Tabelle 21: Er	gebnisse des Vergleichs der Kryptentiefe (in µm) im Kolon von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)70
Tabelle 22: Er	gebnisse des Vergleichs der MUC2-mRNA im Jejunum von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)
Tabelle 23: Er	gebnisse des Vergleichs der MUC2-mRNA im Kolon von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)
Tabelle 24: Er	gebnisse des Vergleichs der TFF3-mRNA-Expression im Jejunum von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)
Tabelle 25: Er	gebnisse des Vergleichs der TFF3-mRNA-Expression im Kolon von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)
Tabelle 26: Er	gebnisse des Vergleichs der β-Defensin 3-mRNA-Expression im Jejunum von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)80
Tabelle 27: Er	gebnisse des Vergleichs der β-Defensin 3-mRNA-Expression im Kolon von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)82

# **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Zusammenfassend	le Darstellung der Methoden zum Nachweis des Mukus im
Verdauungsappa	rat15
Zehnpunktemess "Integralmessung	Verfahren zur Mukusdickenmessung am Kolon. Links: ung; Mitte: "Integralmessung" (Flächenerfassung); rechts: " (Längenerfassung). A: Darmwand, B: Mukusschicht, C: arminhalt44
Methacarnfixierui	sdickenvergleich bei Verwendung von Gefrier- und ng an Gewebeproben im Kolon von Absetzferkeln n=10, Methacarnfixierung: n=6)51
mit flüssigem Stid Paraformaldehyd	kusschicht von Gewebeproben des Kolons; Gefrierfixierung kstoff und anschließende Postfixation durch dampf (links) bzw. nach Fixierung durch Methacarn (rechts);
Postfixationen (P	sdickenvergleich bei Verwendung unterschiedlicher FA und Ethanol) der Gefrierschnitte im Kolon von 10 je Gruppe)55
mit flüssigem Stid	kusschicht von Gewebeproben des Kolons; Gefrierfixierung kstoff und anschließende Postfixation durch dampf (links) bzw. Ethanol (rechts); Färbung: AB2,5-PAS56
Postfixationen (P	sdickenvergleich bei Verwendung unterschiedlicher FA und 4%NBF) an Gefrierschnitten des Kolons von 10 je Gruppe)57
mit flüssigem Stid	kusschicht aus Gewebeproben des Kolons; Gefrierfixierung kstoff und anschließende Postfixation durch dampf (links) bzw. 4%NBF (rechts); Färbung: AB2,5-PAS58
•	sdickenvergleich an Serienschnitten mit PFA-Fixation im ferkeln (n=10 je Gruppe)59
LUT) bzw. Kolons	ukusschicht aus Gewebeproben des Jejunums (links mit (rechts); Gefrierfixierung mit flüssigem Stickstoff und ostfixation durch Paraformaldehyddampf; Färbung: AB2,5-

Abbildung 11:	Quantitativer Mukusdickenvergleich nach PFA-Fixation der Gefrierschnitte bei Verwendung unterschiedlicher Färbungen (AB pH 2,5-PAS- und AB pH 0,5-PAS) im Kolon von Absetzferkeln (n=10 je Gruppe)62
Abbildung 12:	Darstellung der Mukusschicht aus Gewebeproben des Kolons; Gefrierfixierung mit flüssigem Stickstoff und anschließender Postfixation durch Paraformaldehyddampf; Färbung: AB 2,5-PAS (links) bzw. AB 0,5-PAS (rechts)
Abbildung 13:	Quantitativer Mukusdickenvergleich bei Verwendung von zwei unterschiedlichen Messmethoden (Integral- und Zehnpunktemessung) im Kolon von Absetzferkeln (n=10 je Gruppe)
Abbildung 14:	Quantitativer Mukusdickenvergleich im Kolon von Absetzferkeln bei67
Abbildung 15:	Quantitativer Vergleich der Kryptentiefe im Kolon von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)
Abbildung 16:	Quantitativer Vergleich der MUC2-mRNA-Expression im Jejunum von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)71
Abbildung 17:	Quantitativer Vergleich der MUC2-mRNA-Expression im Kolon von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)
Abbildung 18:	Quantitativer Vergleich der TFF3-mRNA-Expression im Jejunum von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)
Abbildung 19:	Quantitativer Vergleich der TFF3-mRNA-Expression im Kolon von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)
Abbildung 20:	Quantitativer Vergleich der $\beta$ -Defensin 3-mRNA-Expression im Jejunum von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (Gruppe A: n=6, Gruppe B: n=8, Gruppe C: n=5)79
Abbildung 21:	Quantitativer Vergleich der $\beta$ -Defensin 3-mRNA-Expression im Kolon von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (Gruppe A: n=8, Gruppe B: n=5, Gruppe C: n=6)81
Abbildung 22:	Summary of methods for detection of mucus in the digestive system109

# **Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius	GALT	Gut associated lymphatic
μl	Mikroliter		tissue (darmassoziertes
μm	Mikrometer		lymphatisches Gewebe)
4%NBF	4% neutral buffered formalin	GIT	Gastrointestinaltrakt
	solution (4%ige Neutral-	GlyCAMx	Glykosylation-dependent
	gepufferte-Formalin-		cell adhesion molecule x
	Lösung)	h	hour/s (Stunde/n)
AB	Alcianblau	HE	Hämatoxylin-Eosin
ad libitum	"nach Belieben"	ΙE	Internationale Einheit
AMP	antimikrobielles Peptid	IEL	intraepitheliale
APC	antigen presenting cell		Lymphozyten
	(Antigen präsentierende	IFNγ	Interferon gamma
	Zelle)	IgA	Immunglobulin A
Aq. Bidest	zweifach destilliertes	IgG	Immunglobulin G
	Wasser	IL-x	Interleukin-x
AT	annealing temperature	IPEC-J2	Intestinale porzine
	(Annealing-Temperatur)		Epithelzellen des mittleren
BSL	Bandeiraea simplicifolia		Jejunums
	lectin	IQR	Interquartilrange
CAM	cell adhesion molecule		(Interquartilbereich)
	(Zelladhäsionsmoleküle)	ISO	International Organization
cDNA	complementary DNA		for standardization
	(komplementäre DNS)	ITF	intestinal trefoil factor (heute
CDx	cluster of differentiation x		TFF3)
02/	(Unterscheidungsgruppe x)	kDa	Kilodalton
cm	centimeter (Zentimeter)	kg	Kilogramm
Co	Kobalt	KI	Konfidenzintervall
Cu	Kupfer	KM	Körpermasse
df	degree of freedom	LPS	Lipopolysaccharid
ui .	(Freiheitsgrad)	LUT	lookup table
D-Glukose	Dexter-Glukose	LOT	(Umsetzungstabelle)
D-Glukose DNA	deoxyribonucleic acid	min	Minute(n)
DINA	(Desoxyribonukleinsäure)	MALT	Mucosa associated
E. coli	Escherichia coli	IVIALI	lymphatic tissue
EEL			• •
	Euonymus europaeus lectin		(mukosaassoziertes
ELISA	enzyme linked	Mari	lymphatisches Gewebe)
-4 -1	immunosorbent assay	Max	Maximum
et al.	et alii (und andere)	MDa	Megadalton
EtOH	Ethanol	mEq	Milliäquivalent
EU	Europäische Union	mg	Milligramm
FA -	Futteraufwand	Mg	Magnesium
Fe	Eisen		

MHCx	major histogomnatihility	gRT-PCR	guantitativa ravaraa
MINCX	major histocompatibility complex x	qR1-PCR	quantitative reverse transcriptionPCR
	(Haupthistokompatibilitäts-		(quantitative reverse
			` •
Min	komplex x)	D-	Transkriptase PCR)
Min	Minimum	Ra	Rohasche
MJ/kg	Megajoule pro Kilogramm	RELMβ	Resistin-like molecule beta
Mn	Mangan	Rfa	Rohfaser
mol/l	Mol pro Liter	Rfe	Rohfett
mRNA	messenger RNA	RNA	ribonucleic acid
	(Boten-Ribonukleinsäure)		(Ribonukleinsäure)
n	number (Anzahl)	Rp	Rohprotein
Na	Natrium	Se	Selen
NaCl	Natriumchlorid	SEA	sea urchin sperm protein,
NADPH	Nicotinamidadenin-		enterokinase and agrin- domain (Seegurken-
	dinukleotidphosphat		Spermaprotein,
NfE	stickstofffreie Extraktstoffe		Enterokinase
ng	Nanogramm		und Agrin-Domäne)
nm	Nanometer	sek	Sekunde/n
OT	Objektträger	spp.	species pluralis (Plural von
Р	Phosphor		Spezies)
PAS	Periodsäure-Schiff-Färbung	TCR	T cell receptor (T-Zell-
PBS	phosphate buffered saline		Rezeptor)
	(Phosphatgepufferte	TFFx	Trefoil factor x
	Salzlösung)		(Kleeblattfaktor x)
PCR	polymerase chain reaction	TGFβ	transforming growth factor
	(Polymerase-	·	beta (Transformierender
	Kettenreaktion)		Wachstumsfaktor)
PFA	Paraformaldehyddampf	TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
PGE	Prostaglandin E	TS	Trockensubstanz
рH	pH-Wert	UEA	Ulex europaeus agglutinin
PMA	Phorbol 1-myristate 13-	UV	Ultraviolett(strahlung)
	acetate	VIP	vasoaktives intestinales
PNA	peanut agglutinin		Peptid
ppm	parts per million (Teile von	Vit.	Vitamin
	einer Million)	VNTR	variable number tandem
PRR	pattern recognition receptor	******	repeats
	(Mustererkennungs-	ZIP4	ZRT-IRT-like protein 4
	rezeptor)	Zn -	Zink
PTS	Prolin-Threonin-Serin	ZnO	Zinkoxid
P-Wert	Irrtumswahrscheinlichkeit	ZnT1	zinc transporter 1
i -vvCit	in tarriswarii soricii iilorikelt	41111	Zino dansporter i

## 1. Kapitel I: Einleitung

Schweine spielen als lebensmittellieferende Tiere weltweit eine zunehmende Rolle. Sowohl unter betriebswirtschaftlichen als auch Tierschutzaspekten ist die Tiergesundheitsvorsorge ein entscheidender Faktor in der landwirtschaftlichen Produktion. In der Schweineproduktion ist der Zeitpunkt des Absetzens der Ferkel von der Sau eine gesundheitlich kritische Periode. Zu den häufigsten Komplikationen zählen Durchfallerkrankungen in den ersten Wochen nach dem Absetzen.

Eines der vielversprechenden Forschungsthemen beschäftigt sich in diesem Zusammenhang mit gesundheitsfördernden Eigenschaften von Futterzusatzstoffen. Diese schließen organische Säuren, Probiotika, phytogene Substanzen, Enzyme, aber auch Spurenelemente ein.

Zink ist ein unverzichtbares Spurenelement für eine Vielzahl von Enzymen des Stoffwechsels, wie der RNA Polymerase oder der Carboanhydrase. Daneben wird in einer Reihe von Studien der positive Effekt der Fütterung bedarfsüberschreitender Dosen Zinks auf die Tiergesundheit beschrieben. Dazu zählen neben erhöhter Futteraufnahme und einem erhöhten Körperwachstum insbesondere die Verringerung von Durchfallraten nach dem Absetzen. Die genauen Wirkmechanismen erhöhter Zinkkonzentrationen im Futter sind jedoch nur teilweise geklärt. Auch adverse und toxische Wirkungen der Verfütterung von deutlich über dem Bedarf liegenden Zinkdosen, wie etwa die Erhöhung multiresistenter *E. coli* im Darm von Ferkeln, werden beschrieben.

Die Auswirkungen von Zink auf die intestinale Mukusschichtdicke wurden bisher nicht untersucht. Unterschiedliche Zinkgaben könnten direkt und indirekt die Zusammensetzung oder die Menge des Mukus beeinflussen. Dies kann von hoher Relevanz sein, da dem intestinalen Mukus als wichtige physikalische und immunologische Barriere vor dem Epithel eine Schlüsselrolle für die Darmgesundheit zukommt. Für die Bewertung dieser Frage ist jedoch die Variabilität der bisher verwendeten histologischen Methoden zur Darstellung der Mukusschicht durchaus problematisch. Dies macht die Entwicklung eines standardisierten Verfahrens für vergleichende Untersuchungen notwendig.

Das Ziel dieser Arbeit schließt die Erstellung eines standardisierten histologischen Fixierungs- und Färbeprotokolls zur Darstellung des Mukus im Darm sowie die Untersuchung des Einflusses von unterschiedlichen Zinkkonzentrationen im Futter auf die Mukusschichtdicke des Darmepithels von Absetzferkeln ein.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene histologische Methoden angewendet und verglichen mit dem Ziel, ein nachvollziehbares und standardisiertes Verfahren für die Erhebung von Messdaten zu entwickeln. Daneben wurden, nach Erarbeitung der Methodik, Untersuchungen zum Effekt unterschiedlicher Zinkkonzentrationen im Futter auf den Mukus durchgeführt. Dies schloss neben der Messung der Mukusschichtdicke auch die Untersuchung der Morphologie des Dickdarms hinsichtlich der Kryptentiefe ein. Abschließend wurden die mRNA-Expressionen von Proteinen des intestinalen Mukus untersucht.

Die vorliegende Arbeit soll somit einen Beitrag zum Verständnis der Auswirkungen von Zink auf den intestinalen Mukus leisten sowie eine für Untersuchungen am Schwein optimierte Methodik zur Darstellung des Mukus im Darm liefern.

## 2. Kapitel II: Literaturübersicht

## 2.1 Funktionen des Verdauungsapparats

Die Aufgaben des Verdauungsapparats umfassen unter anderem die mechanische Zerkleinerung und die physikalisch-chemische Zersetzung sowie die Resorption der Nahrung. Je nach Segment finden unterschiedliche Sekretions- und Resorptionsprozesse statt. In der Maulhöhle erfolgt die Speichelsekretion (Liebich, 2010), Der Speichel dient dem Schutz der Schleimhaut, der Erhöhung der Gleitfähigkeit der Nahrung sowie dem Beginn des enzymatischen Abbaus der Kohlenhydrate beim Schwein (Berendt, 2013). Das sezernierte Speichelvolumen des Schweins beträgt 1 bis 1,5 Liter pro Tag (Aurich und von Engelhardt, 2009). Nach dem Abschlucken gelangt die Nahrung in den Magen. Die Passagezeiten des Futters im Magen sind speziesspezifisch und betragen beim Schwein in Abhängigkeit vom aufgenommenen Futter 6-8 Stunden (Brahm et al., 2013). Im Anschluss der Magenpassage erfolgt der Weitertransport der Nahrung zum Dünndarm. Der Dünndarm dient vornehmlich der Nahrungsresorption sowie der Sekretion von Verdauungsenzymen und Gallensäuren. Die Dünndarmmotorik unterliegt in diesem Prozess einer komplexen Steuerung und besitzt unterschiedliche Funktionen, Hierzu zählen der Transport des Chymus, die Durchmischung der Verdauungssekrete mit dem Chymus und die Herstellung des Kontakts von Chymus mit der Darmwand (Aurich und von Engelhardt, 2009). Schwerverdauliche Nahrungsbestandteile gelangen in den Dickdarm, hier findet die Resorption von Wasser- und Gallensäuren statt (Aurich und von Engelhardt, 2009, Haller und Hörmannsperger, 2013).

Mit Ausnahme der mehrschichtig verhornten Plattenepithelien an Lippe und Rektum ist der gesamte Verdauungsapparat mit einer Schleimhautschicht (Mukosa) überzogen. Die Schleimhaut besteht aus mehreren Schichten. Hierzu zählen die Lamina epithelialis (einschichtiges Epithel), darauf folgt die Lamina propria mucosae (Bindegewebsschicht) und anschließend die Lamina muscularis mucosae (Schicht aus glatten Muskelzellen) (Liebich, 2010). Die Mukosa weist unter anderem deutliche morphometrische Variationen innerhalb der einzelnen Segmente auf, die von deren jeweiligen funktionellen Aktivitäten abhängen (Weiss, 1984). Sie stellt somit den zellulären Kontakt des Organismus mit der Außenwelt dar und spielt als hochselektive Barriere eine Schlüsselrolle in der Integrität der Organismus.

## 2.2 Das Immunsvstem des Schweins

Das Immunsystem bietet Schutz vor externen und internen Noxen, wie etwa Mikroorganismen oder entarteten Zellen. Dazu ist eine Unterscheidung zwischen "Eigen" und "Fremd" notwendig, welche eine effektive Beseitigung der Pathogene mit einem möglichst nachhaltigen Schutz des Organismus einschließt (Vollmar et al., 2013). Eine wichtige Rolle spielen hierbei Körpergrenzflächen, zu denen die Hautoberfläche, der Gastrointestinal-, der Respirations- und der Reproduktionstrakt zählen. Sie bieten ein optimales Habitat für Mikroorganismen (Tizard, 2012). Das Abwehrsystem wird üblicherweise in ein angeborenes und ein erworbenes Immunsystem unterschieden.

Das angeborene Immunsystem umfasst Epithelzellen, Immunzellen sowie Proteine. Epithelien bedecken innere und äußere Körperoberflächen. Sie bilden eine physikalische Barriere durch ihren Verbund (tight junctions) und eine chemische Barriere durch ihre Sekretionsprodukte, wie z. B. Schleim. Zusätzlich ist die Sekretion von Schleim auch ein physikalischer Schutz gegen die Anhaftung von Pathogenen (Vollmar et al., 2013). Physikalische Barrieren stellen die erste und wichtigste Hürde für Pathogene dar. Der Zilienstrom an Flimmerepithelien sowie Niesen, Husten, Erbrechen und Durchfall sind einige Beispiele für physikalische Abwehrreaktionen. Gleichzeitig spielt die Besiedlung des Epithels mit kommensalen Mikroorganismen eine beachtliche Rolle in der Verhinderung einer massiven Vermehrung pathogener Keime (Tizard, 2012, Rokhsefat et al., 2016). Verschiedene Autoren zeigten, dass kommensale Mikroorganismen eine wichtige Funktion in der Epithelerneuerung und auch bei Heilungsprozessen einnehmen. Dies erfolgt durch die Aktivierung bestimmter pattern recognition receptors (PRRs), die über Signalkaskaden (Bildung von "heat-shock proteins", "trefoil factors", "epidermal growth factor receptor ligands" sowie Verdichtung der "tight junctions") die Epithelbarriere fördern. Bei fehlender Besiedlung kommensaler Bakterien verlaufen bereits leichte Epithelschäden letal für den Organismus (Cario et al., 2004, Rakoff-Nahoum et al., 2004, Podolsky et al., 2009, Khutorvanskiv. 2014). Beispiele für Sekretionsprodukte als chemische Barrieren sind Enzyme, wie das Lysozym im Speichel oder das Pepsin im Magen. Bei Translokation von Pathogenen werden diese in der Regel nachfolgend durch phagozytierende Zellen aufgenommen (Vollmar et al., 2013).

Das erworbene Immunsystem umfasst antigenpräsentierende Zellen (APC), Lymphozyten und lösliche Faktoren. Es greift ein, wenn die Eliminierung von Pathogenen durch das angeborene Immunsystem nicht erfolgreich war. Hauptvertreter der APC sind dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen. Sie sind vor allem im epithelialen Gewebe zu finden (Tizard, 2012, Vollmar et al., 2013). Die Lamina propria der Schleimhaut beinhaltet organisiertes lymphatisches Gewebe, abgekürzt MALT, welches vor allem das Gleichgewicht zwischen Toleranz und Abwehr von Pathogenen maßgeblich beeinflusst (Lüllmann-Rauch. 2012). Lymphatisches Gewebe wird in primäre und sekundäre Immunorgane unterteilt. Primäre Immunorgane, wie der Thymus und das Knochenmark gewährleisten die Lymphopoese. Sekundäre Immunorgane sind für die Entwicklung einer erworbenen Immunantwort zuständig, zu denen auch das MALT zählt. Ein Großteil des MALT befindet sich im Darm und wird als darmassoziertes lymphatisches Gewebe (GALT) bezeichnet (Vollmar et al., 2013). Die zum GALT gehörenden Peyerschen Plaques stellen die größten Aggregationen lymphatischen Gewebes im Organismus dar. Schweine besitzen zwei Arten von Peyerschen Plaques: Zum einen Ileocaecale Peyersche Plaques, die zu den primär lymphatischen Organen gehören, zum anderen jejunale Peyersche Plagues als sekundäre lymphatische Organe (Tizard, 2012). In den Peyerschen Plaques kommt es zur Aktivierung und Differenzierung der lymphatischen Zellen. T- und B-Zellen stellen den größten Anteil der Lymphozyten dar und sind für die Eliminierung von infizierten Zellen als auch für die Aktivierung anderer Immunzellen zuständig. Schweine besitzen mindestens fünf IgG-Klassen. Diese stellen 85 % der gesamten Immunglobuline im Serum dar, während IgA nur 3 % einnimmt. Obwohl Peyersche Plaques viele Lymphozyten beinhalten, wird IgA überwiegend in den Lymphknoten und isolierten Plasmazellen produziert. Letztere machen mindestens 80 % aller Plasmazellen aus. Somit ist IgA trotz niedriger Dosis im Serum das am häufigsten produzierte Immunglobulin im Organismus (Tizard, 2012).

## 2.3 Mukus und Muzine

## 2.3.1 Historische Betrachtung des Mukus

Mukus ist auf allen Schleimhäuten des Körpers zu finden. Bei Amphibien bedecken Schleimhäute teilweise die Epidermis (Gendler und Spicer, 1995, Perez-Vilar und Hill, 1999, Johansson *et al.*, 2008). Mukus ist bereits lange Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Die erstmalige Beschreibung erfolgte im 18. Jahrhundert (Hoffbauer und Juncker, 1734). Bereits um 1900 wurde Mukus in enge Verbindung mit dem Entstehen von Magenulzera gebracht (Stuart-Low, 1901).

In den 1980er Jahren forcierten die Entdeckung der komplexen Glykolisierung der Muzine sowie die Beteiligung tumorassozierter Epitope von Muzinen auf malignen Epithelzellen weitere Untersuchungen (Hanisch und Müller, 2000). Im Jahr 1976 gelang die biochemische Analyse von Bronchialmukus des Menschen (Roussel *et al.*, 1976). Die starke Glykolisierung der Muzine erschwerte lange deren biochemische Untersuchung, da die Entfernung der Kohlenhydrate häufig zur Zerstörung der Proteine führte. Ein entscheidender Schritt folgte mit der Genanalyse durch die Entschlüsselung der Gensequenzen der Muzine in den späten 80er Jahren des 20. Jahrhunderts (Gum *et al.*, 1989).

Aufgrund der Schwierigkeit der Darstellung des Mukus entstanden über viele Jahre unterschiedliche Methoden zum Mukusnachweis. Diese reichen von einfachen histologischen Methoden bis hin zu aufwändigen in-vivo Untersuchungen.

## 2.3.2 Zusammensetzung des intestinalen Mukus

Der intestinale Mukus besteht zu 83-95 % aus Wasser. Weitere Komponenten sind Muzine (glykosilierte Proteine), andere Proteine, Lipide, Zellbestandteile und anorganische Salze (Gendler et al., 1990, Larhed et al., 1998, Perez-Vilar und Hill, 1999, Khutoryanskiy, 2014). Muzine stellen die größte Gruppe der Proteine im Mukus dar. Sofern die Genseguenz eines Muzins im humanen Genom verankert ist, wird es als "MUCx" bezeichnet. Dabei wird das "x" durch eine Zahl ersetzt (Dekker et al., 2002). Das Hauptmuzin des intestinalen Mukus ist das MUC2 (siehe Kapitel 2.3.6). Neben den Muzinen existieren weitere Komponenten des Mukus, Hierzu zählt die heterogene Gruppe der antimikrobiellen Peptide (AMP), Lysozym wurde als erstes AMP von Fleming und Allison entdeckt (Fleming und Allison, 1922). Epithelzellen des Darms können eine Reihe dieser AMP sezernieren. Auch Panethzellen dienen dieser Sekretion, iedoch mit einem anderen Spektrum an AMP. Dazu gehören bestimmte Defensine. Cathelecidine und Lysozyme (Kim und Ho. 2010. Peterson und Artis. 2014). Auch beta-Defensine haben eine große Bedeutung in der Abwehr von Mikroorganismen im Darm (Wehkamp et al., 2005). Neben AMP sind auch sogenannte Trefoil factors (TFFs) Teil der Mukusstruktur. Ein Beispiel ist das ITF (intestinal trefoil factor), das heute als TFF3 bezeichnet wird. TFF sind Peptide, die ebenfalls von den Becherzellen produziert werden (Suemori et al., 1991). Durch ihre vernetzenden Eigenschaften tragen sie wie MUC2 zur typischen Mukusstruktur bei (Tomasetto et al., 2000, Hollingsworth und Swanson, 2004). Darüber hinaus werden weitere Peptide gefunden wie etwa IgA (Vollmar et al., 2013) oder das Resistin-like molecule-β (RELM β) (Peterson und Artis, 2014).

#### 2.3.3 Sekretion des intestinalen Mukus

Die Entleerung des in den Becherzellen gebildeten Mukus findet mittels einer basalen und einer Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Sekretion statt (Kim und Ho, 2010). Durch eine Elektrostimulation der enterischen Nerven wird durch Ausschüttung von Neurotransmittern der Nervenendigungen im Darm eine Degranulation von Becherzellen ausgelöst. Dies lässt den Schluss zu, dass die Darmaktivität im Zusammenhang mit der Mukusproduktion steht (Phillips *et al.*, 1984). Chemische Verbindungen wie Acetylcholin, Cholinagonisten, Histamin und andere Substanzen führen zur erhöhten Sekretion der Becherzellen. Zu weiteren stimulierenden Faktoren zählen Choleratoxin, PGE, IL-1, PGF<sub>2β</sub>, Cysteamin und Senföl (Bickel und Kauffman Jr, 1981, Neutra *et al.*, 1982, Specian und Neutra, 1982, LaMont *et al.*, 1983, Cohan *et al.*, 1991). Allerdings scheint die Sekretionssteuerung komplexer zu sein, da intestinale Peptidhormone wie Cholecystokinin, Sekretin, Substanz P, Neurotensin, vasointestinales Peptid, sowie das Monamin Serotonin nicht zu einer erhöhten Sekretion führen (Neutra *et al.*, 1982). Bisher sind die genauen Mechanismen der Regulation und Beeinflussung der Mukusdicke nicht ausreichend bekannt (Johansson *et al.*, 2011a).

## 2.3.4 Die Schichtung des intestinalen Mukus

Bis heute existieren unterschiedliche Angaben hinsichtlich der Anzahl der Mukusschichten. In Lehrbüchern wird teilweise eine innere und eine äußere Schicht beschrieben (Tizard, 2012). Gründe für die Diskussion über die Anzahl der Schichten liegen zum einen in der Verwendung unterschiedlicher Nachweismethoden des Mukus und zum anderen in der variierenden Behandlung der Tiere vor und während der Probennahme, z. B. am Futterzugang. Dessen Bedeutung hinsichtlich der Messungen des Mukus wird im Kapitel 2.4 und Kapitel 5.3.1 näher erläutert.

Die Beschreibung einer Zweischichtigkeit erfolgte 1997 für das Kolon beim Menschen (Matsuo et al., 1997). Demnach ist die innere Mukusschicht vertikal verlaufend, während die äußere darüberliegend sich mehrschichtig laminiert darstellt. Die Autoren vernachlässigten Hinweise zum Nahrungszugang der untersuchten Patienten vor der Probennahme, wenngleich wegen des chirurgischen Eingriffes von einer gewissen Fastenzeit ausgegangen werden kann. Die Zweischichtigkeit wurde mittels in vivo-Messung des Mukus auch bei Ratten beschrieben und hierbei in allen Darmsegmenten beobachtet (Atuma et al., 2001). Demnach war die äußere Schicht absaugbar, die innere Schicht dagegen nur abzuschaben. d. h. die Haftungsstärke des Mukus nahm nach luminal ab. Die Versuchstiere fasteten vor Probennahme. Bei Methacarn-fixierten Proben ist die Zweischichtigkeit im Dünndarm bisher nicht nachgewiesen. Vielmehr deuten neuere Studien mit Methacarnfixierung sowie in vivo-Messungen auf das Vorliegen einer Einschichtigkeit im Dünndarm hin (Johansson et al., 2008, Ermund et al., 2013). Die Zweischichtigkeit ist im Dickdarm in vivo und ex vivo dagegen wiederholt beschrieben (Johansson et al., 2008, Ermund et al., 2013, Johansson et al., 2013). Die Zusammensetzung der Proteine in beiden Schichten ist nahezu identisch. Die innere und die äußere Schicht unterscheiden sich in Teilen jedoch wesentlich. Die innere Schicht haftet stärker an dem Epithel, ist kompakter und opaker. Sie besitzt viele Defensine und Lysozyme. Außerdem sind hier kaum Bakterien enthalten. Die kommensalen und pathogenen Bakterien sind wiederum vielfach in der äußeren Schicht aufzufinden. Biochemische Untersuchungen zeigen eine vierfach geringere Konzentration des MUC2 Proteins in der äußeren Schicht (Atuma et al., 2001, Johansson et al., 2008, Tizard, 2012). Durch eine experimentelle Hemmung endogener Proteasen kommt es zum Anstieg der Konzentration von MUC2 sowie zum deutlicheren Erhalt des Proteingerüsts in der äußeren

Schicht. Die Schichtdicke ist nach einer Stunde dennoch der ungehemmten Mukusschicht gleich. Dessen ungeachtet zeigt der Mukus gnotobiotischer Mäuse ebenfalls eine Zweischichtigkeit. Hieraus schlussfolgerten die Autoren, dass nicht nur mikrobielle Proteasen sondern auch endogene Prozesse eine Rolle bei der Quellung des Schleims spielen und die Zweischichtigkeit des Mukus im Dickdarm aufgrund von körpereigenen und mikrobiellen Proteasen entsteht (Johansson et al., 2008).

## 2.3.5 Einteilung von Muzinen

Muzine werden in zwei funktionelle Gruppen unterteilt: sekretierte und membrangebundene Muzine (Gendler et al., 1990, Gendler und Spicer, 1995). Die sekretierten Muzine werden in Becherzellen produziert und sezerniert (Forstner, 1978). Sie werden in "gel-forming" und "non gel-forming" eingeteilt. Die "gel-forming" Muzine tragen maßgeblich zur gelartigen Struktur des Mukus bei (Gendler und Spicer, 1995). Membrangebundene Muzine sind Peptide, die in der Zellmembran verankert sind. Sie besitzen eine Vielzahl an Aufgaben. Hierzu gehört der Schutz des Epithels etwa durch die Bindung bestimmter Bakterien. Sie besitzen aber auch Rezeptorfunktionen, die zur Aktivierung bestimmter Signalkaskaden führen (Hattrup und Gendler, 2008). Trotz großer Differenzen der Struktur und Funktion von sekretierten und membrangebundenen Muzinen besitzen sie starke Ähnlichkeit in ihrer Nukleotidfolge, entweder durch die Sequenz oder durch die Anzahl ihrer Aminosäuren (Gendler und Spicer, 1995).

Die Vielzahl in der Literatur beschriebenen MUC-Gene wird in der nachfolgenden Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Zusammenfassung bislang entdeckter MUC-Gene 1

Sekretierte Muzine					
Muzin Gen	Subfamilie	Vorkommen			
MUC2	Gelformend	Mensch			
MUC5AC	Gelformend	Mensch			
MUC5B	Gelformend	Mensch			
MUC6	Gelformend	Mensch			
MUC7	Nicht-gelformend	Mensch			
MUC8	Nicht-gelformend	Mensch			
MUC9 <sup>2</sup>	Nicht-gelformend	Mensch			
MUC10	Nicht-gelformend	Maus <sup>3</sup>			
MUC19	Gelformend	Mensch			
	Membranständige Muzine				
Muzin Gen	Subfamilie	Vorkommen			
MUC1	Membranständig	Mensch			
MUC3A/B	Membranständig <sup>4</sup>	Mensch			
MUC4	Membranständig	Mensch			
MUC11	Membranständig <sup>4</sup>	Mensch			
MUC12	Membranständig	Mensch			
MUC13	Membranständig	Mensch			
MUC14	Membranständig/EndoMuzin	Mensch			
MUC15	Membranständig	Mensch			
MUC16	Membranständig	Mensch			
MUC17	Membranständig	Mensch			
MUC18 <sup>5</sup>	Membranständig	Mensch			
MUC20	Membranständig	Mensch			
MUC21	Membranständig	Mensch			
MUC22 <sup>6</sup>	Membranständig	Mensch			

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> modifiziert nach Andrianifahanana et al. (2006) sowie ergänzt durch

http://www.genenames.org/genefamilies/MUC (01.03.2017) und Melnick et al. (2001)

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Auch oviductal glycoprotein 1 (OVGP1) genannt

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Kommt nicht homolog beim Menschen vor (Melnick et al., 2001, Williams et al., 2006)

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> nach Rokhsefat et al. (2016), von HUGO (20.12.2016) als MUC12 gelistet

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Von HUGO nicht als MUC18 gelistet, sondern MCAM oder CD146. Dieses Gen steht auf der Grenze zwischen Muzin und muzinähnlichem Glykoprotein (Lehmann et al., 1989, Andrianifahanana et al., 2006, Wu et al., 2013)

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> auch Panbronchiolitits-related-mucin-like protein 1 (PBMUCL1) genannt (Jonckheere et al., 2013)

## 2.3.6 Der Aufbau von Muzinen

Sekretierte Muzine stellen die Hauptproteine des Mukus dar (Gendler *et al.*, 1990, Perez-Vilar und Hill, 1999). Einzelne Muzine unterscheiden sich stark in ihrer Größe. Die Kohlenhydrate bedingen 70 bis 90 % des Trockengewichts der Muzine (Perez-Vilar und Hill, 1999, Johansson *et al.*, 2011a). Muzine sind große Glykoproteine mit Muzin- respektive Prolin-Threonin-Serin-Domänen (PTS-Domänen), die stark O-glykolisiert sind. Ihre genetische Kodierungen werden unter den MUC-Genen zusammengefasst. Dabei handelt es sich um eine gemeinsame Gengruppe, obwohl die jeweiligen Proteine in Form und Funktion stark differieren.

Neben den Muzinen existieren andere Proteine mit kürzeren PTS-Domänen, wie IqA, die nicht zu den Muzinen zählen (Lang et al., 2007). Muzin- bzw. PTS-Domänen von echten Muzinen liegen häufig in sogenannten "variable number of tandem repeats" (VNTRs) vor (Lancaster et al., 1990). Die Anzahl der VNTRs variiert jedoch bereits zwischen gleichen Muzinen (Swallow et al., 1987, Gendler et al., 1990), Deshalb steht der Begriff VNTR seit über zehn Jahren in der Kritik (Dekker et al., 2002). Es existieren tierartlich große Unterschiede bezüglich der PTS-Genseguenzen. Dennoch sind die Seguenzen bereits bei phylogenetisch niederen Tieren nachweisbar. Aufgrund ihrer Heterogenität ist deren Eignung für phylogenetische Stammbaumanalysen fragwürdig. Andere Gensequenzen der Muzine wären für solche Untersuchungen jedoch denkbar (Lang et al., 2007). Ungeachtet dessen weisen die einzelnen Muzine weitere spezifische Peptiddomänen auf. Dazu zählen von-Willebrand- sowie SEA-Domänen (CORFIELD et al., 2000, Lang et al., 2007). Die Von-Willebrand-Domänen tragen zur Dimerisierung der Muzine einen substantiellen Anteil bei. Sie sind reich an Cystein und bilden somit stabile Disulfidbrücken (Gum et al., 1994, Offner et al., 1998). Die Domänen interagieren zusätzlich mit den zuvor erwähnten TFFs, eine Peptidgruppe die unter anderem epithelschützende Funktionen aufweist (Tomasetto et al... 2000, Hollingsworth und Swanson, 2004, Liu, 2014). SEA-Domänen kommen in membrangebundenen Muzinen vor und dienen als Spaltstelle für extrazelluläre Domänen (Johansson et al., 2013). Muzine besitzen viele O-Glykolisierungen, die durch die Aminosäuren Serin und Threonin ermöglicht werden (Gendler et al., 1990, Gendler und Spicer, 1995, Lang et al., 2007). Die O-Glykolisierung und Multimerisierung von Muzinen erfolgen im Golgi-Apparat, während die jeweilige Faltung, N-Glykolisierung sowie Dimerisierung des Proteins im rauen endoplasmatischen Retikulum der Becherzellen stattfinden (Asker et al., 1998, Inoue et al., 1999, Perez-Vilar und Hill, 1999). O-Glykolisierungen werden durch Glykosyltransferasen aneinandergereiht. N-Acetyl-D-Galaktosamin stellt dabei immer das erste Kohlenhydrat der Seitenkette dar und ist charakteristisch für Muzine (Neutra, 1987, Lang et al., 2007). Weitere Glykolisierungen der N-Acetylglukosamine, Fucose. Galaktose und Acetylneuraminsäure) sowie Spuren von Mannose und Sulfat (Dekker et al., 2002, Bansil und Turner, 2006, Corfield, 2015). Galaktose stellt in seinen spezifischen Verbindungen den am häufigsten vorkommenden Zucker im Muzin dar (Mantle et al., 1981). Dies spielt im Rahmen der Methodenetablierung bei der Färbung eine Rolle (siehe Kapitel 5.3.6 sowie Abbildung 1). Die Glykolisierungen beeinflussen die Funktionalität der Muzine. Durch posttranslationale Modifikationen werden sie in zwei Gruppen unterteilt: neutrale - und saure Muzine. Saure Muzine unterscheiden sich weiter in solchen mit Sialin- und solchen mit Sulfatgruppen (Gendler und Spicer, 1995). Teilweise kommen Sialin- und Sulfatgruppen zusammen auf einer Glykolisierung vor (Mawhinney et al., 1992), Muzine besitzen eine hohe Anzahl an Glykolisierungen, die ihnen eine hohe Wasserbindungskapazität verleihen und somit zur schleimartigen Konsistenz des Mukus beitragen (Ramaker, 2009).

MUC2 stellt das häufigste Muzin im Mukus dar. Es handelt sich um ein Monomer, dessen Masse 2,5 MDa beträgt. MUC2 hat eine netzartige Struktur und trägt durch seine Glykolisierungen substantiell zur gelartigen Struktur des Mukus bei (Johansson *et al.*, 2008). Sofern MUC-Gene tatsächlich eine Multigen-Familie bilden, liegen die jeweiligen Gene auf verschiedenen Chromosomen verteilt (Forstner *et al.*, 1995). Bei Entdeckung neuer Muzingene in Tieren wird deren Vorkommen im menschlichen Genom überprüft. Falls diese Gene auf dem menschlichen Genom verankert sind, werden sie von dem Human Gene Nomenclature Committee (HUGO) als neue MUCs gelistet. Eine aktuelle Liste ist über der Internetseite http://www.genenames.org/genefamilies/MUC abrufbar.

## 2.3.7 Abgrenzung von Muzinen zu mucin-like molecules

Bei den mucin-like molecules handelt es sich um muzinähnliche Glykoproteine. Ursprünglich ist der Begriff mucin-like molecules auf die Entdeckung des MUC1 zurückzuführen. Aufgrund seiner Membranbindung wurde MUC1 nicht den klassischen Muzinen zugeordnet. Nach heutiger Definition stellen mucin-like molecules membrangebundene Proteine mit relativ geringem Molekulargewicht (50-250 kDa) dar. Diese haben ebenfalls eine PTS-Domäne, die teilweise nicht keine Tandemwiederholung aufweist. Muzinähnliche Glykoproteine besitzen nicht wie echte Muzine sogenannte VNTRs. Sie bilden eine Gruppe innerhalb der Familie der CAMs (cell adhesion molecules). Bekannte Vertreter sind Selectin-Liganden wie GlyCAM-1 und CD34. Muzinähnliche Glykoproteine sind somit auch auf nicht-epithelialen Geweben zu finden (Simmons et al., 2001, Andrianifahanana et al., 2006).

#### 2.3.8 Funktionen der Muzine

Sekretierte, gastrointestinale Muzine sind Glykoproteine, die ein Mukusgel formen (Tizard, 2012).

Ihre Funktionen lassen sich einteilen in:

- Funktionen der Darmphysiologie: Feuchthalten des Epithels; Bildung einer Gleitschicht für Kot; Schutz des Epithels vor Säuren, Enzymen, Toxinen; Bildung einer selektiven Diffusionsbarriere.
- Funktionen der Darmgesundheit: Fixation von kommensalen Mikroorganismen; Fixation von Pathogenen (Bakterien, Viren, Parasiten); Komponente des GALT; Epithelerneuerung im Zusammenhang mit TFFs; Substrat für bakterielle Fermentation (Forstner und Forstner, 1994, Gendler und Spicer, 1995, Perez-Vilar und Hill, 1999, Montagne et al., 2004, Johansson et al., 2011a, Silbernagl, 2012).

Membrangebundene Muzine formen kein Gel, sondern sind in den Plasmamembranen verankert. Sie sind Teil der Glykokalix und spielen bei der Interaktion mit der Umwelt durch Signaltransduktion eine Rolle (Hattrup und Gendler, 2008, Corfield, 2015, Nakada, 2015). Im medizinischen Bereich können bestimmte Muzine wie z. B. das MUC1 als Tumormarker verwendet werden und dürften zukünftig auf dem Gebiet der Onkologie an Bedeutung erlangen (Gendler et al., 1990, Braunschweig et al., 2015).

## 2.3.9 Verteilung der Muzine im Verdauungstrakt

Das Vorkommen einzelner Muzine ist vom jeweiligen Segment des Verdauungsapparats abhängig.

In der nachfolgenden Tabelle 2 sind die im Verdauungstrakt beschriebenen Muzine dem jeweiligen gastrointestinalen Segment zugeordnet.

**Tabelle 2:** Auflistung der im Verdauungsapparat vorkommenden Muzine (tierartübergreifend)<sup>1</sup>

Segment	Muzin	Quelle
Magen	MUC1, MUC3, MUC5AC, MUC6, MUC13, MUC20	Andrianifahanana et al., (2006)
	MUC17	Gum Jr <i>et al.</i> , (2002)
Dünndarm	MUC1, MUC2, MUC3, MUC6, MUC17, MUC20	Andrianifahanana et al., (2006)
	MUC4	Jonckheere und Van Seuningen, (2010), Corfield, (2015)
	MUC13	Williams et al., (2001)
	MUC15	Pallesen et al., (2002)
	MUC21	Itoh <i>et al.</i> , (2008)
Dickdarm	MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC11, MUC12, MUC13, MUC17, MUC20	Andrianifahanana et al., (2006)
	MUC15	Pallesen et al., (2002)
	MUC21	Itoh et al., (2008)

modifiziert nach Andrianifahanana et al. (2006)

## 2.3.10 Expression des Muzins MUC2

Die Mechanismen der Expressionen einzelner MUC-Gene sind teilweise aufgedeckt. Sie erfolgen über verschiedene Signalkaskaden und werden von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst (Theodoropoulos und Carraway, 2007). Eine Steigerung der MUC-Gen-Expression ist nicht mit einer Mukussekretion gleichzusetzen. In der Mukusschicht des Verdauungstrakts sind die Gene von MUC2, MUC5AC, MUC5B und MUC6 nachgewiesen.

Die nachfolgende Tabelle 3 veranschaulicht eine Auswahl von Einflussfaktoren für die Expression dieser Gene.

Tabelle 3: Einflussfaktoren der MUC-Gen-Expression

Gen	Einflussfaktor	Quelle	
MUC2	Abnahme der Expression durch Roxithromycin	Kim et al., (2004)	
	Zunahme der Expression durch vasointestinales Peptid (VIP) <sup>2</sup>	Hokari <i>et al.</i> , (2005)	
	Zunahme der Expression durch Infektion mit Shigella spp.	Radhakrishnan <i>et al.</i> , (2007)	
	Zunahme der Expression durch Butyrat-Einlauf <sup>3</sup>	Gaudier et al., (2009)	
MUC5AC	Zunahme der Expression durch LPS	Smirnova et al., (2003)	
	Zunahme der Expression durch Infektion mit Shigella spp.	Radhakrishnan <i>et al.</i> , (2007)	
MUC5B	Zunahme der Expression durch Lipopolysaccharid (LPS)	Smirnova et al., (2003)	
MUC6	Zunahme der Expression durch Helicobacter pylori	Xia et al., (2004)	
	Abnahme der Expression durch <i>Helicobacter</i> pylori <sup>4</sup>	Babu <i>et al.</i> , (2006)	

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> modifiziert nach Theodoropoulos und Carraway (2007)

Es existieren neben den hier erwähnten weitere Faktoren, die Einfluss auf die Regulation der Expression verschiedener MUC-Gene zeigten. Dazu zählen Probiotika, PMA sowie entartete Zellen (Reis *et al.*, 1999, Zuhdi Alimam *et al.*, 2000, Lee *et al.*, 2002, Mattar *et al.*, 2002).

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Führt nicht zur erhöhten Sekretion innerhalb von 30 min (Neutra *et al.*, 1982)

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Als Äquivalent zu höherer mikrobieller metabolischer Aktivität

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> In progressiven Stadien der Infektion

## 2.4 Einfluss der Fütterung auf den intestinalen Mukus

Der Einfluss der Fütterung auf die intestinale Mukusschicht ist in der Literatur wenig beschrieben. Ergebnisse verschiedener Studien zeigen, dass sowohl die Fütterungstechnik als auch die Futterzusammensetzung sowie die Futterstruktur einen Einfluss auf den Mukus haben.

Zur Fütterungstechnik zählt der Zugang zum Futter. Der Futterzugang lässt sich in *ad libitum* (Bontempo *et al.*, 2006, Di Giancamillo *et al.*, 2008, Le Bon *et al.*, 2010) oder restriktive Fütterung einteilen (Jordan *et al.*, 1998, Atuma *et al.*, 2001). Eine restriktive Fütterung führt aufgrund mangelnden Abriebs des sekretierten Mukus durch Chymus zur Quellung des Schleims. Dies hat nicht nur Einfluss auf die gemessene Schichtdicke sondern auch auf die Zusammensetzung des Mukus (Johansson *et al.*, 2008). Die *ad libitum* Fütterung dagegen kommt der natürlichen Futteraufnahme vieler Tierarten näher (liboshi *et al.*, 1994). Der Futterzugang stellt einen wesentlichen Einflussfaktor auf die Anzahl und der Dicke der Mukusschichten dar (Kapitel 5.3.8).

Der Einfluss der Futterzusammensetzung auf den Mukus beruht auf direkten und indirekten Ursachen. Grob strukturiertes Futter führt durch Abrasion des Schleims zu einem Anstieg der Mukussekretion (Montagne et al., 2004). Eine größere Mukusschichtdicke durch Fütterung von grobem Futter konnte in einer Studie mit Absetzferkeln nicht nachgewiesen werden (Callies, 2012). Dagegen führte die Zugabe von Erbsenfasern zur Futterration bei Schweinen zu höheren Mukusmengen im Ileum. Der Mukus wurde hierbei über Zentrifugation des Darminhalts extrahiert (Leterme et al., 1998). Die Infusion freier Fettsäuren im Zäkum von Ratten steigerte die Becherzelldegranulation im Dickdarm (Sakata und Setoyama, 1995). Die Zugabe von Eugenol, einem Phenylpropanoid zum Futter von Mäusen erhöhte die Mukusschichtdicke im Kolon (Wlodarska et al., 2015).

Spurenelemente wie Zink oder Mengenelemente wie Eisen können durch die Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren Genexpressionen steigern (Cousins, 1998). Zum Einfluss von Zink auf die Mukusschichtdicke liegen bisher keine Studien vor. Weitere Fütterungsvariationen entstehen durch die Gaben von Medikamenten wie Prednisolon (Swidsinski et al., 2007) oder Zugaben von Mikroorganismen (Bontempo et al., 2006, Le Bon et al., 2010) und relativieren einen direkten Vergleich gemessener Mukusmengen.

## 2.5 Nachweis des intestinalen Mukus

Die histologische Darstellung als auch der quantifizierbare Nachweis des gebildeten Mukus stellen eine labortechnische Herausforderung dar (Hoyer, 1890, Szentkuti et al., 1990, Matsuo et al., 1997). Darüber hinaus existiert eine große Vielfalt von angewandten Methoden zur Mukusdarstellung im Verdauungsapparat (Callies, 2012). Neben der Methodik hat auch die Auswahl der Versuchstiere bzw. der Proben einen erheblichen Einfluss auf das Nachweisverfahren. Die nachfolgende Abbildung 1 liefert eine systematische Zusammenfassung der grundlegenden, in der Literatur beschriebenen Schritte sowie die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Methoden des Mukusnachweises. Durch farbliche Kennzeichnung wird die in dieser Arbeit favorisierte Methode hervorgehoben. Daran schließt sich eine komprimierte Beschreibung der damit zusammenhängenden Methoden und Einflussfaktoren an.

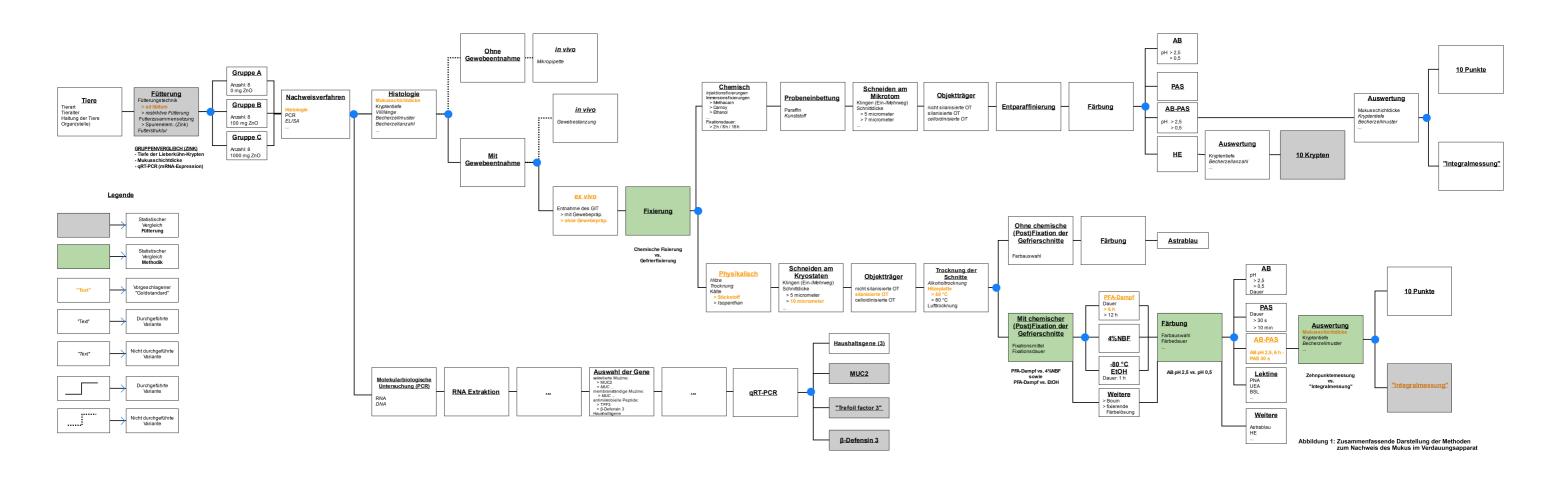


Abbildung 1: Zusammenfassende Darstellung der Methoden zum Nachweis des Mukus im Verdauungsapparat

## 2.5.1 Versuchstiere und Probensegment

Bei der Auswahl der Versuchstiere sind die Tierart, das Alter, das Geschlecht sowie die Haltungsbedingungen der Tiere zu beachten. In Abhängigkeit zur untersuchten Spezies existieren deutliche Unterschiede in der Mukusschichtdicke (Swidsinski et al., 2007, Callies, 2012, Wlodarska et al., 2015). Altersabhängige Veränderungen des Becherzellenmusters im Darm von Ferkeln wurden ebenfalls nachgewiesen (Liu et al., 2014a, Liu et al., 2014b). Auch die Wahl des Darmsegments ist von Bedeutung. Sowohl Schichtdicke als auch der Erhalt des Mukus variiert zwischen Ileum (Bontempo et al., 2006, Callies, 2012) und Duodenum (Atuma et al., 2001, Varum et al., 2010). Im Ileum ist der Mukus homogener und dichter als in Duodenum und Jejunum (Ermund et al., 2013).

## 2.5.2 Fütterung der Versuchstiere

Den Einfluss von Fütterungstechnik, Futterzusammmensetzung und Futterstruktur auf die Mukusbildung wurde bereits im <u>Kapitel 2.4</u> beschrieben. Dessen ungeachtet sind Fütterungsinformationen in der Literatur häufig unzureichend oder gar nicht ausgewiesen. Neben der Fütterung spielt auch der Umgang mit dem Darminhalt eine Rolle. Es kamen Gaben von Laxantien zur Entleerung des Magen-Darm-Traktes zur Anwendung (Callies, 2012). Manipulation des Darminhalts beeinflussen den Mukus im Verdauungsapparat (Johansson et al., 2011a).

#### 2.5.3 Methoden zum Nachweis des Mukus

Der Nachweis der sekretierten Mukusmenge kann indirekt über molekularbiologische Untersuchungen mittels einer PCR oder direkt über morphometrische Messungen mittels histologischer Methoden erfolgen. Zudem können indirekt histologisch durch die Bestimmung der Anzahl oder der Art der Becherzellen, die Kryptentiefe, die Länge der Villi intestinales sowie der Extraktion des Mukus durch Zentrifugation des Darminhalts Aussagen zum Mukus abgeleitet werden (Leterme et al., 1998, Bontempo et al., 2006, Le Bon et al., 2010).

Im Folgenden wird auf die direkte histologische Methode zur Messung des sekretierten Mukus eingegangen.

#### 2.5.4 Entnahme der Gewebeproben

Die Gewebeentnahme für die histologische Darstellung des Mukus ist *in vivo* oder *ex vivo* durchführbar.

In vivo-Entnahmen sind labortechnisch aufwendiger und die Größe der Proben ist begrenzt, da die Funktionalität des Darms in der Regel erhalten bleiben soll. Diese Methode wird in der Humanmedizin häufig angewendet. Dabei werden Proben über Stanzungen (Jordan et al., 1998) oder chirurgische Entfernung bestimmter Darmsegmente (Ota und Katsuyama, 1992, Matsuo et al., 1997) entnommen. Dieses Verfahren findet vor allem in der Onkologie Anwendung. Es existiert darüber hinaus eine Messmethode des Mukus ohne Gewebeentnahme. Hierbei erfolgt die Messung durch eine Mikropipette in vivo (Atuma et al., 2001, Johansson et al., 2008). Diese Variante ist mit hohem Arbeitsaufwand sowie Kosten verbunden und wurde bisher nur an Ratten durchgeführt.

Eine Entnahme ex vivo ist die arbeitstechnisch einfachste Methode, die häufig bei Tierversuchen zur Anwendung kommt. Ein weiterer Vorteil ist die Entnahme mehrerer Darmsegmente beliebiger Länge. Dabei wird direkt nach dem Töten des Tieres die Bauchhöhle eröffnet und die zu untersuchenden Darmstücke werden umgehend fixiert

(Sakata und Engelhardt, 1981, Jordan et al., 1998, Bontempo et al., 2006). Vor der Fixierung ist zu entscheiden, ob die Probe präpariert werden soll.

## 2.5.5 Präparation des Probenmaterials

Die Präparation des Probenmaterials vor der Fixierung ist möglich. Je nach Zielstellung differieren die Methoden erheblich. Folgende Verfahren werden angewendet:

- Das antimesenteriale Eröffnen des Darms: Dies beschleunigt das Eindringen der chemischen Fixierungen und reduziert somit autolytische Prozesse (Matsuo et al., 1997).
- Das vorsichtige Füllen des Darms mit gekühlter NaCl-Lösung: Dies verhindert das Kollabieren der gegenüberliegenden Darmwände bei leerem Darm (Jordan et al., 1998).
- Das Spülen des Darms mit NaCl-Lösung: Hierbei soll lediglich die adhärente Mukusschicht erhalten bleiben (Varum et al., 2010). Ein vergleichbares Verfahren ist die Gabe von Laxanzien vor der Tötung (siehe <u>Kapitel 2.5.2</u>).
- Das Fixieren des Gewebes auf einer Unterlage: Dies verhindert das Einrollen der Darmwand (Otto, 1983).

Eine Fixierung des Probenmaterials ohne vorhergehende Präparation ist ebenfalls durchführbar, wird in der Literatur jedoch selten beschrieben (Bontempo *et al.*, 2006, Le Bon *et al.*, 2010).

## 2.5.6 Fixierung des Probenmaterials

Das Ziel einer Fixierung ist der Erhalt des Gewebes in seinem momentanen Zustand. Der Begriff Fixierung steht sowohl für die Fixierung von Gewebeproben als auch für die Fixierung von Gewebeschnitten. Eine Fixierung von Gewebeschnitten kann z. B. nach Erstellen eines Gefrierschnittes im Kryostat durchgeführt werden. Dies kann als Postfixierung bzw. Postfixation bezeichnet werden (Mulisch und Welsch, 2010). Postfixationen respektive Nachfixationen sind Fixationen, die zusätzlich an bereits fixiertem Gewebe stattfinden (Irintscheff und Davidoff, 1981, Lang, 2006). Der Begriff Fixation wird häufig als Synonym für Fixierung sowohl von Gewebeproben (Titlbach, 1968, Callies, 2012, Ivemark *et al.*, 2013) als auch Gewebeschnitten (von Deimling, 1964, Irintscheff und Davidoff, 1981, Strehle, 2004) verwendet.

In dieser Arbeit wird in der Konsequenz der Begriff Fixierung bei Gewebeproben verwendet, dagegen der Begriff Fixation respektive Postfixation für Gewebeschnitte.

Die Fixierung der Gewebeproben ist notwendig, um *post mortem* Prozessen, z. B. der Autolyse entgegenzuwirken. Es gibt grundsätzlich zwei Möglichkeiten der Fixierung: die physikalische und die chemische Fixierung.

Die physikalische Fixierung erfolgt z. B. durch Trocknung, durch Hitze oder durch Kälte (Mulisch und Welsch, 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde die Fixierung durch Kälte aufgrund des minimal invasiven Einflusses auf das Gewebe gewählt. Diese Fixierung wird als Gefrierfixierung bezeichnet (Mulisch und Welsch, 2010). Schnelle Methoden, z. B. durch Gefrieren mit flüssigem Stickstoff, werden verwendet (Jordan *et al.*, 1998, Rieger J. *et al.*, 2016), da der Mukus sehr instabil ist. Kombinationen wie Stickstoff mit Isopentan kommen ebenfalls zur Anwendung (Sakata und Engelhardt, 1981, Ota und Katsuyama, 1992, Mulisch und Welsch, 2010). Die Verwendung von Isopentan wird genutzt, um das Leidenfrost'sche

Phänomen zu umgehen. Hierbei handelt es sich um die Bildung eines Gasmantels um das Probengewebe und somit einer Isolierung, die zu einer verzögerten Fixierung der Proben führt (Lang, 2006).

Der Vorteil von Stickstoff gegenüber anderen Fixierungen besteht in der Verhinderung von Mukusschrumpfungen (Mülberger, 2013) bzw. der Verhinderung der Dehydration von Gewebe (Varum *et al.*, 2010). Eine vorherige Ummantelung des Probengewebes mit TissueTek (liboshi *et al.*, 1994) (O.C.T.compound, Sakura Finetek 4583) oder Lebergewebe liefert anschließend, beim Anfertigen der Gefrierschnitte zusätzliche Stabilität (Jordan *et al.*, 1998).

Werden die gefrorenen Proben nicht umgehend weiterverarbeitet, erfolgt die Lagerung der Gewebeproben nach Gefrierfixierung bei -80 °C im Gefrierschrank. Da laut Definition die Fixierung auf den "Erhalt" von Gewebe zielt, ist der Begriff Stickstofffixierung fragwürdig. Stickstoff erzeugt keine dauerhafte chemische Veränderung des Gewebes und könnte somit als eine Konservierung betrachtet werden. Dennoch wird der Begriff Gefrierfixierung oder auch Kryofixation in der Wissenschaft üblicherweise verwendet (Mulisch und Welsch, 2010, Biemann et al., 2012).

Bei der chemischen Fixierung werden in der Regel Immersions-, Injektions- oder auftropfende Fixierungen verwendet. Immersionsfixierungen stellen chemische Lösungen dar, in denen Gewebestücke eingetaucht werden (Mulisch und Welsch, 2010). Es gibt reine Fixierungen wie die Verwendung von Ethanol (Ota und Katsuyama, 1992) aber auch Lösungen wie Carnoy (Ota und Katsuyama, 1992, Matsuo et al., 1997, Callies, 2012), Methacarn (Johansson et al., 2008, Johansson et al., 2011a), Bouin (Johansen und Kay, 1969, Ota und Katsuyama, 1992, Le Bon et al., 2010) und Formalinlösungen (Ota und Katsuyama, 1992, Sakamoto et al., 2000, Bontempo et al., 2006, Di Giancamillo et al., 2008). Die Temperatur der Fixierung kann als zusätzliche Komponente Berücksichtigung finden (Jordan et al., 1998, Callies, 2012). In der Regel werden die Proben nach chemischer Fixierung dehydriert und in Paraffin eingebettet. Methacarn ist das derzeit bevorzugte Mittel für die chemische Fixierung des Mukus, da es gegenüber der herkömmlichen Fixierung mittels Carnoy (Chloroform, Ethanol, Eisessig) Ethanol durch Methanol ersetzt. Dadurch wird einer Proteinvernetzung und somit dem Kollabieren des Mukus entgegengewirkt (Johansson et al., 2011a). Die Ergebnisse von Methacarn-fixierten Proben sind mit in vivo-Messungen vom Mukus vergleichbar, allerdings muss darauf geachtet werden, dass der Darminhalt bei der Gewebeentnahme sowie der Gewebepräparation nicht entfernt wird (Johansson et al... 2011a). Die erstmalige Beschreibung der Fixierung durch Methacarn erfolgte 1970 (Puchtler et al., 1970).

In der Literatur finden auch Kombinationen von Fixierungen Anwendung. Dabei erfolgt z. B. nach der Gefrierfixierung durch Stickstoff die Stabilisierung der Proben in flüssigem Agar und anschließend eine Postfixierung in Carnoy (Pullan *et al.*, 1994).

Neben den genannten Fixierungen existieren Untersuchungen an unfixierten Proben. Dabei erfolgt eine direkte Färbung mit PAS. Die Proben werden anschließend unter einem invertierten Mikroskop ausgewertet (Kerss *et al.*, 1982).

#### 2.5.7 Schneiden der Gewebeproben

Nach der Probenfixierung erfolgt das Schneiden der Proben. Je nach Fixierung unterscheidet sich das methodische Vorgehen.

 Bei physikalischen Fixierungen, wie z. B. Gefrierfixierungen durch Stickstoff, werden die Proben im Kryostat geschnitten. Messer und Blockhalter befinden sich in einem ca. -20

- °C kaltem Raum. Nach dem Schneiden werden die Schnitte direkt auf einen Objektträger aufgezogen und anschließend dehydriert (Sakata und Engelhardt, 1981).
- 2. Bei chemischen Fixierungen werden die Proben in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke können an einem Mikrotom geschnitten werden. Dies wird in der Regel bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach dem Schneiden werden die Schnitte in ein Wasserbad verbracht, welches destilliertes Wasser enthält und eine Temperatur von 37-40 °C aufweist. Anschließend werden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und getrocknet (Callies, 2012).

Für beide Fixierungsmethoden wird eine geeignete Schnittdicke gewählt. Grundsätzlich gilt: je dicker der Schnitt, desto einfacher ist das Schneiden aber desto ungenauer die Messung, da histologische Strukturen schlechter charakterisiert werden können (Mulisch und Welsch, 2010). Gängige Schnittdicken bewegen sich beim Mikrotom zwischen 2-7 µm (Matsuo *et al.*, 1997, Bontempo *et al.*, 2006, Le Bon *et al.*, 2010, Callies, 2012) und beim Kryostat zwischen 5-20 µm (Ota und Katsuyama, 1992, Jordan *et al.*, 1998, Varum *et al.*, 2010).

## 2.5.8 Auswahl der Objektträger

Das Aufziehen der Schnitte erfolgt auf Objektträgern in verschiedenen ISO-normierten Ausführungen. Es existieren z. B. silanisierte und nicht-silanisierte Objektträger, wobei erstere durch freie Sialinsäuren eine bessere Bindung zum Gewebeschnitt eingehen können. Weitere Variationen ergeben sich aus der Beschichtung der Objektträger mit einer Celloidinlösung (Mulisch und Welsch, 2010), einer poly-L-Lysin Beschichtung (Matsuo et al., 1997) oder einer Albuminpräparation (Sakata und Engelhardt, 1981).

#### 2.5.9 Trocknung und weitere Behandlung der histologischen Schnitte

Gefrierschnitte können nach Aufziehen auf den Objektträger getrocknet werden. Dieser Schritt wird in der Literatur selten detailliert beschrieben. Vermutlich ist die häufigste Methode die Lufttrocknung (liboshi et al., 1994). Weitere Möglichkeiten bestehen in dem Betropfen des Objektträgers mit Aceton oder Methylalkohol (Sakata und Engelhardt, 1981), der Schnitttrocknung im Wärmeschrank bei 40 oder 60 °C (Mulisch und Welsch. 2010) oder die Trocknung auf einer Hitzeplatte (Rieger J. et al., 2016). Gefrierschnitte können nach der Trocknung zusätzlich chemisch nachfixiert werden (Irintscheff und Davidoff, 1981, Strehle, 2004. Frev et al., 2013). Eine direkte Färbung ohne Fixation ist bei Gefrierschnitten ebenfalls möglich (Mulisch und Welsch. 2010). Die Postfixation der Gefrierschnitte kann in flüssigen Medien wie 4%iger NBF-Lösung, 100%igem Ethanol (Jordan et al., 1998), Celloidinlösungen (liboshi et al., 1994) oder in gasförmigen Medien wie Paraformaldehyddampf (Sakata und Engelhardt, 1981, Jordan et al., 1998) erfolgen. Je nach verwendeter Postfixation ist eine Aufbewahrung der Schnitte vor der Färbung möglich oder eine unmittelbar daran anschließende Färbung notwendig. Die Kombination der Postfixationen von Ethanol und modifizierter Bouin-Lösung führt zum auten Erhalt von Becherzellen mit intakten Vesikeln die mit Mukus gefüllt sind (Rieger J. et al., 2016).

Bei chemisch fixierten Proben erfolgt nach Herstellung der Gewebeschnitte das Entparaffinieren. Es existieren hierfür Standardprotokolle (Mulisch und Welsch, 2010). Nach der Entparaffinierung erfolgt die Färbung.

#### 2.5.10 Färbung der histologischen Schnitte

Färbungen der Muzine können spezifisch über anti-MUC Antikörper erfolgen oder unspezifisch über bestimmte Komponenten des Muzins. Hierbei existiert eine Vielzahl von Färbungen, die zur Variation der gemessenen Mukusschicht führen kann (Jordan *et al.*, 1998, Varum *et al.*, 2010). Nachfolgend werden die für die vorliegenden Untersuchungen wichtigen Farbstoffe bzw. Techniken komprimiert beschrieben.

## Alcianblau (AB)

AB färbt saure Proteoglykane an. Dadurch ist eine Anfärbung des Proteingerüsts von MUC2 möglich (Mulisch und Welsch, 2010). So färbt AB bei pH 2,5 carboxylierte und sulfatierte Proteoglykane (Mowry und Winkler, 1956). Bei pH 1 sind carboxilierte Proteoglykane nicht mehr negativ geladen und somit können sulfatierte Proteoglykane selektiv angefärbt werden (LEV und SPICER, 1964).

## Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)

PAS färbt Strukturen mit hohem Kohlenhydratanteil und somit neutrale Muzine an (McManus, 1948). In einer Studie von Jordan *et al.* (1998) führte die Modifikation der verwendeten Postfixation des PAS-Färbeprotokolls zu einer Verdopplung der gemessenen Mukusschicht.

#### Lektine

Lektine sind kleine Peptide, die selektiv spezifische Kohlenhydratäste markieren (Mulisch und Welsch, 2010). Im Vergleich mit herkömmlichen Färbungen wie AB und PAS eignen sich Lektine ebenfalls zur Anfärbung der Mukusschicht (Ota und Katsuyama, 1992, Sakamoto *et al.*, 2000, Callies, 2012). Ein besserer Zugang zur Bindungsstelle für Lektine ist durch eine vorherige Behandlung mit Neuraminidase oder mit Enzymverdau erreichbar (Mulisch und Welsch, 2010). Das Potenzial auf dem Gebiet der Lektinfärbungen ist noch groß, insbesondere mit Blick auf die Charakterisierung der Glykolisierungen der Muzine (Callies, 2012).

Neben den aufgeführten Färbungen existieren weitere zur Differenzierung der Seitenketten der Muzine, mit High Iron Diamin-Alcianblau (Matsuo *et al.*, 1997, Bontempo *et al.*, 2006) sowie unspezifische Färbungen mittels Astrablau oder HE (Varum *et al.*, 2010).

Auch Kombinationsfärbungen mit AB-PAS (Swidsinski *et al.*, 2007, Callies, 2012) oder HE-PAS sind gängige Varianten und werden in wissenschaftlichen Untersuchungen angewendet.

## 2.5.11 Auswertung der Mukusschichtdicke

In der Regel erfolgt die Auswertung der Schleimdicke an zehn (Ota und Katsuyama, 1992, Jordan et al., 1998, Bontempo et al., 2006) bis zu 40 (Le Bon et al., 2010, Varum et al., 2010) Messpunkten. Dabei wird die Dicke des Schleims senkrecht zum Epithel gemessen (Callies, 2012). Eine andere Variante der Mukusdickenmessung, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wird, ist die Messung der Fläche der Mukusschicht, die durch die Länge des darunterliegenden Epithels dividiert wird. Hierbei wird die sezernierte Mukusschichtdicke berechnet. Dieses Verfahren ist aufwendiger aber vermutlich mathematisch präziser. Es existiert bereits ein vergleichbarer Ansatz, bei dem ein Verhältnis zwischen Mukus und Villusfläche gebildet wird (Sakamoto et al., 2000). Diese Methode

ergibt jedoch ein Verhältnis, kein Längenmaß und ist somit nicht für eine Mukusdickenmessung geeignet.

In der nachfolgenden Tabelle 4 werden Ergebnisse von Messungen der Mukusdicke im Verdauungstrakt verschiedener Spezies aus der Literatur zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 4:** Ergebnisse von Messungen der Mukusdicke im Verdauungstrakt verschiedener Spezies

Spezies	Mukusdicke Dünndarm <sup>1</sup> (µm)	Mukusdicke Dickdarm <sup>1</sup> (μm)	Fixierung der Proben	Quelle
Maus	/	Innere: 21±4 (K) Äußere: -	Methacarn	Wlodarska et al., (2015)
Ratte	Innere: 15±2 Äußere: 108±5 (J)	Innere: 116±51 Äußere: 714±109 (K)	Keine (in vivo- Messung)	Atuma <i>et al.</i> , (2001) <sup>2</sup>
Mensch	1	Innere: 7,0±3,7 Äußere: 34,4±8,9 (aK)	Carnoy (2 h)	Matsuo <i>et al.</i> , (1997)
	/	56±21	Carnoy (2 h)	Swidsinski <i>et al.</i> , (2007) <sup>3</sup>
	1	107±48	Keine	Pullan <i>et al.</i> , (1994)
Schwein	Innere: 2,9±0,09 Äußere: - (I)	/	4%Formalin- lösung (24h)	Bontempo <i>et al.</i> , (2006)
	Innere: 2,95 Äußere: - (I)	Innere: 1,54 Äußere: - (Z)	4%Formalin- lösung (24 h)	Di Giancamillo et al., (2008)
	Innere: 3,15±0,05 Äußere: -	/	Bouin (24 h)	Le Bon <i>et al.</i> , (2010)
	28,6±13,7 (J)	31,9±17,6 (aK)	Stickstoff	Varum <i>et al.</i> , (2010) <sup>4</sup>
	493 (J)	191±51,7 (K)	Carnoy (2 h)	Callies, (2012) <sup>5</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> J: Jejunum, K: Kolon, I: Ileum, aK: aszendierendes Kolon, Z: Zäkum

Die Vielzahl der angewandten Methoden zur Mukusdarstellung sowie die variierenden Ergebnisse der Mukusschichtdicke in den jeweiligen Studien verdeutlichen die Schwierigkeiten bei der Vergleichbarkeit dieser Messungen.

Hieraus lässt sich die Notwendigkeit einer standardisierten Methodik ableiten.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Die Tiere haben 18-24 h vor der Probenentnahme gefastet und erhielten Wasser *ad libitum* 

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Bei annährend der Hälfte aller Patienten (12 von 25) war kein Mukus zu finden

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Die Schweine wogen 100 kg (n=3), der Darm wurde gespült, es folgte eine HE F\u00e4rbung und ein deutlicher Substanzverlust beschrieben

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Die Tiere erhielten ein Laxanz vor der Probenentnahme (im Jejunum), nur wenige Proben erhielten messbaren Mukus

# 2.6 Rolle des Spurenelements Zink im Gastrointestinaltrakt

Dem Spurenelement Zink werden vielfältige Funktionen im Organismus zugeschrieben. Einerseits ist Zink ein unverzichtbares Ion für eine Vielzahl von Enzymen (Riordan, 1976). Andererseits hat Zink schützende Effekte auf die Zellmembran durch Verlagerung von redoxaktiven Metallen (Srivastava et al., 1995) oder durch Reduktion der Anzahl von E. coli, Clostridium spp., Lactobacillus spp. im Darm von Absetzferkeln (Hu et al., 2012, Pieper et al., 2012b, Hu et al., 2013, Starke, 2014).

Die empfohlene Konzentration von Zink im Futter ist von der Tierart, dem Alter des Tieres sowie von den Komponenten des Futtermittels abhängig. Das National Research Council empfiehlt bei Futter, das Phytat enthält, eine Konzentration von 80 mg Zn je kg Futter (NRC, 2012). Dies gilt bei der *ad libitum*-Fütterung von Absetzferkeln. Ein direkter Einfluss von Kalzium auf die Zinkresorption ist nicht nachgewiesen. Vielmehr spielen Komplexierungen mit Kalzium und Phytinsäure eine Rolle (Larsen und Sandstrom, 1993).

Aufgrund der Umweltbelastung, die durch den Eintrag zinkhaltiger Gülle entstehen kann (Weber, 2012), hat die Europäische Union seit 2003 eine maximale Dosis von 150 mg Zn je kg Futter mit 88 % Trockensubstanz beim Schwein vorgesehen (EU, 2003a).

Die wirtschaftlichen Verluste durch Diarrhoen bei Absetzferkeln sind weltweit von großer Bedeutung für die Ferkelproduktion. Einer der Hauptursachen dafür sind enteropathogene *E. coli* (Sojka *et al.*, 1960, Fairbrother *et al.*, 2005, Hu *et al.*, 2013). Seit dem Verbot der EU im Jahr 2006, antibiotische Leistungsförderer als Futtermittelzusatzstoff zu verwenden (EU, 2003b), wird nach Alternativen gesucht, um Diarrhoe bei Absetzferkeln zu bekämpfen. Die Versorgung von Absetzferkeln mit hohen Mengen an Zink ist dabei weltweit eine der favorisierten Methoden, in der Europäischen Union allerdings als Futtermittelzusatzstoff nicht zulässig. In einigen Ländern gibt es davon abweichende Regeln.

Zink erweist sich als gesundheitsstabilisierend und leistungsfördernd (Zentek et al., 2007). Es ist eines der wichtigsten Spurenelemente im Säugetier (Schroeder et al., 1967), besitzt über 300 Co-Enzymfunktionen und hat Einfluss auf Transkriptions- und Translationsebenen in der Zelle (Zentek et al., 2007).

Die nachfolgende Tabelle 5 fasst einige der vielfältigen Einflüsse von Zinksupplementen zusammen.

**Tabelle 5:** Effekte der Fütterung hoher Dosen Zink auf Ferkel nach dem Absetzen <sup>1</sup>

Parameter	Effekt	verfütterte Zinkkonzentration (mg ZnO/kg Futter)	Quelle
Wachstumsrate	Erhöhte Futteraufnahme, erhöhtes Wachstum <sup>2</sup>	2425; 2500; 3000; 100; 2000; 3000	Carlson et al., (1999), Mavromichalis et al., (2000), Hu et al., (2013), Martin et al., (2013a), Martin et al., (2013b)
	Reduzierte Durchfallraten beim Absetzen	3200; 2000	Holm, (1990), Hu <i>et al.</i> , (2013)
	Abnahme der jejunalen Transporter für Zn-Aufnahme (ZIP4)  Zunahme der jejunalen Transporter für Zn-Abgabe (ZnT1)  Zunahme der Zn Konzentration in der Ingesta im Jejunum  Zunahme von Metallotheonein im Jejunum <sup>3</sup>	2425; 2500	Martin <i>et al.</i> , (2013a), Martin <i>et al.</i> , (2013b)
Zink-Homöostase	Anstieg der Zinkausscheidung über Urin und Faeces	3000	Case und Carlson, (2002)
	Anstieg der Zinkkonzentration in Leber, Niere, Milz, Pankreas, Knochen und Serum	2500; 2500; 3000	Jensen-Waern <i>et al.</i> , (1998), Case und Carlson, (2002), Martin <i>et al.</i> , (2013b)
	Zunahme der Villuslänge sowie Steigerung des Verhältnis Villuslänge:Kryptentiefe nach dem Absetzen <sup>4</sup>	3000; 2000	Li et al., (2001), Hu et al., (2012)
Darmmorphologie	Zunahme der Schleimhautdicke im Dünndarm	3000	Li et al., (2001)
	Zunahme der Fläche an Becherzellen mit neutralen und sauren Muzinen im Dickdarm	2500	Hedemann et al., (2006)

	Reduktion der Bakterien im Mesenteriallymphknoten	3000	Huang <i>et al.</i> , (1999)
	Erhöhung der Diversität der coliformen mikrobiellen Besiedlung im Darm	2500	Katouli <i>et al.</i> , (1999)
	Ileale Erhöhung von: Weissella spp., Leuconostoc spp., Streptococcus spp. Ileale Verringerung von: Sarcina spp., Neisseria spp.	3000	Vahjen <i>et al.</i> , (2010)
Effekte auf die intestinale	Reduktion der Laktobazillen im Darm, kurzfristige Reduktion der Enterobakterien Reduktion bakterieller Metabolite im Darm	2425	Starke, (2014)
Mikrobiota	Reduktion von Anaerobiern im Ileum Anstieg der Coliformen in Kolon und Caecum Anstieg der Enterokokken im gesamten Darm	2500	Højberg <i>et al.</i> , (2005)
	Reduktion von <i>Clostridium</i> spp. im Darm	2500; 2000	Pieper et al., (2012b), Hu et al., (2013)
	Steigerung multi-resistenter <i>E. coli</i> im Darm	2500	Bednorz et al., (2013)
	Reduktion von <i>E. coli</i> <sup>5</sup> im Darm	2000	Hu et al., (2012), Hu et al., (2013)
	Abnahme der Expression der mRNA von IFN-γ, TNF-α im Jejunum Zunahme der Expression der mRNA von TGF-β und IL-10 im Jejunum	2000	Hu et al., (2013)
Immunantwort	Abnahme der relativen Häufigkeit der γδ T-Zellen im Darm Niedrigere Expression von β-Defensin 3 <sup>6</sup>	2425	Liu et al., (2014a)
	Abnahme der relativen Häufigkeit der CD8 <sup>+</sup> γδ Zellen im Darmepithel	2425	Liu <i>et al.</i> , (2014b)
	Darmopiaro.		

	Reduktion des Plasma-D-Laktats und der Aktivität der Diaminoxidase (bedeutet parazelluläre Permeabilität sinkt)	2000	Hu et al., (2012)
Physical sector	Höhere Aktivität bestimmter Enzyme im Pankreas <sup>7</sup>	Pankreas <sup>7</sup> 2500 Hedemann <i>et al.</i>	Hedemann et al., (2006)
Physiologie	Erhöhung der Aktivität der intestinalen alkalischen Phosphatase	2500	Martin <i>et al.</i> , (2013b)
	Abnahme der parazellulären Permeabilität	2000	Hu <i>et al.</i> , (2013)

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> modifiziert nach Liu (2014)

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Eine Studie zeigte keine Effekte auf die durchschnittliche Tageszunahme (Li *et al.*, 2001)

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Der mRNA und des Proteins

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Andere Studien zeigten keine Effekte (Mavromichalis *et al.*, 2000, Hedemann *et al.*, 2006, Liu *et al.*, 2014a)

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> E. coli Reduktion war in einer anderen Studie nicht nachweisbar (Jensen-Waern *et al.*, 1998)

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup>Jedoch nur bei 2425 mg Zn je kg Futter, die mittlere Zinkdosis (164 mg Zn je kg Futter) führte zur maximalen Expression

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup>Der Amylase, der Carboxypeptidase A, des Chymotrypsin, des Trypsin, und der Lipase

# 2.7 Fazit

Die Tierproduktion hat sich wachsenden gesundheitlichen Anforderungen zu stellen. Dabei spielt die Tiergesundheitsvorsorge über eine optimierte Ernährung eine zentrale Rolle. Zur Prophylaxe von Durchfallerkrankungen bei Absatzferkeln wird auch die vorsorgende Verwendung von Futtermittelzusatzstoffen untersucht, zu denen das Spurenelement Zink gehört.

Zink besitzt nachweislich vielfältige Funktionen im Organismus, wobei deren Mechanismen häufig nur unzureichend geklärt sind. Die Fütterung bedarfsüberschreitender Mengen dieses Spurenelements hat durch seine positiven Effekte auf Körpermassenzunahmen bei Absetzferkeln und seine antidiarrhoischen Effekte als Futtermittelzusatzstoff Interesse sowohl auf Seiten der Forschung als auch der Wirtschaft geweckt. Jedoch werden auch negative Auswirkungen auf die Mikrobiota im Darm von Ferkeln beobachtet.

Es ist durchaus denkbar, dass Zink direkt und indirekt Einfluss auf die Menge oder Zusammensetzung von intestinalen Mukus nimmt.

In den letzten Jahrzehnten ist die Erforschung des Mukus im Verdauungsapparat in den Fokus medizinischer Betrachtungen gerückt. Hierbei ist ein deutlicher Mangel an definierten Untersuchungsprotokollen und verlässlichen Messdaten für das Schwein zu verzeichnen.

Bis heute stellt die histologische Darstellung der Mukusschicht arbeitstechnisch eine Herausforderung dar. *In vivo*-Untersuchungen des Mukus von Nagern ergaben auswertbare und aussagekräftige Ergebnisse. Jedoch sind sowohl die Materialkosten als auch der technische Aufwand vergleichsweise hoch. *Ex vivo*-Untersuchungen zum Mukus lieferten allerdings über viele Jahre nur unzureichende Ergebnisse. Die Verwendung der Methacarnfixierung bietet hierbei eine relativ erfolgreiche Methode. Daneben existieren jedoch auch andere vielversprechende Fixierungen. Unabhängig von der Auswahl der Fixierung sind weitere histologische Arbeitsschritte sowie der Umgang mit dem Ausgangsmaterial entscheidend für den Erhalt des Mukus und damit für dessen Darstellung.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Etablierung einer geeigneten Methode zur Darstellung der Mukusschicht beim Schwein. Dazu wurden an ausgewählten histologischen Arbeitsschritten verschiedene Methoden miteinander vergleichend betrachtet.

Darüber hinaus war es das Ziel, den Zusammenhang unterschiedlicher Zinkaufnahmen auf die Mukusschichtdicke sowie weitere morphologische und molekularbiologische Parameter zu untersuchen.

# 3. Kapitel III: Material und Methoden

# 3.1 Versuchsplan, Tiere und Haltung

Für die vorliegenden Untersuchungen (Anzeigenummer: A 0100/13) wurden Proben von Absetzferkeln verwendet, die Teil einer Fütterungsstudie des Instituts für Tierernährung an der Freien Universität Berlin waren. Die jeweils acht früh abgesetzten Aufzuchtferkel (vier Börge, vier weibliche Tiere) wurden gleichmäßig auf drei Versuchsgruppen mit und ohne Zulage von Zinkoxid in unterschiedlichen Dosierungen aufgeteilt. Details des Versuchsplanes sind in Tabelle 6 ausgewiesen.

Tabelle 6: Charakterisierung der Versuchsgruppen

Versuchsgruppe	Α	В	С
Versuchstiere (n)	8 (4 ♂; 4 ♀)	8 (4 ♂; 4 ♀)	8 (4 ♂; 4 ♀)
Zinkoxid 75%ig (mg/kg Futter)	0	133	1330

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 24 gesunde, früh abgesetzte Ferkel (DANZucht x Piétrain) im Alter vom 25. bis 38. Lebenstag, davon 12 Tiere weiblich und 12 Börge. Die Säugeperiode betrug im Mittel 25 Tage (24 bis 28 Tage). Während der Säugeperiode wurde den Ferkeln kein Ergänzungsfuttermittel angeboten. Die Tiere stammten aus einem Zuchtbetrieb in Brandenburg. Nach dem Absetzen wurden die Ferkel in zwei klimatisierte Ferkelaufzuchtställe gleicher Bauart (Vollspalten-Flatdeck, Grundfläche: 3,4 m²) eingestallt und auf die einzelnen Versuchsgruppen unter Berücksichtigung der Geschlechterverteilung mit je zwei Ferkeln je Einzelbucht zufällig verteilt. Die Flatdecks waren mit je einer Schalentränke und einem Breifutterautomaten (B-Breifutterautomat, Siepmann GmbH, Herdecke, Deutschland) ausgestattet. Außerdem wurde Beschäftigungsmaterial in Form von Plastikbällen und Spielketten angeboten. Die Einzelbuchten waren durch Kunststoffscheiben getrennt, sodass ein Sicht- aber kein direkter Kontakt zu anderen Gruppen möglich war. Die Stalltemperatur lag über dem gesamten Versuchszeitraum bei 28 °C. Die relative Luftfeuchte lag im Mittel bei ca. 58 %. Die Lüftung wurde auf 0,6 m/s gehalten. Das Beleuchtungsprogramm gewährleistete 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit.

# 3.2 Fütterung der Versuchstiere und Futterzusammensetzung

Die Aufzuchtperiode betrug zwei Wochen. Hierbei wurden ein Alleinfuttermittel sowie Wasser ad libitum angeboten. Die Basismischung orientierte sich an den Bedarfsempfehlungen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE, 2006). Die Zusammensetzung einschließlich der Energie- und Nährstoffgehalte des Futters sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Basismischung wurde in Gänze hergestellt und anschließend in die jeweiligen Partien zu je 100 kg aufgeteilt. Diesen wurde in Gruppe A kein Zinkoxid, in Gruppe B 133 mg/kg Zinkoxid 75% ig und in Gruppe C 1330 mg/kg Zinkoxid 75% ig im Austausch mit Sipernat (hochreines Siliziumdioxid) zugemischt. Der als Kontrolle vorgesehenen Partie (Gruppe A) wurde als Gewichtsäguivalent ausschließlich Sipernat zugemischt. Die Herstellung Versuchsmischungen erfolgte im institutseigenen Mischfutterbetrieb (Anerkennungsnummer: αDE-BE-100001; Registriernummer DE-BE-100001). Der Basismischung wurden mit Ausnahme der zu prüfenden Produkte sowie der Aminosäuren, Spurenelemente und Vitamine keine weiteren Futtermittelzusatzstoffe zugesetzt.

**Tabelle 7:** Berechnete Rationszusammensetzung und Inhaltsstoffe der Basismischung des Futters (Alleinfutter für Aufzuchtferkel: 25. bis 38. Lebenstag)

Zusammensetzung	Menge (g/kg)
Optigrain <sup>1</sup>	266
Sojaextraktionsschrot (44 % Rp)	190
Gerstenschrot	170
Weizenschrot	145
Mais	97,0
Sprühmagermilchpulver	70,0
Kohlensaurer Futterkalk	14,0
MineralstVitVormischung ohne Zn <sup>2</sup>	12,0
Sojaöl	12,0
Monocalciumphosphat	10,5
Titandioxid	4,50
L-Lysin HCI	3,20
DL-Methionin	2,20
L-Threonin	1,90
Sipernat	1.33 – 0
Zinkformulierungen	0 - 1.33
Inhaltsstoffe	Berechneter Gehalt (g/kg)
ME <sup>3</sup>	13,3 (MJ/kg)
Rohprotein	194
Lysin	12,5
Methionin	5,40
Methionin + Cystin	7,50
Threonin	8,20
Tryptophan	2,50
Rohfaser	30,3
Rohfett	31,6
Rohasche	55,0
Calcium	8,80
Phosphor	6,60
Natrium	2,20

Gereinigtes und hydrothermisch behandeltes Getreidegemisch: 50 % Weizen, 25 % Gerste, 25 % Mais

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Gehalte je kg Prämix: 400.000 IE Vit. A; 120.000 IE Vit. D<sub>3</sub>; 8000 mg Vit. E (α-Tocopherolacetat); 300 mg Vit. K<sub>3</sub>; 250 mg Vit. B<sub>1</sub>; 250 mg Vit. B<sub>2</sub>; 2500 mg Nicotinsäure; 400 mg Vit. B<sub>6</sub>; 2000 μg Vit. B<sub>12</sub>; 25000 μg Biotin; 1000 mg Pantothensäure; 100 mg Folsäure; 80000 mg Cholinchlorid; 2000 mg Fe (Eisen-II-carbonat); 6000 mg Mn (Mangan-II-oxid); 1200 mg Cu (Kupfer-II-sulfat, Pentahydrat); 45 mg J (Calciumjodat, wasserfrei); 30 mg Co (Kobalt-(II)-sulfat, Heptahydrat); 35 mg Se (Natriumselenit); 130 g Na (Natriumchlorid); 55 g Mg (Magnesiumoxid)

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Berechnet nach Empfehlungen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE, 2008)

# 3.3 Futtermitteluntersuchung

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Futtermittel wurden auf ihre Rohnährstoff- und Mineralstoffgehalte sowie die Säurebindungskapazität analysiert. Zur Bestimmung der Rohnährstoffe wurde die Weender-Analyse verwendet (Naumann *et al.*, 2004). In Tabelle 9 sind die für die Futtermitteluntersuchungen eingesetzten Geräte und Chemikalien aufgeführt. Die Futtermitteluntersuchungen erfolgten im Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin im Rahmen des Hauptversuchs.

#### 3.3.1 Weender Analyse

#### Trockensubstanz (TS)

Die Bestimmung des TS-Gehaltes des Futters erfolgte durch Einwaage im Porzellantiegel und Trocknung im Trockenschrank bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz. Nach Abkühlung im Exsikkator auf Zimmertemperatur wurden die Proben anschließend erneut gewogen und der resultierende Trockensubstanzgehalt berechnet.

## Rohasche (Ra)

Für die Bestimmung des Ra-Gehaltes wurden die Proben für neun Stunden im Muffelofen bei 600 °C verascht und nach dem Abkühlen im Exsikkator gewogen.

#### Rohprotein (Rp)

Für die Bestimmung des Rp-Gehaltes erfolgte eine Messung des Stickstoffgehaltes des Futters unter Verwendung eines Makro-Elementaranalysators.

#### Rohfett (Rfe)

Zur Rohfettanalyse wurde die Methode nach Naumann et al. (2004) modifiziert. Hierbei wurde auf den Säureaufschluss verzichtet. Die Extraktion des Fettes erfolgte mit Petrolether für sechs Stunden nach Soxhlet. Im Anschluss erfolgt die Trocknung bei 80 °C im Trockenschrank für eine Stunde. Nach der Abkühlung wurde der Rfe-Gehalt anhand der Gewichtsbestimmung des Probengefäßes mit und ohne Rohfett im Futter rechnerisch bestimmt.

#### Rohfaser (Rfa)

Die Ermittlung des Rfa-Gehaltes erfolgte mit Hilfe eines Rohfaseranalysators. Die Proben wurden zunächst in 1,25%iger Schwefelsäure gekocht, nach dem Absaugen der flüssigen Phase mit 1,25%iger Natronlauge versetzt und anschließend mit heißem destilliertem Wasser gespült. Daraus folgte die Entnahme der Glasfiltertiegel aus dem Rohfaseranalysator. Diese wurden drei Minuten in Azeton geschwenkt und anschießend bei 105 °C im Trockenschrank getrocknet. Nach Gewichtsbestimmung erfolgte das Veraschen im Muffelofen bei 500 °C. Der Rohfasergehalt errechnete sich aus der Differenz der Rohasche und des Inhalts der Glasfiltertiegel.

#### Stickstofffreie Extraktstoffe (NfE)

Der Gehalt an NfE wurde nach der Formel NfE = TS - (Ra + Rp+ Rfa + Rfe) bestimmt.

#### 3.3.2 Stärke

Der Stärkegehalt erfolgte mittels enzymatischen UV-Tests. Das Testprinzip basiert auf der enzymatischen Spaltung von Stärke zu D-Glukose. Durch weitere enzymatische Umwandlungen der D-Glukose entsteht NADPH. Dieses ist als Messgröße der durch Hydrolyse der Stärke gebildeten Menge an D-Glukose proportional. Die Messung von NADPH erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm.

# 3.3.3 Mineralstoffbestimmung

Zur Bestimmung der Mineralstoffgehalte wurden die Futterproben bei 600 °C im Muffelofen verascht und mit 6 ml Salzsäure (37-38%ig) sowie 20 ml destilliertem Wasser versetzt. Die Proben wurden dann für 50 Minuten bei 200 °C im Sandbad erhitzt. Nach Filtrierung durch einen Faltenfilter wurden sie mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Die Gehalte an Kalzium, Natrium und Zink wurden mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt. Zur Bestimmung des Phosphorgehaltes wurden 500 µl der Aschelösung in 5 ml einer Salpetersäurelösung (134 ml, w = 65 %) und den P-Komplexbildnern Ammoniumvanadat (200 ml) und Ammoniummolybdat (200 ml) vermischt und anschließend auf 20 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Phosphor reagiert im salpetersaurem Milieu mit einem gelben Farbkomplex, dessen Extinktion photometrisch bei einer Wellenlänge von 436 nm gemessen wurde. Der Phosphorgehalt wurde anschließend unter Verwendung einer Eichkurve bestimmt.

#### 3.3.4 Säurebindungskapazität

Zur Bestimmung der Säurebindungskapazität wurden 10 g der Futterproben mit 90 ml destilliertem Wasser versetzt. Nach Bestimmung des pH-Werts wurde die Suspension durch die Zugabe von Salzsäure (1 mol/l) auf den pH-Wert 3 eingestellt. Die hinzugegebene Menge (ml) der Salzsäure wurde mit 100 multipliziert. Hieraus berechnete sich die Säurebindungskapazität und wurde als Milliäquivalente (mEq) pro kg Futter angegeben.

Die analysierten Daten der Futterproben sind Tabelle 8 zu entnehmen.

### 3.3.5 Ergebnisse der Futtermittelzusammensetzung

Die Daten der Futtermitteluntersuchungen entsprachen den berechneten Mengen. Die Ergebnisse sind der nachfolgenden Tabelle 8 zu entnehmen.

Die verwendeten Geräte der Untersuchungen sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 8: Analysierte Nährstoffgehalte (g/kg) im Alleinfutter der Absetzferkel

Gruppe	Α	В	С
Trockenmasse	925	927	930
Rohprotein	207	205	207
Rohfaser	32,7	33,0	32,8
Rohfett	31,8	31,5	32,0
Rohasche	55,6	63,3	62,1
Stärke	325	327	330
Gesamtzucker	46,6	47,5	49,6
Calcium	8,90	9,00	8,80
Phosphor	6,50	6,60	6,70
Natrium	2,20	2,00	2,10
Zink	46,7	96,4	1090

Tabelle 9: Für die Futtermitteluntersuchungen eingesetzte Geräte und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
G	eräte
Analysewaage: Typ Genius	Genius Sartorius AG Göttingen, Deutschland
Atomabsorptionsspektrometer vario 6	Analytik Jena GmbH Jena, Deutschland
Exsikkator: Typ Novus NS 24/29	Schott/Duran Mainz, Deutschland
Heraeus® Trockenschrank T5042	Heraeus Electronic Hanau, Deutschland
Makro-Elemetaranalysator: vario max CN	Elementar Analysesystem GmbH Hanau, Deutschland
Muffelofen: Heraeus®Thermicon®P	Thermo Scientific Karlsruhe, Deutschland
Photometer: Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech Freiburg, Deutschland
Rohfaser-Analysator: Ankom <sup>2000</sup> Fibre Analyser	Ankom Technology Macedon, USA
Cher	nikalien
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat	Carl Roth GmbH&Co.KG Karlsruhe, Deutschland
Ammoniummonovanadat	Merck, KGaA Darmstadt, Deutschland
Natronlauge	Carl Roth GmbH&Co.KG Karlsruhe, Deutschland
Petroleumbenzin, reinst.	Merck, KGaA Darmstadt, Deutschland
Salpetersäure (65 %)	Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (37-38 %)	J.T.Baker Griesheim, Deutschland
Schwefelsäure (95-97 %)	J.T.Baker Griesheim, Deutschland

# 3.4 Leistungsparameter der Versuchstiere

Die Aufzuchtferkel wurden zu Versuchsbeginn und anschließend wöchentlich buchtenweise gewogen (DE Plattformwaage 36K10N, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland) und hieraus die durchschnittliche Lebendmasseentwicklung je Tier berechnet. Gesundheitszustand wurde täglich anhand der Ferkel klinischer Parameter (Allgemeinbefinden, Entwicklungs-, Ernährungs-, und Pflegezustand, Körperhaltung, Verhalten und Kotkonsistenz) überwacht. Die Dokumentation der um die Futterverluste korrigierten Futteraufnahme je Tier und Bucht erfolgte ebenfalls auf der Grundlage der je Bucht eingestallten Tiere. Für die Berechnung des Futteraufwandes wurde die je Tier und Bucht gemittelte Futteraufnahme und Zunahme herangezogen. Die Erfassung und Bearbeitung dieser Daten erfolgten im Rahmen des Hauptversuchs durch Mitarbeit des Instituts für Tierernährung der Freien Universität Berlin. Die Daten sind in Tabelle 10 komprimiert dargestellt.

Tabelle 10: Effekte unterschiedlicher Zinkverbindungen auf die zootechnischen Leistungen der Absetzferkel

Versuchsgruppe	Α	В	С
Versuchstiere (n) <sup>1</sup>	10 (5 ♂; 5 ♀)	10 (5 ♂; 5 ♀)	10 (5 ♂; 5 ♀)
Zinkoxid 75%ig (mg/kg)	0	133	1330
1. Versuchswoche (25 31. Lebenstag) Lebendmasse			
- Beginn (kg)	6,75 ± 1,09	6,74 ± 0,38	6,76 ± 0,38
- Ende (kg)	7,59 ± 1,17	7,75 ± 0,83	7,87 ± 0,64
Lebendmassezunahme (kg)	0,84 ± 0,27	1,01 ± 0,58	1,11 ± 0,40
Futterverzehr (kg)	1,25 ± 0,30	1,34 ± 0,78	1,37 ± 0,42
Futteraufwand <sup>2</sup>	1,52 ± 0,15	1,33 ± 0,05	1,27 ± 0,14
2. Versuchswoche <sup>3</sup> (32 38. Lebenstag) Lebendmasse			
- Beginn (kg)	7,59 ± 1,17	$7,75 \pm 0,83$	7,87 ± 0,64
- Ende (kg)	8,88 ± 1,14	9,56 ± 0,69	9,47 ± 0,56
Lebendmassezunahme (kg)	1,28 ± 0,22	1,81 ± 0,33	1,60 ± 0,22
Futterverzehr (kg)	1,80 ± 0,23	2,38 ± 0,37	1,92 ± 0,23
Futteraufwand <sup>2</sup>	1,42 ± 0,15	1,32 ± 0,05	1,20 ± 0,05

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Pro Gruppe wurden für diese Arbeit nur acht von zehn Tieren verwendet

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> kg Futter je kg Zunahme

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Werte auf 38 Lebenstage korrigiert

## 3.5 Sektionsgang und Probenentnahme

Zur Tötung wurden die Ferkel mit Ketaminhydrochlorid (Ursotamin®, 10%ig, Serumwerk Bernburg Ag, Deutschland) und Azaperon (Stresnil®, Jansen- Cilag, Neuss, Deutschland) intramuskulär (0,25 ml/ 0,05 ml pro kg KM) tief narkotisiert. Im Anschluss erfolgte die intrakardiale Gabe eines Kombinationspräparates bestehend aus Tetracainhydrochlorid, Mebezoniumiodid und Embutramid (T61®, Intervet, Unterschleißheim, Deutschland). Direkt nach Eintreten des Todes wurde die Bauchhöhle eröffnet und das gesamte Darmkonvolut vorsichtig entnommen. Der Darm wurde zügig von seiner Aufhängung am Mesenterium gelöst und Probenmaterial vom mittleren Jejunum und aszendierenden Kolon entnommen. Aufgrund der hohen Labilität des Mukus wurden mechanische Manipulationen des Probenmaterials vermieden bzw. auf ein Minimum reduziert. Für die vorliegende Arbeit wurden jeweils drei Proben vom mittleren Jejunum und vom mittleren Teil des aszendierenden Kolons genommen. Davon wurden jeweils eine Probe von Jejunum und Kolon für die Bestimmung der mRNA-Expression mittels PCR, jeweils eine für die histologischen Gefrierfixierungen sowie eine für die histologisch-chemischen Fixierungen verwendet.

## Molekularbiologische Untersuchung

Für die molekularbiologische Untersuchung mittels PCR erfolgte eine Probenentnahme von ca. 5 cm Größe des Jejunums und des Kolons. Die Proben wurden in kaltem NaCl gespült, anschließend in Alufolie eingewickelt und beschriftet. Diese wurden dann umgehend durch Überführung in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Lagerung des Probenmaterials erfolgte bei -80 °C bis zur Weiterverwendung.

## Histologische Gefrierfixierung

Für die Gefrierfixierung wurde je eine Proben des Jejunums und des Kolons von ca. 5 cm entnommen. Das Probenmaterial wurde nicht gespült. Die Proben wurden auf vorgefaltete Alufolie abgelegt. Danach folgte eine großzügige Gabe von TissueTek® (O.C.T.™ Compound, Sakura Finetek, Staufen, Deutschland) um die Serosa herum. Dadurch wurde eine höhere Stabilität des zu schneidenden Probenmaterials erreicht. Anschließend erfolgte das Einfrieren der Proben mittels flüssigem Stickstoff (Gefrierfixierung). Die gefrorenen Proben wurden bei -80 °C bis zur Weiterverwendung gelagert.

## Histologisch-chemische Fixierung

Für die chemische Fixierung wurden Proben von ca. 8 cm des Jejunums und des Kolons entnommen. Es folgte keine Spülung der Proben. Anschließend wurden die Proben mittels langer scharfer Klinge (Trimming Klingen 130 mm, FEATHER®, Osaka, Japan) halbiert. Eine Hälfte wurde direkt als geschlossenes Darmrohr für zwei Stunden in 4 °C kaltes Methacarn gelegt. Anschießend erfolgte eine Entwässerung und Einbettung in Paraffin (Paraplast®, Leica, Wetzlar, Deutschland), die in den nachfolgenden Kapiteln näher erläutert wird. Die andere Hälfte wurde für die Erprobung folgender Fixierungsprotokolle verwendet:

- Injektion von Methacarn in ein geschlossenes Darmrohr
- Antimesenteriale Eröffnung des Darms und Fixierung auf einer Korkplatte
- Verwendung unterschiedlicher Fixierungsdauern von Methacarn
- Verwendung unterschiedlicher Fixierungslösungen

## 3.6 Histologische Untersuchungen

Die histologische Darstellung der Mukusschicht stellt einen Schwerpunkt in der vorliegenden Arbeit dar. Das Ziel war hierfür die Etablierung eines Fixierungs- und Färbeprotokolls zur Darstellung des intestinalen Mukus. Daher steht eine detaillierte Beschreibung der erfolgversprechendsten Methoden im Vordergrund. Weitergehende Informationen sind den Protokollen im Kapitel 7 zu entnehmen. Die Auswahl der Fixierung des Probenmaterials sowie der Färbung der histologischen Schnitte stellen grundlegende Schritte nach der Probenentnahme dar und haben einen maßgeblichen Einfluss auf das weitere Vorgehen sowie auf den Erfolg des Mukuserhalts. Unabhängig von der Fixierung und der Färbung ist ein vorsichtiges Arbeiten notwendig. Sowohl mechanische als auch chemische Belastungen sind auf ein Minimum zu reduzieren. Dies ist die Voraussetzung für eine Darstellung des Mukus. Die Gründe sind neben schnellen Autolyseprozessen post mortem die Wasserlöslichkeit und die geringe Stabilität des Mukus.

Für die Erarbeitung des histologischen Protokolls zur Mukusdarstellung, wurden für jeden Protokollvergleich zehn von vierundzwanzig Tiere zufällig ausgewählt. Dabei wurde sowohl auf eine gleichmäßige Verteilung des Geschlechts als auch der Fütterungsgruppe geachtet.

# 3.6.1 Gefrierfixierung des Probenmaterials sowie anschließende histologische Schritte

#### Probenentnahme und Lagerung

Die Probenentnahme von Jejunum und Kolon erfolgte zügig und vorsichtig. Proben von Kolon und Jejunum wurden jeweils in vorgefaltete und beschriftete Alufolien gelegt und mit TissueTek® (O.C.T.™ Compound, Sakura Finetek, Staufen, Deutschland) großzügig benetzt.

#### Folgende Varianten wurden geprüft:

- Serosales Benetzen mittels TissueTek
- Serosales Benetzen sowie luminale Injektion mittels Kanüle von TissueTek

Anschließend wurde die Alufolie verschlossen. Dabei wurde möglichst kein Druck auf das Gewebe ausgeführt, um physikalisches Einwirken zu verhindern. Es wurden Öffnungen ausreichender Größe in der Alufolie gelassen, um das Eindringen des flüssigen Stickstoffs zum Probenmaterial zu ermöglichen und um das Entstehen einer Lufthülle und damit das Leidenfrost'sche Phänomen zu verhindern (siehe <u>Kapitel 2.5.6</u>). Die Proben wurden nach einigen Minuten Gefrieren in einen -80 °C-Gefrierschrank umgelagert und dort bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt.

#### Schneiden der Proben

Einen Tag vor dem Schneiden der Proben erfolgte die Umlagerung von -80 °C auf -20 °C. Diese Temperatur entsprach etwa der Innentemperatur des Kryostaten. So wurde das Zersplittern der Proben aufgrund starker Temperaturdifferenzen zwischen Proben und Kryostat verhindert. Der Kryostat (Microm HM 560 M, Thermo Fisher, Waltham, USA) wurde auf eine Blocktemperatur von -18 °C und eine Messertemperatur von -16 °C eingestellt. Es wurden Schnittdicken von 5, 10 und 20 µm ausprobiert. Teilweise war im Kolon trotz Verwendung eines Streckblättchens ein Zusammenschieben der Gefrierschnitte nicht zu verhindern. Dieser Effekt wurde durch optimale Einstellung des Streckblättchens minimiert.

Sofern weiterhin Schnitte zusammengeschoben wurden, wurde mit einem Pinsel der Schnitt vorsichtig gestreckt. Dabei wurde der Pinsel an die Serosa angesetzt und ein leichter Zug ausgeübt. Bei einer zu starken Belastung des Schnittes durch den Pinsel besteht das Risiko einer Verschiebung der Schichtung von Schleimhaut-Mukus-Kot.

### Auswahl der Objektträger

Es wurden verschiedene silanisierte (silanisiert, Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) und nicht-silanisierte (Roth, Karlsruhe, Deutschland) Objektträger geprüft. Probeweise erfolgte eine anschließende Celloidinbeschichtung des Gefrierschnittes (siehe Protokoll 4 im Kapitel 7.1.1) auf nicht-silanisierten Objektträgern (Roth, Karlsruhe, Deutschland), um deren stabilisierende Wirkung z. B. vor physikalischen Einflüssen zu prüfen. Daneben wurde ein anschließendes Lösen des Celloidins untersucht.

## Trocknung der Gefrierschnitte

Anschließend wurden die Gefrierschnitte mittels angewärmtem Objektträger (50 und 80 °C) durch schnelles Aufsetzen auf den Schnitt aufgezogen und auf eine Trockenplatte (Type 13801, Medac, Wedel, Deutschland) gelegt. Der Schnitt zeigte nach oben. Pro Objektträger wurden 2-3 Schnitte aufgezogen. Die Objektträger lagerten anschießend mindestens 30 min auf der Hitzeplatte bei 50 oder 80 °C.

#### Postfixation der getrockneten Gefrierschnitte

Es wurden folgende drei Postfixationen vergleichend betrachtet:

- 4%iges neutral gepuffertes Formalin (4%NBF)
- 4%NBF ist eine wässrige Fixation mit Formalin. Diese ist eine gebräuchliche Fixationslösung in der Histologie. Nach dieser Fixation ist eine unmittelbare Färbung im Anschluss notwendig. Die Fixation mit 4%NBF erfolgte nach dem Protokoll 1 im Kapitel 7.1.1.
- 100%iges Ethanol (Ethanol)

Absolutes Ethanol enthält so gut wie keinen wässrigen Anteil. Ziel war eine Lösung des Mukus zu verhindern. Zusätzlich wurde das Ethanol auf -80 °C vorgekühlt. Die Fixation mit Ethanol erfolgte nach Protokoll 2 im Kapitel 7.1.1.

### - Paraformaldehyddampf (PFA)

PFA ist ein Feststoff, der vor allem bei Erwärmung in Dampf übergeht. Ziel war mit dieser Fixation keine physikalische Belastung durch eine wässrige Phase auf den Mukus, wie etwa bei der Verwendung einer flüssigen Fixation, zu erzeugen. Die Fixation mit PFA erfolgte Protokoll 3 im Kapitel 7.1.1.

### Weitere Postfixationen bzw. Vorgehensweisen

Neben diesen Postfixationen wurden probeweise weitere Fixationen geprüft, jedoch aufgrund des mangelnden Erfolgs hinsichtlich des Mukuserhaltes nicht weiterverfolgt. Hierzu zählen:

- Die Kombination 100% EtOH und 4%NBF Fixation. Diese Kombination erfolgte nach dem Protokoll 2 der Ethanolfixation und Protokoll 3 der PFA-Fixation im <u>Kapitel 7.1.1</u>.
   Nach 1 h Fixation mit EtOH folgte im Anschluss die Fixation mittels PFA.
- Die Direktfärbung ohne Fixation.

- Die Celloidinierung des Schnittes mit anschließender Direktfärbung nach Protokoll 4 im Kapitel 7.1.1.
- Die Färbung in fixierender Farbstofflösung mit Astrablaulösung sowie Alcianblaulösung nach Protokoll 5 im Kapitel 7.1.1.

# 3.6.2 Chemische Fixierung des Probenmaterials sowie anschließende histologische Schritte

Probenentnahme, Einbettung und Lagerung

Die Probenentnahme von Jejunum und Kolon erfolgte zügig, jedoch vorsichtig. Um Zeitverluste zu vermeiden wurde die Vorbereitung optimiert. Dies war notwendig, um der Autolyse möglichst effektiv entgegenzuwirken. Dazu zählten die Zubereitung des Methacarns (Methanol/Eisessig/Chloroform im Verhältnis 6:3:1) und das Abfüllen in bereits beschriftete Becher für die jeweilige Probe. Die befüllten und beschrifteten Becher wurden auf 4 °C vorgekühlt. Bei Probennahme wurden diese in Eiswasser kalt gehalten. Das Volumenverhältnis Probenstück zu Methacarnfixierung betrug mindestens 1:10, um einer Verdünnung der Fixierungslösung durch die Gewebeflüssigkeit vorzubeugen.

Folgende Variationen wurden mit dem Ziel einer schnellen Fixierung und somit einem besseren Erhalt des Mukus untersucht:

- Fixierung ohne Präparation des Probenmaterials: Das Darmstück wurde direkt in 4 °C kaltes Methacarn verbracht und anschließend für zwei Stunden im Kühlschrank (4 °C) fixiert.
- Fixierung mit Injektion von Methacarn in ein geschlossenes Darmrohr: Das Darmstück (etwa 4 cm Länge) wurde an beiden Enden mittels Band zugeschnürt. Ein Ende wurde direkt verschlossen. Vom anderen Ende wurde eine Kanüle luminal eingeführt und vor Verschluss vorsichtig eine Injektion von Methacarn (etwa 1 ml) durchgeführt. Nach Entfernung der Kanüle wurde das Ende ebenfalls mittels Band verschlossen, um ein Auslaufen des Methacarns zu verhindern. Anschließend wurde dieses Darmstück in 4 °C kaltes Methacarn verbracht und für zwei Stunden im Kühlschrank (4 °C) fixiert.
- Fixierung nach antimesenterialem Eröffnen des Darms und Befestigung auf einer Korkplatte: Das Probenmaterial wurde mittels Schere vorsichtig antimesenterial eröffnet. Anschließend wurde das eröffnete Darmstück auf der serosalen Seite auf eine Korkplatte (ca. 3 x 3 cm) gelegt und mittels 4-6 Igelstacheln randständig auf der Korkplatte fixiert. Die Korkplatte verhindert das Absinken der Probe auf den Bechergrund. Die Fixation durch Igelstachel verhindert das Einrollen des Darms. Das eröffnete, auf einer Korkplatte fixierte Darmstück wurde in den Methacarnbecher vorsichtig mit der luminalen Seite zum Bechergrund abgelegt.
- Verwendung unterschiedlicher Fixierungsdauern von Methacarn: Es erfolgte eine Fixierung der Proben in Methacarn für 2, 4 und >20 Stunden.
- Verwendung unterschiedlicher Fixierungslösungen: Probeweise erfolgten Fixierungen mittels Bouin sowie Carnoy.

Nach der Fixierung wurden die Proben in ca. 2 x 2 cm große Probenstücke geschnitten und in Einbettkassetten (Rotilabo® Einbettkassette Macro, Roth, Karlsruhe, Deutschland) gelegt. Anschließend erfolgte die Entwässerung nach dem Protokoll 11 im <u>Kapitel 7.2.1</u> sowie das Einlegen in Paraffin für ca. 24 Stunden. Am Folgetag wurden die Einbettkassetten aus dem

Paraffin genommen, in der Einbettstation (Modell 2081, Bavimed, Birkenau, Deutschland) in schnittfertige Blöcke gegossen und auf 2 °C mittels Kühlplatte (COP 30.010, MEDITE, Burghof, Deutschland) heruntergekühlt. Die Lagerung der Proben bis zum Schneiden erfolgte bei -4 °C im Gefrierschrank.

Probeweise erfolgte auch eine Fixierung mittels Carnoy (Ethanol/Eisessig/Chloroform im Verhältnis 6:3:1) sowie Bouin (Pikrinsäure, 40 % Formalin und Eisessig in den Anteilen 80/15/5). Hierbei wurde keine Präparation des Probenmaterials vorgenommen. Die Fixierung erfolgte für zwei Stunden im Kühlschrank bei 4 °C. Die Entwässerung und Einbettung in Paraffin erfolgte korrespondierend zur Methacarnfixierung.

#### Schneiden der Proben

Da sich das Schneiden von kotgefüllten Darmproben durch Zerfall des Kotes schwierig gestaltete, erfolgte eine Kühlung der Proben. Dies führte zu einer besseren Stabilität der Schnitte. Die Entnahme der Proben aus dem Gefrierfach erfolgte erst unmittelbar vor dem Schneiden. In Phasen, in denen nicht geschnitten wurde, lag ein Kühlakkumulator auf den Proben. Das Schneiden der Proben erfolgte am Mikrotom (Sledge Microtome, Typ 1400, Leitz, Wetzlar, Deutschland) mittels Einmalklingen (Microtome Blade, FEATHER®, Osaka, Japan). In dieser Arbeit wurde eine Schnittdicke von 7 µm verwendet. Probehalber erfolgten auch Schnittdicken von 5, 10 und 15 µm. Direkt nach dem Schneiden der Proben wurde der Schnitt mittels Pinsel vorsichtig in ein 37 °C warmes Wasserbad (Paraffin Streckbad 1052, GFL, Burgwedel, Deutschland) gelegt, um eine Streckung des Schnittes zu erreichen (destilliertes Wasser).

### Auswahl der Objektträger

Die Schnitte wurden aus dem Paraffin-Streckbad auf einen Objektträger aufgezogen. Zum Vergleich wurden silanisierte (silanisiert, Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) und nicht-silanisierte (Th.Geyer, Renningen, Deutschland) Objektträger verwendet. Je Objektträger wurden 2-3 Schnitte aufgezogen.

Der native Schnitt wurde unter dem Mikroskop auf seinen Anschnitt kontrolliert. Waren Zotten oder Krypten nicht optimal angeschnitten, erfolgte eine Positionskorrektur des Paraffinblocks am Mikrotom und ein erneuter Schnitt.

Nach Lufttrocknung der Objektträger erfolgte die Lagerung bis zur Färbung in einem Trockenschrank (Heraeus® Trockenschrank, T5042, Heraeus electronic, Hanau, Deutschland) bei 37 °C.

#### Entparaffinierung

Die Entparaffinierung erfolgte unmittelbar vor der Färbung. Das Gewebe wurde vorsichtig nach einer Spülung in Xylol in eine absteigende Ethanolreihe gesetzt. Anschließend erfolgte die Färbung. Das Protokoll 12 der Entparaffinierung ist unter Kapitel 7.2.1 einsehbar.

#### 3.6.3 Färbung der Gefrierschnitte

Bei stickstofffixierten Proben wurden die nachfolgenden Färbungen untersucht:

- Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)

PAS führt bei unsubstituierten Glykolgruppen durch Oxidation zu Aldehydgruppen. PAS färbt den neutralen Schleim rötlich. Die Färbung mit PAS erfolgte nach Protokoll 6 im <u>Kapitel</u> 7.1.2.

- Alcianblau (AB)

AB färbt polyanionische Glykoproteine. AB färbt den sauren Schleim bläulich. Die AB Färbung erfolgte bei pH 2,5 und pH 0,5 nach dem Protokoll 7 im Kapitel 7.1.2.

- Alcianblau-Periodsäure-Schiff Reaktion (AB-PAS)

AB-PAS färbt den neutralen und den sauren Schleim. Hierbei wurde die AB Färbung bei pH 2,5 verwendet nach dem Protokoll 8 im Kapitel 7.1.2.

- Lektin Peanut-Agglutinin

Lektine färben selektiv spezifische Kohlenhydratäste an. In dieser Arbeit wurden probeweise verschiedene Lektine zum Mukusnachweis verglichen<sup>1</sup>. Anschließend wurde bei weiteren Färbungen das Lektin Peanut-Agglutinin (PNA) verwendet. PNA färbt N-Acetyl-Galaktosamine an. Die Anfärbung mittels Lektinen erfolgte nach Protokoll 9 im <u>Kapitel 7.1.2</u>.

<sup>1</sup> PNA, BSL, EEL, UEA

Hämatoxvlin-Eosin (HE)

HE ist eine gebräuchliche Übersichtsfärbung, die zur Differenzierung von basophilen und azidophilen Gewebe verwendet wird. Diese Färbung ist relativ unspezifisch für Mukus, reicht aber für Messungen von Krypten aus. Sie erfolgte nach dem Protokoll 10 im Kapitel 7.1.2.

### 3.6.4 Färbung der Paraffinschnitte

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden folgende Färbungen nach der chemischen Fixierung verwendet:

- Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)

Die Färbung mit PAS erfolgte nach Protokoll 13 im Kapitel 7.2.2.

- Alcianblau (AB)

Die AB Färbung erfolgte bei pH 2,5 nach Protokoll 14 im Kapitel 7.2.2.

- Alcianblau-Periodsäure-Schiff Reaktion (AB-PAS)

Hierbei wurde die AB Färbung bei pH 2,5 verwendet nach dem Protokoll 15 im Kapitel 7.2.2.

Hämatoxylin-Eosin (HE)

Die HE-Färbung erfolgte nach dem Protokoll 16 im Kapitel 7.2.2.

#### 3.6.5 Morphometrische Auswertung der Mukusdicke an Gefrierschnitten

Verwendete Geräte und Programme

Die Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte am Mikroskop (Axioskop 50, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit der Kamera DS-Ri1 (Nikon, Tokio, Japan) unter Verwendung des Programms NIS-Elements Version 3.22.15 (Nikon, Tokio, Japan).

Folgende Einstellungen wurden vor der Auswertung gewählt:

- Lichtstärke zwischen 8 und 10 (je nach Tageshelligkeit)
- Weißabgleich außerhalb des Schnittes
- Autobelichtung: aus
- Auflösung: Schnell: 1280x1024 Fine, Normal, Qualität: 4076x3116 8bit
- Kontrast: DynamischVergrößerung: 20-fach

#### Auswahl der Messstellen der Mukusdicke an Gefrierschnitten

- Voraussetzungen:

Pro Objektträger waren zwei bis drei Schnitte aufgezogen.

Für eine Auswertung des Schnittes war ein Minimum von drei messbaren Stellen auf dem jeweiligen Schnitt die Bedingung.

Die Kriterien einer Messstelle waren folgende:

- Eine Mindestlänge von 100 μm.
- Eine kontinuierliche Schichtung Schleimhaut Mukus Darminhalt.
- Keine verschobene zusätzliche Schleimschicht über dem Kot. Diese kann artifiziell durch Verschiebungen beim Schneiden am Kryostaten entstehen.
- Auswahl der Messstellen:

Zur besseren Orientierung wurde der Schnitt des Darms als Ziffernblatt betrachtet, sodass zwölf Uhr oben und sechs Uhr unten lag.

Die drei Messstellen des Schnittes wurden wie folgt ausgewählt:

- Suche eines Schnittes, an dem drei Messstellen möglich waren (Suche am Schnitt, am dichtesten zur Objektträgerbeschriftung beginnend).
- Bei der Betrachtung des Schnittes (OT-Beschriftung liegt links), wurde am ausgewählten Schnitt auf acht Uhr (unten links), im Uhrzeigersinn beginnend nach einer geeigneten Messstelle gesucht. Anschließend erfolgt die Messung.
- Der zweite Messpunkt sollte möglichst ca. vier "Stunden" vom ersten Messpunkt entfernt sein, um einen gewissen Abstand zum ersten Messpunkt zu gewährleisten. Anschließend erfolgte die zweite Messung.
- Der dritte Messpunkt wurde, sofern der erste und zweite Messpunkt innerhalb von fünf "Stunden" zueinander lagen, auf der gegenüberliegenden Seite des zweiten

Messpunktes gesucht um eine aussagekräftige Verteilung der Messpunkte zu erreichen. Lagen der erste und zweite Messpunkt ohnehin über fünf "Stunden" auseinander, wurde der dritte Messpunkt ebenfalls um fünf "Stunden" nach dem zweiten Messpunkt gesucht.

Eine optimale Auswahl aller Messstellen ist zu relativieren, da manche Schnitte nicht genügend gut verteilte Messpunkte ergaben oder nicht als vollständiges Darmrohr vorhanden waren. Dies lag an der Gefrierfixierung, die zum Bruch einiger Proben geführt hatte. In diesen Fällen lagen die Messpunkte teilweise dichter beieinander.

## Morphometrische Auswertung der Mukusdicke

An dem ausgewählten Schnitt wurden an den drei Messstellen jeweils zwei Messungen wie folgt durchgeführt:

- Zehnpunktemessung: Hierbei wurde die Schleimdicke von der Schleimhautoberfläche bis zum Beginn des Darminhalts gemessen. Die zehn Dickenmessungen lagen in regelmäßigen Abständen zueinander. Der Beginn der Messungen wurde zufällig ausgewählt. Der Messstrahl stand 90 Grad zur Schleimhautoberfläche. Die Messung des Mukus endete dort, wo Kotpartikel begannen. Es wurde nicht direkt über Kryptenausgänge gemessen. Die Messung erfolgte durch das Eingabefeld unter "2-Punkte".
- "Integralmessung": Hierbei wurde der Schleim an der gesamten Messstelle als Fläche erfasst durch Bildung eines Polygons. Dies erfolgte durch Umrandung des Mukus an der Messstelle (Eingabefeld "Fläche"). Die Bildvergrößerung nach der Aufnahme erzielt eine höhere Genauigkeit bei der Umrandung der Fläche. Anschließend wurde die darunter liegende Länge der Schleimhaut erfasst (Eingabefeld "Polylinie"). Hierfür blieb die Linie des Flächenintegrals auf dem Bild erhalten, um den genauen Anfang und das genaue Ende der Flächenmessungen visualisieren zu können. Über die Kryptenausgänge wurde eine gerade Linie gezogen, die dem Verlauf der Epitheloberfläche der Schleimhaut entsprach. Dies erfolgte sowohl für die Flächen- als auch die Längenerfassung, um den sekretierten Mukus über den Krypten berechnen zu können. Die Fläche wurde anschließend durch die darunter liegende Länge der Schleimhaut dividiert. Dieser Wert gilt als Äquivalent der Mukusdicke.

Zum besseren Verständnis der Verfahren wird auf Abbildung 2 verwiesen.

# 3.6.6 Morphometrische Auswertung der Mukusdicke an Methacarn-fixierten Schnitten

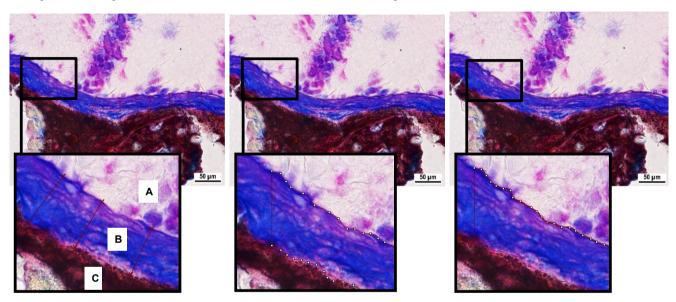
Keiner der Methacarn-fixierten Schnitte erfüllte vollständig die Voraussetzungen des <u>Kapitels 3.6.5</u> zur Messung der Mukusschicht. Mit Ausnahme eines Schnittes zeigten sich der Darminhalt und der Mukus durchweg von der Darmwand gelöst. Dennoch wurde die Dickenmessung an zehn Proben nach den oben genannten Schemata durchgeführt. Dies erfolgte unter Kompromittierung einer intakten Schichtung von Schleimhaut – Mukus - Darminhalt. An vier der zehn Proben war die Schleimschicht nicht an den anvisierten drei Punkten messbar. Diese Proben wurden in der statischen Analyse nicht berücksichtigt.

 $\label{lem:condition} \mbox{Aufgrund der verschobenen Schichtung von Schleimhaut - Mukus - Darminhalt sind die \\ \mbox{Daten der Mukusschicht bei Verwendung der chemischen Fixierung nur bedingt auswertbar.}$ 

# 3.6.7 Morphometrische Auswertung der Kryptentiefe an Methacarn-fixierten Schnitten

Die Messungen der Kryptentiefen erfolgte an Methacarn-fixierten Schnitten nach HE Färbung. Dabei wurde von der Basalmembran bis zur Epitheloberfläche gemessen. Pro Tier wurden an einem Schnitt zehn gerade Krypten gemessen. Die Messung erfolgt durch das Eingabefeld "2-Punkte".

Die folgende Abbildung 2 veranschaulicht beide Varianten der Mukusdickenmessungen am Kolon von Absetzferkeln.



**Abbildung 2:** Darstellung beider Verfahren zur Mukusdickenmessung am Kolon. Links: Zehnpunktemessung; Mitte: "Integralmessung" (Flächenerfassung); rechts: "Integralmessung" (Längenerfassung). A: Darmwand, B: Mukusschicht, C: Darmlumen mit Darminhalt. Fixierung: Stickstoff, Postfixation: PFA, Färbung: AB2,5-PAS, Vergrößerung: 20fach.

# 3.6.8 Übersicht der gemessenen Schnitte

Die nachfolgende Tabelle 11 zeigt eine Zusammenfassung der histologischen Schnitte, die morphometrisch gemessen wurden.

Tabelle 11: Übersicht morphometrisch erfasster histologischer Schnitte

Tiere (n)	Schnitt- dicke	Probenfixierung	Postfixation	Färbung	Auswertung
Alle (24)	10 µm	Stickstoff	PFA	AB2,5 –PAS	Mukusdicke
Alle (24)	10 µm	Stickstoff	PFA	AB2,5 –PAS	Mukusdicke
10	10 µm	Stickstoff	PFA	AB0,5 –PAS	Mukusdicke
10	10 µm	Stickstoff	4%NBF	AB2,5 –PAS	Mukusdicke
10	10 µm	Stickstoff	EtOH	AB2,5 –PAS	Mukusdicke
10	7 µm	Methacarn	/	AB2,5 –PAS	Mukusdicke
Alle (24)	7 µm	Methacarn	1	HE	Krypten

Mukusdicke ermittelt durch Zehnpunktemessung und "Integralmessung"

Kryptentiefe ermittelt durch Messung der Tiefe von 10 Krypten

# 3.7 Molekularbiologische Untersuchungen (PCR)

#### 3.7.1 Probenentnahme

Nach Töten des Tieres wurde das gesamte Darmkonvolut zügig entnommen. Jeweils etwa vier Zentimeter des mittleren Jejunums und des aszendierenden Kolons wurden in kaltem NaCl gespült, in beschriftete Alufolie umwickelt und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Bis zur Verwendung wurden die Proben bei -80 °C aufbewahrt.

## 3.7.2 Probenaufbereitung und Einwaage

Die Proben wurden einzeln aus dem Gefrierschrank genommen und zerkleinert. Ca. 150-200 mg wurden anschließend in die zehnfache Menge -80 °C kalten RNA/ater®-ICE Frozen Tissue Transition Solution (Ambion™, Life Technologies, Carlsbad, USA) gelegt. Die Proben lagerten nachfolgend mindestens 24 h bei -20 °C in der Lösung. Anschließend wurden ca. 50-70 mg mittels Waage (Sartorius BP 110 S, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) abgewogen und mit der Extraktion begonnen.

#### 3.7.3 RNA-Extraktion

Die Extraktion erfolgte mittels NucleoSpin® RNA Kitt (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Hersteller-Protokoll (Kapitel 5.1, S. 20 ff., RNA Purification Schritte 1 bis 9). Bei allen Proben wurde eine zusätzliche DNA-Verdauung (Kapitel 7.2, S. 40 ff., rDNase digestion Punkt A und B) sowie die anschließende Aufreinigung der RNA (Kapitel 5.6, S.30 ff., Cleanup of RNA Nummer 1 bis 4) durchgeführt. Abschließend erfolgte erneut die Aufbereitung (Kapitel 5.1, RNA Purification mit den Schritten 5, 8, 9). Die Lagerung der extrahierten RNA erfolgte bei -20 °C.

### 3.7.4 Bestimmung der Qualität und Quantität der RNA

Die Mengen- und Qualitätsbestimmungen wurden mittels Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) durchgeführt. Die Proben wurden nach Hersteller-Protokoll in den RNA Chips (Agilent RNA 6000 Nano Kit, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) eingegeben. Vor der Analyse erfolgte ein gründliches Durchmischen (IKA MS 3 Vortex, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) der Proben. Die anschließende Messung erfolgte durch das Programm "Prokaryote Total RNA Nano Series II.xsy". Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm "2100 Bioanalyzer Software" (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Sofern das Minimum von 95 ng/µl RNA in der jeweiligen Lösung nicht enthalten war, wurde eine erneute Extraktion durchgeführt, bis die minimale Menge an RNA verfügbar war. Bei einem Versuchstier (Nummer 12, Gruppe C, weiblich) konnte die gewünschte Menge an mRNA im Jeiunum nicht erreicht werden. Um eine gleiche Gruppengröße zu erhalten, wurde dieses Tier durch ein anderes der gleichen Fütterungsgruppe, jedoch anderen Geschlechts (Nummer 26, Gruppe C, männlich) ersetzt. Anschließend wurde für die Synthese der cDNA ein Ansatz von 10 µl hergestellt, der jeweils eine Konzentration von 95 ng/µl RNA enthielt. Dies erfolgte durch Verdünnung der Proben mit RNase freiem Wasser (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, USA).

## 3.7.5 Herstellung der cDNA

Zur Herstellung der cDNA wurde eine reverse Transkription nach Hersteller-Protokoll des SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, USA) durchgeführt. Zusätzlich zum Kit wurden Random Primer (Invitrogen™, Life Technologies,

Carlsbad, USA) sowie dNTP Mix (10 mM ea) (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, USA) verwendet. Für die Herstellung wurden die Geräte SureCycler 8800 Thermocycler (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) sowie die PCR Workstation mit UV / Air circulator (Peqlab, VWR, Radnor, USA) verwendet. Auf die Zugabe von RNaseOUT™ wurde verzichtet, da die RNA-Menge in den Proben über 50 ng/µl betrug. Anstelle der sonst zugegebenen RNaseOUT™ wurde 1 µl RNase freies Wasser hinzugefügt. Auf eine zusätzliche Behandlung mit RNase H im Anschluss wurde ebenfalls verzichtet. Anschließend folgte direkt die quantitative Reverse-Transkriptase-PCR.

## 3.7.6 Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR

In der folgenden Übersicht werden die ausgewählten Primer dargestellt, die für die quantitative Reverse-Transkriptase-PCR verwendet wurden.

Tabelle 12: Ausgewählte Primer für die quantitative Reverse-Transkriptase-PCR

Gen	Zielsequenz (von 5´zu 3´)	AT (°C)	Referenz
RPL13 <sup>1</sup>	RPL13A-f: CCGTCTCAAGGTGTTCGATG RPL13A-r: GGATCTTGGCCTTCTCCTTC	60	Liu <i>et al.</i> , (2014b)
SDHA <sup>2</sup>	SDHA-f: CAAACTCGCTCCTGGACCTC SDHA-r: CCGGAGGATCTTCTCACAGC	60	Villodre Tudela et al., (2015)
Bet2glob <sup>3</sup>	Bet2glob-f: CCCCGAAGGTTCAGGTTTAC Bet2glob-r: CGGCAGCTATACTGATCCAC	60	Liu <i>et al.</i> , (2014b)
MUC2 <sup>4</sup>	MUC2-1f: CTGCTCCGGGTCCTGTGGGA; MUC2-1r: CCCGCTGGCTGGTGCGATAC	60	Pieper <i>et al.</i> , (2012a)
TFF3 <sup>5</sup>	TFF-3-f3: AGGATGTTCTGGCTGCTAGTG; TFF- 3-r3: CACACTGGTTCGCCGACAG	61	Liu <i>et al.</i> , (2014b)
β-def3 <sup>6</sup>	β-def3-f: GTGCAGAAGGGGCAATGGTCG β-def3-r: GTTGCAGGTCTCATGCAGTAAGCA	60	Liu <i>et al.</i> , (2014b)

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> RPL13: 60s ribosomal protein L13 (Haushaltsgen)

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> SDHA: succinate dehydrogenase subunit A (Haushaltsgen)

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Bet2glob: β2-microglublin (Haushaltsgen)

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> MUC2: Muzin 2

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup>TFF3: Trefoil factor 3

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup>β-def3: beta-Defensin 3

Die quantitative Reverse-Transkriptase-PCR hatte ein Gesamtvolumen von 25 μl. Diese setzt sich wie folgt zusammen:

- 12,5 µl Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix with low ROX (Brilliant II SYBR® Green QRT-PCR 1-Step Master Mix, Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- 0,5 µl des jeweiligen Primers
- 10,5 μl RNase freies Wasser (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, USA)
- 1 μl der hergestellten cDNA

Der Ansatz wurde zentrifugiert (Heathrow Scientific, Gusto™ High-Speed Mini-Centrifuge) und mittels Stratagene Mx3000P / Mx3005P Thermocycler (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) analysiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm "MxPro QPCR Software" (Mx3005P, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Nach den PCR-Zyklen erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse, um die Differenzierung zwischen spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten zu erreichen.

Die Ergebnisse der Zielgene wurden durch die Haushaltsgene mittels einer mathematischen Methode standardisiert (Pfaffl, 2001).

# 3.8 Statistische Auswertung der Daten

Für die statistische Auswertung wurde das Programm IBM SPSS Version 22 (SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet. Sowohl die Mediane als auch die Mittelwerte der Messwerte der histologischen Messungen wurden nach Kolmogorov-Smirnow und Shapiro-Wilk auf Normalverteilung geprüft. Diese Prüfung wurde ebenfalls bei den Ergebnissen der PCR durchgeführt. Der Shapiro-Wilk-Test weist für kleine Stichproben eine höhere Sicherheit auf und war somit ausschlaggebend. Aufgrund der in der Regel nicht normalverteilten Werte wurden die Mediane aus den Einzelwerten von jedem Tier gebildet. Diese wurden als Grundlage für die grafische Darstellung mittels Boxplots, für die Tests auf Normalverteilung sowie für die statistische Analyse mittels Kruskal-Wallis-Test verwendet. Dieser überprüft die Gleichmäßigkeit der Verteilung der Rangplätze von mehr als zwei unabhängigen Gruppen in einer gemeinsamen Rangreihe auf Unterschiede. Soweit das Signifikanzniveau unter 0,05 liegt, ist der Unterschied nachgewiesen, wobei in diesem Fall über den sogenannten Post Hoc Test die Gruppen auf Unterschiede paarweise analysiert werden. Das Konfidenzintervall betrug 95 %.

# 4. Kapitel IV: Ergebnisse

# 4.1 <u>Erarbeitung einer histologischen Methode zur Darstellung des</u> <u>Mukus im Jejunum und Kolon von Ferkeln nach dem Absetzen</u>

## 4.1.1 Vergleich einer chemischen Fixierung mit einer Gefrierfixierung

In den vorliegenden Untersuchungen wurde eine chemische Fixierung durch Methacarn mit der Gefrierfixierung durch Stickstoff an Gewebeproben von Jejunum und Kolon durchgeführt und verglichen.

### Chemische Fixierung

Bei der Verwendung von Methacarn für die Fixierung war im Jejunum in über 90 % der Proben kein Chymus vorhanden. Somit entfiel eine klare Begrenzung des Mukus, welche Voraussetzung einer morphometrischen Beurteilung ist. Die chemische Fixierung führte zum Verlust von Mukus, sodass eine morphometrische Messung des Mukus nur bei wenigen Gewebeproben möglich war.

Bei der Verwendung der Methacarnfixierung mit Proben aus dem Kolon blieb der Mukus überwiegend erhalten. Allerdings kam es bei über 90 % der Proben zur Ablösung des Darminhalts mit anhaftendem Mukus von der Schleimhaut.

Sofern die Proben vor der Fixierung nicht eröffnet wurden, war das Kolon in allen untersuchten Fällen mit Darminhalt gefüllt. Bei vier von zehn der untersuchten Tiere war allerdings nach Verwendung der Methacarnfixierung keine Mukusschicht messbar, sodass diese Tiere in der Bewertung unberücksichtigt blieben.

#### Gefrierfixierung

Bei der Gefrierfixierung mit flüssigem Stickstoff konnte die Mukusschicht in jeder Gewebeprobe sowohl im Jejunum als auch Kolon erhalten und histologisch dargestellt werden.

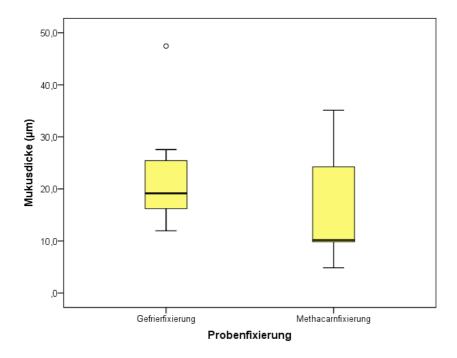
Im Jejunum blieb der Mukus in Abhängigkeit von der anschließenden Postfixation des Schnittes erhalten. Der Einfluss der anschließenden Postfixation wird im <u>Kapitel 4.1.2</u> erläutert. In 90 % der Proben war kein Chymus im Jejunum darstellbar. Ohne Begrenzung des Mukus durch Chymus ist eine exakte morphometrische Messung nicht möglich. In zwei Dritteln der Fälle entstanden luminal Substanzverluste oder Kollabierung des Mukus mit der Folge einer Vermischung des Mukus der gegenüberliegenden Seite der Darmwand.

Im Kolon war in jeder Probe Darminhalt vorhanden. Ähnlich wie im Jejunum blieb die Schichtung Schleimhaut-Mukus-Darminhalt in Abhängigkeit von der anschließenden Postfixation des Schnittes intakt.

# <u>Vergleich der Mukusschichtdicke im Kolon bei Verwendung von chemischer Fixierung und</u> Gefrierfixierung

Von zehn Ferkeln wurden Gewebeproben aus dem aszendierenden Kolon entnommen, anschließend in flüssigem Stickstoff (mit PFA-Postfixation) oder Methacarn fixiert und nach Probenaufbereitung in AB pH 2,5-PAS gefärbt.

Die Methacarn-fixierten Proben wiesen nicht die für eine Messung nötige Schichtung von Schleimhaut-Mukus-Darminhalt auf. Zu Vergleichszwecken wurden diese Messungen dennoch durchgeführt, wobei diese daher nur an sechs von zehn Tieren möglich waren. Der Vergleich der Messwerte verschiedener Fixationsverfahren ist in Abbildung 3 und Tabelle 13 dargestellt.



**Abbildung 3:** Quantitativer Mukusdickenvergleich bei Verwendung von Gefrier- und Methacarnfixierung an Gewebeproben im Kolon von Absetzferkeln (Gefrierfixierung: n=10, Methacarnfixierung: n=6)

**Tabelle 13:** Ergebnisse des Vergleichs der Schichtdicke des Mukus (in µm) nach Gefrierund Methacarnfixierung von Gewebeproben aus dem Kolon von Absetzferkeln (n=10)

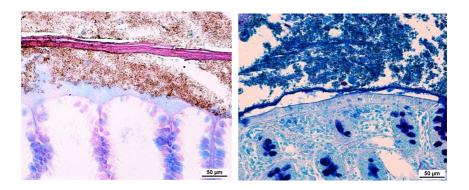
Parameter	Gefrierfixierung	Methacarnfixierung
Median	19,2	10,2
Interquartilbereich	10,5	18,4
Min/Max	12,0 / 48,5	4,84 / 35,1
P-Wert <sup>1</sup>		0,104

<sup>1</sup> Kruskal-Wallis-Test

Es bestand kein Unterschied zwischen den Schichtdicken nach Anwendung beider Fixierungen.

Zwischen den Tieren bestand eine relativ hohe Streuung, insbesondere bei der Verwendung der chemischen Fixierungsmethode.

Typische histologische Bilder für Gefrierfixierung und chemische Fixierung sind in Abbildung 4 dargestellt. Hier zeigen sich deutlich die Zusammenhangstrennungen, die nach Verwendung der chemischen Fixationsmethode auftraten.



**Abbildung 4:** Darstellung der Mukusschicht von Gewebeproben des Kolons; Gefrierfixierung mit flüssigem Stickstoff und anschließende Postfixation durch Paraformaldehyddampf (links) bzw. nach Fixierung durch Methacarn (rechts); Färbung: AB2,5-PAS

## 4.1.2 Vergleich von drei Postfixationen an histologischen Gefrierschnitten

In den vorliegenden Untersuchungen wurden Serienschnitte von gefrierfixierten Gewebeproben (Jejunum und Kolon) mittels drei unterschiedlicher Postfixationen behandelt und anschließend deren Einfluss auf qualitative und quantitative Parameter der Mukusschicht überprüft.

Vierprozentige neutral gepufferte Formalinlösung (4%NBF)

Bei der Verwendung von 4%NBF blieb die Mukusstruktur weitgehend erhalten. Nach anschließender AB-PAS Färbung zeigte sich der Mukus jedoch inhomogen angefärbt. Um die Becherzellen entstand ein Alcianblau-positiver Hof.

Die Verwendung von 4%NBF im Jejunum führte luminal häufiger zu Substanzverlusten des Mukus, verglichen mit der Fixation durch Paraformaldehyddampf. Für morphometrische Messungen der Schichtdicke des Mukus mangelte es luminal an einer Begrenzung durch Chymus.

Im Kolon blieb bei Verwendung von 4%NBF mehr Schleim erhalten als im Jejunum. Es kam teilweise zur Quellung des Mukus, sodass dieser teils über die natürlichen Begrenzungen durch Schleimhaut bzw. Darminhalt hinaus reichte. Dadurch waren morphometrische Messungen nicht in jedem Fall durchführbar.

#### Ethanol

Bei der Verwendung von Ethanol blieb der Mukus überwiegend erhalten. Nach anschließender AB-PAS Färbung zeigte sich teilweise eine Inhomogenität der Anfärbung des Mukus. PAS-positiver Schleim sowie PAS-positive Becherzellen waren teilweise nur schwach angefärbt.

Bei der Fixation der Gefrierschnitte mit Ethanol lag der Mukus im Jejunum in schollenartiger Struktur vor. Für morphometrische Messungen der Schichtdicke des Mukus mangelte es luminal an einer Begrenzung durch Chymus.

Im Kolon zeigte sich der Mukus in netzartigen Strukturen. Diese wurden durch eine Inhomogenität der Anfärbung des Mukus verursacht.

#### Paraformaldehyddampf (PFA)

Bei der Verwendung von PFA blieb der Mukus nahezu vollständig erhalten. Nach anschließender Färbung stellte sich der Mukus homogen dar. Die Färbeintensität von Alcianblau war jedoch geringer als bei Ethanol und 4%NBF. Die Färbeintensität von PAS war vergleichsweise höher.

Im Jejunum stellte sich der Mukus ebenfalls in schollenartiger Struktur dar. Die Färbung der einzelnen Schollen war homogen. Für morphometrische Messungen der Schichtdicke des Mukus mangelte es luminal zumeist an einer Begrenzung durch Chymus.

Im Kolon war die Mukusschicht sehr gut erhalten. Der Mukus stellte sich in laminarer Schichtung dar.

Durch Verwendung von PFA konnten Bakterien mittels Gramfärbung (Protokoll nach (Mulisch und Welsch, 2010)) im Mukus dargestellt werden. Die grampositiven Stäbchen reichten teilweise bis an das Epithel des Jeiunums heran.

Die Kombinationen der Fixationen Paraformaldehyddampf mit Ethanol erbrachten weder Vorteile bezüglich des Erhaltes des Mukus noch hinsichtlich der Homogenität bei der Anfärbung des Mukus.

**Tabelle 14:** Qualitative Bewertung von Serienschnitten gefrierfixierter Gewebeproben aus dem Kolon von Absetzferkeln nach Verwendung unterschiedlicher Postfixationen

Parameter	4%NBF	Ethanol	PFA
Mukuserhalt	*	**	***
Färbehomogenität	*	*	***
Färbeintensität	***	**	**
Darmgewebeerhalt	***	**	**
Becherzellerhalt	*	**	**

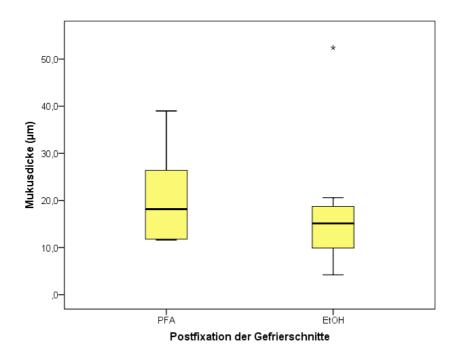
<sup>\*</sup> nur teilweise erreicht mit deutlichen Verlusten

<sup>\*\*</sup> erreicht mit einigen Verlusten

<sup>\*\*\*</sup> nahezu vollständig erreicht

# <u>Vergleich der Postfixation mit Paraformaldehyddampf und Ethanol an Gefrierschnitten des</u> Kolons von Absetzferkeln

Von zehn Ferkeln wurden Gewebeproben aus dem aszendierenden Kolon entnommen. Nach Gefrierfixierung wurden die histologischen Serienschnitte mit PFA oder Ethanol fixiert und in AB pH 2,5-PAS gefärbt. Der Vergleich der Messwerte nach PFA- und Ethanolfixation ist in Abbildung 5 und Tabelle 15 dargestellt.



**Abbildung 5:** Quantitativer Mukusdickenvergleich bei Verwendung unterschiedlicher Postfixationen (PFA und Ethanol) der Gefrierschnitte im Kolon von Absetzferkeln (n=10 je Gruppe)

**Tabelle 15:** Ergebnisse des Vergleichs der Schichtdicke des Mukus (in  $\mu$ m) nach PFA- und Ethanolfixation von Gefrierschnitten im Kolon von Absetzferkeln (n=10)

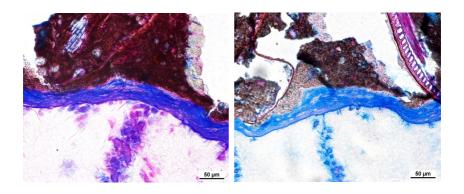
Parameter	PFA-Fixation	Ethanolfixation	
Median	18,2	15,1	
Interquartilbereich	15,0	10,2	
Min/Max	11,6 / 39,0	4,22 / 52,4	
P-Wert <sup>1</sup>		0,226	

<sup>1</sup> Kruskal-Wallis-Test

Es bestand kein Unterschied zwischen den erhaltenen Schichtdicken nach Anwendung beider Postfixationen.

Zwischen den Tieren bestand eine relativ hohe Streuung, insbesondere bei der Verwendung der Ethanolfixation.

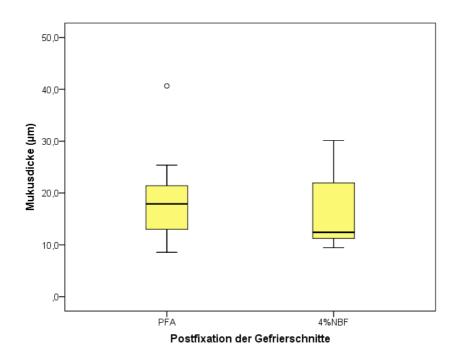
Typische histologische Bilder für die beschriebenen Fixationen sind in der Abbildung 6 dargestellt.



**Abbildung 6:** Darstellung der Mukusschicht von Gewebeproben des Kolons; Gefrierfixierung mit flüssigem Stickstoff und anschließende Postfixation durch Paraformaldehyddampf (links) bzw. Ethanol (rechts); Färbung: AB2,5-PAS

# <u>Vergleich der Postfixation mit Paraformaldehyddampf und mit 4%NBF an Gefrierschnitten</u> des Kolons von Absetzferkeln

Von zehn Ferkeln wurden Gewebeproben aus dem aszendierenden Kolon entnommen. Nach Gefrierfixierung wurden die histologischen Serienschnitte mit PFA oder 4%NBF fixiert und in AB pH 2,5-PAS gefärbt. Der Vergleich der Messwerte nach PFA- und 4%NBF-Fixation ist in Abbildung 7 und Tabelle 16 dargestellt.



**Abbildung 7:** Quantitativer Mukusdickenvergleich bei Verwendung unterschiedlicher Postfixationen (PFA und 4%NBF) an Gefrierschnitten des Kolons von Absetzferkeln (n=10 je Gruppe)

**Tabelle 16:** Ergebnisse des Vergleichs der Schichtdicke des Mukus (in  $\mu$ m) nach PFA- und 4%NBF-Fixation von Gefrierschnitten im Kolon von Absetzferkeln (n=10)

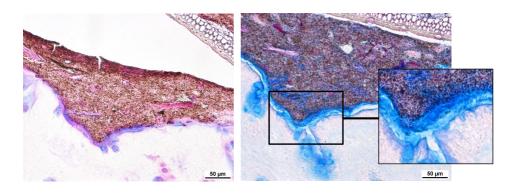
Parameter	PFA-Fixation	4%NBF-Fixation	
Median	17,9	12,4	
Interquartilbereich	9,68	11,7	
Min/Max	8,56 / 40,7	9,44 / 30,1	
P-Wert <sup>1</sup>		0,406	

<sup>1</sup> Kruskal-Wallis-Test

Es bestand kein Unterschied zwischen den erhaltenen Schichtdicken nach Anwendung beider Postfixationen.

Zwischen den Tieren bestand eine relativ hohe Streuung, insbesondere bei der Verwendung von Paraformaldehyddampf.

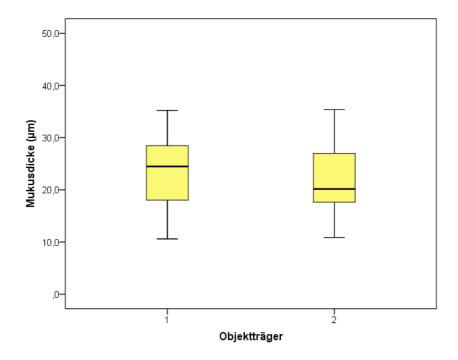
Typische histologische Schnitte für die beschriebenen Fixationen sind in Abbildung 8 dargestellt. Bei der Verwendung von 4%NBF-Fixation ist deutlich zu erkennen, dass sich alcianblau-positiver Mukus über die Begrenzungen der Schleimhaut bzw. des Darminhalts hinaus ausdehnt



**Abbildung 8:** Darstellung der Mukusschicht aus Gewebeproben des Kolons; Gefrierfixierung mit flüssigem Stickstoff und anschließende Postfixation durch Paraformaldehyddampf (links) bzw. 4%NBF (rechts); Färbung: AB2,5-PAS

# <u>Vergleich von Serienschnitten Paraformaldehyddampf-fixierter Gefrierschnitte im Kolon von Absetzferkeln</u>

Von zehn Ferkeln wurden Gewebeproben aus dem aszendierenden Kolon entnommen. Nach Gefrierfixierung wurden die histologischen Serienschnitte mit PFA fixiert und in AB pH 2,5-PAS gefärbt. Der Vergleich der Messwerte nach PFA-Fixation von Serienschnitten ist in Abbildung 9 und Tabelle 17 dargestellt.



**Abbildung 9:** Quantitativer Mukusdickenvergleich an Serienschnitten mit PFA-Fixation im Kolon von Absetzferkeln (n=10 je Gruppe)

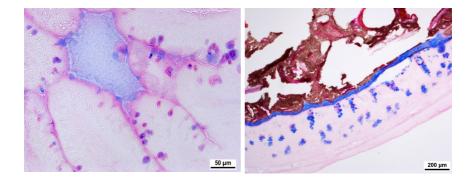
**Tabelle 17:** Ergebnisse des Vergleichs der Schichtdicke des Mukus (in μm) an Serienschnitten nach PFA-Fixation von Gefrierschnitten im Kolon von Absetzferkeln (n=10)

Parameter	Objektträger 1	Objektträger 2
Median	24,5	20,1
IQR	12,4	10,6
Min/Max	10,6 / 35,2	10,9 / 35,4
P-Wert <sup>1</sup>	C	),705

<sup>1</sup> Kruskal-Wallis-Test

Es bestand kein Unterschied zwischen den erhaltenen Schichtdicken der Serienschnitte. Zwischen den Tieren bestand eine relativ hohe Streuung. Die Streuung der Messwerte zwischen beiden Objektträgern war sehr gering.

Typische histologische Bilder nach PFA-Fixation sind in der Abbildung 10 dargestellt.



**Abbildung 10:** Darstellung der Mukusschicht aus Gewebeproben des Jejunums (links mit LUT) bzw. Kolons (rechts); Gefrierfixierung mit flüssigem Stickstoff und anschließende Postfixation durch Paraformaldehyddampf; Färbung: AB2,5-PAS

#### 4.1.3 Vergleich verschiedener Färbungen an histologischen Gefrierschnitten

In den vorliegenden Untersuchungen wurden verschiedene Färbungen nach PFA-Fixation der Gefrierschnitte im Jejunum und Kolon durchgeführt und anschließend deren Einfluss auf qualitative und quantitative Parameter der Mukusschicht überprüft.

Der Mukus war durch Färbungen mit AB pH 2,5, AB pH 0,5, PAS und Lektinen gut darstellbar. Die Kombinationsfärbung AB pH 2,5-PAS ermöglichte eine gute Darstellung und Differenzierung der unterschiedlichen Mukusanteile. Bei der Anfertigung der Färbelösung AB pH 0,5 kam es zur unvollständigen Lösung des Farbstoffes und somit uneinheitlichen Färbelösung verschiedener Ansätze. Es wurde eine geringere Farbintensität des Mukus bei pH 0,5 gegenüber pH 2,5 sichtbar. Eine quantitative Bestimmung der Mukusschichtdicke wurde bei der Färbung mit Lektinen nicht durchgeführt. Bei der Verwendung unterschiedlicher pH-Werte der AB-Färbung wurde kein Unterschied in der angefärbten Menge des Mukus beobachtet.

#### Jejunum

Im Jejunum wurde das Lektin PNA aufgrund einer deutlicheren Anfärbung des Mukus gegenüber den Lektinen BSL, EEL und UEA bevorzugt. Durch die Verwendung von PNA wurde eine intensivere Anfärbung des Mukus als bei der Verwendung von AB oder PAS erreicht. Dabei erzielte das Lektin Peanut-Agglutinin (PNA) die deutlichste Anfärbung des Mukus. Die Färbeintensität der Lektine nahm von epithelial nach luminal ab. Eine vorherige Behandlung des histologischen Schnittes mit Neuraminidase führte zusätzlich zu einer intensiveren Anfärbung des Mukus durch das Lektin PNA sowohl luminal, als auch zwischen den Villi intestinales.

Bei Verwendung der Kombinationsfärbung AB pH 2,5-PAS wurde die Menge des angefärbten Mukus nicht beeinflusst. Die nach luminal abnehmende Farbintensität wurde hierbei ebenfalls beobachtet.

#### Kolon

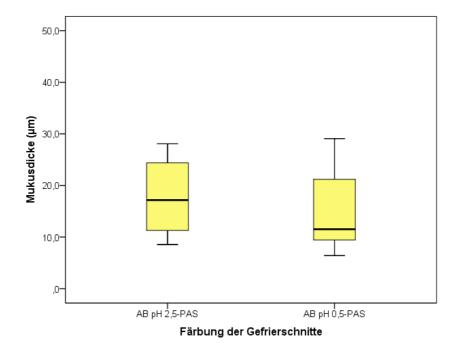
Im Kolon führte die Verwendung von Lektinen nicht zu einer intensiveren Anfärbung gegenüber AB oder PAS. Eine Veränderung der Färbeintensität von epithelial nach luminal war mit keiner Färbung zu erkennen.

Bei der Verwendung der Kombinationsfärbung AB pH 2,5-PAS wurde kein Mengenunterschied des dargestellten Mukus ermittelt. Mittels der Kombinationsfärbung war saurer von neutralem Mukus differenzierbar. Bei der Färbung AB pH 2,5-PAS war die Abgrenzung zum Nachbargewebe deutlicher darstellbar als bei der Verwendung von Lektinen.

Für eine deutliche Darstellung des Mukus war eine hohe Färbedauer von AB notwendig (>6 Stunden). PAS dagegen erforderte eine maximale Färbezeit von 45 Sekunden, um eine Überfärbung zu verhindern.

<u>Vergleich der Mukusschichtdicke bei Verwendung von AB pH 2,5-PAS- und AB pH 0,5-PAS-</u>Färbung von Gefrierschnitten im Kolon von Absetzferkeln

Von zehn Ferkeln wurden Gewebeproben aus dem aszendierenden Kolon entnommen. Nach Gefrierfixierung wurden die histologischen Serienschnitte mit PFA postfixiert und in AB pH 2,5-PAS oder AB pH 0,5-PAS gefärbt. Der Vergleich der Messwerte nach verschiedenen Färbungen ist in Abbildung 11 und Tabelle 18 dargestellt.



**Abbildung 11:** Quantitativer Mukusdickenvergleich nach PFA-Fixation der Gefrierschnitte bei Verwendung unterschiedlicher Färbungen (AB pH 2,5-PAS- und AB pH 0,5-PAS) im Kolon von Absetzferkeln (n=10 je Gruppe)

**Tabelle 18:** Ergebnisse des Vergleichs der Schichtdicke des Mukus (in μm) nach PFA-Fixation der Gefrierschnitte mit AB pH 2,5-PAS- und AB pH 0,5-PAS-Färbung im Kolon von Absetzferkeln (n=10)

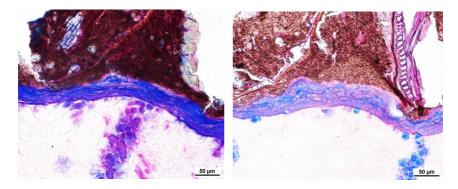
Parameter	AB pH 2,5-PAS	AB pH 0,5-PAS
Median	17,2	11,5
Interquartilbereich	13,5	12,4
Min/Max	8,56 / 28,1	6,41 / 29,1
P-Wert <sup>1</sup>	C	),226

<sup>1</sup> Kruskal-Wallis-Test

Es bestand kein Unterschied zwischen den erhaltenen Schichtdicken nach Anwendung beider Färbungen.

Zwischen den Tieren bestand eine relativ hohe Streuung, insbesondere bei der Verwendung der AB pH 0,5-Färbung.

Typische histologische Bilder nach AB pH 2,5-PAS und AB pH 0,5-PAS-Färbung sind in Abbildung 12 dargestellt.



**Abbildung 12:** Darstellung der Mukusschicht aus Gewebeproben des Kolons; Gefrierfixierung mit flüssigem Stickstoff und anschließender Postfixation durch Paraformaldehyddampf; Färbung: AB 2,5-PAS (links) bzw. AB 0,5-PAS (rechts)

# 4.1.4 Vergleich einer Integralmessung mit einer Zehnpunktemessung der Mukusschichtdicke

# Jejunum

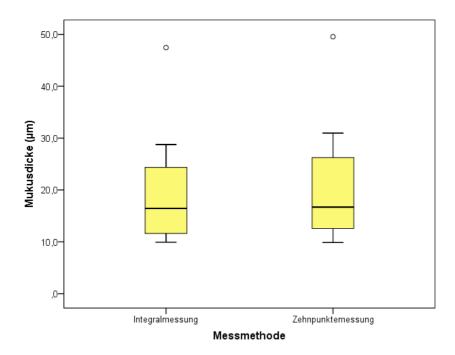
Die Auswertung der Mukusdicke war im Jejunum nicht möglich. Ursachen dafür waren das Kollabieren des Darms aufgrund mangelndem Darminhalts und somit fehlender Grenzen des Mukus zur gegenüberliegenden Darmwand sowie der Substanzverlust im Darmlumen aufgrund mangelnder Stabilität des histologischen Schnittes.

### Kolon

Im Kolon war eine morphometrische Auswertung mit beiden Messmethoden möglich. Es gab keine Unterschiede in den Ergebnissen der Mukusschichtdicke im Vergleich beider Messmethoden.

<u>Vergleich der Mukusschichtdicke bei Verwendung von einer Integralmessung und einer</u> Zehnpunktemessung im Kolon von Absetzferkeln

Von 24 Ferkeln wurden Gewebeproben aus dem aszendierenden Kolon entnommen. Nach Gefrierfixierung wurden die Schnitte mittels PFA postfixiert, in AB pH 2,5-PAS gefärbt und die Mukusschichtdicke mittels Integral- und Zehnpunktemessung gemessen. Der Vergleich der Messwerte ist in Abbildung 13 und Tabelle 19 dargestellt.



**Abbildung 13:** Quantitativer Mukusdickenvergleich bei Verwendung von zwei unterschiedlichen Messmethoden (Integral- und Zehnpunktemessung) im Kolon von Absetzferkeln (n=10 je Gruppe)

**Tabelle 19:** Ergebnisse des Vergleichs der Schichtdicke des Mukus (in  $\mu$ m) nach Integralund Zehnpunktemessung von Gewebeproben aus dem Kolon von Absetzferkeln (n=24)

Parameter	Integralmessung	Zehnpunktemessung
Median	16,5	16,7
Interquartilbereich	13,1	13,8
Min/Max	9,94 / 47,5	9,87 / 49,6
P-Wert 1		0,606

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Kruskal-Wallis-Test

Es bestand kein Unterschied zwischen den gemessenen Schichtdicken nach Anwendung beider Messmethoden.

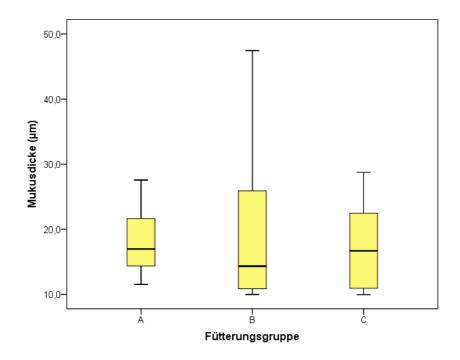
Innerhalb den Messmethoden bestand eine relativ geringe Streuung.

# 4.2 <u>Einfluss verschiedener Zinkkonzentrationen im Futter auf die</u> <u>Morphometrie und mRNA-Expression im Jejunum und Kolon von</u> Ferkeln nach dem Absetzen

#### 4.2.1 Ergebnisse der morphometrischen Messungen im Kolon

Einfluss der Fütterung unterschiedlicher Zinkkonzentrationen auf die Schichtdicke des Mukus im Kolon von Absetzferkeln

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Schichtdicke des Mukus nach Gefrierfixierungen an Gewebeproben im Kolon mit anschließender PFA-Postfixation in Abhängigkeit zu drei unterschiedlichen Zinkgehalten im Futter (A=0 mg ZnO/kg Futter, B=100 mg ZnO/kg Futter, C=1000 mg ZnO/kg Futter) mit der Integralmessung gemessen und verglichen. Die Ergebnisse werden in Abbildung 14 und Tabelle 20 zusammenfassend dargestellt.



**Abbildung 14:** Quantitativer Mukusdickenvergleich im Kolon von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)

**Tabelle 20:** Ergebnisse des Vergleichs der Schichtdicke des Mukus (in μm) im Kolon von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)

Parameter	A (0 mg ZnO) 1	<b>B (100 mg ZnO)</b> <sup>1</sup>	C (1000 mg ZnO) <sup>1</sup>
Median	17,0	14,3	16,7
Interquartilbereich	9,27	15,7	12,4
Min/Max	11,5 / 27,6	9,97 / 47,5	9,94 / 28,8
P-Wert <sup>2</sup>		0,846	

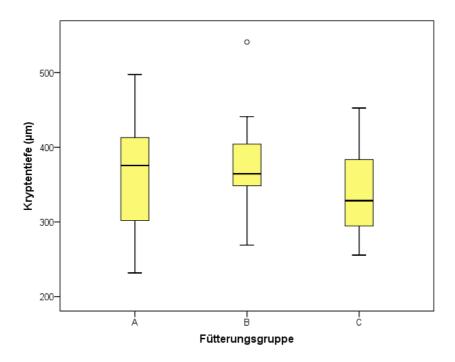
<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Zugabe von Zinkoxid je kg Futter

Es bestand kein Unterschied zwischen der Schichtdicke des Mukus der drei Fütterungsgruppen. Die Streuung der Werte war insbesondere innerhalb von Gruppe B relativ hoch.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Kruskal-Wallis-Test

# Einfluss der Fütterung unterschiedlicher Zinkkonzentrationen auf die Kryptentiefe im Kolon von Absetzferkeln

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Kryptentiefe nach chemischer Fixierung durch Methacarn an Gewebeproben im Kolon in Abhängigkeit zu drei unterschiedlichen Zinkgehalten im Futter (A=0 mg ZnO/kg Futter, B=100 mg ZnO/kg Futter, C=1000 mg ZnO/kg Futter) gemessen und verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 und Tabelle 21 zusammenfassend dargestellt.



**Abbildung 15:** Quantitativer Vergleich der Kryptentiefe im Kolon von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)

**Tabelle 21:** Ergebnisse des Vergleichs der Kryptentiefe (in μm) im Kolon von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)

Parameter	A (0 mg ZnO) <sup>1</sup>	B (100 mg ZnO) <sup>1</sup>	C (1000 mg ZnO) <sup>1</sup>
Median	376	364	329
Interquartilbereich	126	77,6	97,1
Min/Max	232 / 497	269 / 541	256 / 453
P-Wert <sup>2</sup>		0,652	

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Zugabe von Zinkoxid je kg Futter

Es bestand kein Unterschied zwischen den Kryptentiefen der drei Fütterungsgruppen. Die Streuung der Messwerte innerhalb der Fütterungsgruppen war relativ hoch.

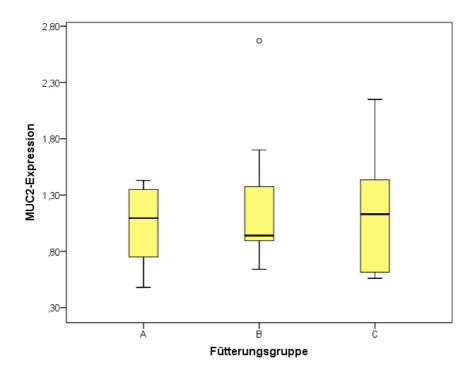
<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Kruskal-Wallis-Test

# 4.2.2 Untersuchungen zur mRNA-Expression im Jejunum und Kolon

<u>Einfluss der Fütterung unterschiedlicher Zinkkonzentrationen auf die MUC2-mRNA-Expression im Jejunum und Kolon von Absetzferkeln</u>

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die MUC2-mRNA-Expression im Jejunum und Kolon in Abhängigkeit zu drei unterschiedlichen Zinkgehalten im Futter (A=0 mg ZnO/kg Futter, B=100 mg ZnO/kg Futter, C=1000 mg ZnO/kg Futter) mittels qRT-PCR gemessen und verglichen. Die Ergebnisse für die MUC2-mRNA-Expression werden in Abbildung 16 und Tabelle 22 sowie Abbildung 17 und Tabelle 23 jeweils für das mittlere Jejunum und das aszendierende Kolon zusammenfassend dargestellt.

# Mittleres Jejunum



**Abbildung 16:** Quantitativer Vergleich der MUC2-mRNA-Expression im Jejunum von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)

**Tabelle 22:** Ergebnisse des Vergleichs der MUC2-mRNA im Jejunum von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)

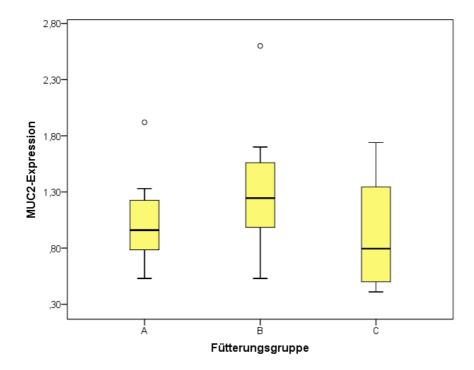
Parameter	A (0 mg ZnO) <sup>1</sup>	B (100 mg ZnO) <sup>1</sup>	C (1000 mg ZnO) <sup>1</sup>
Median	1,10	0,935	1,13
Interquartilbereich	0,632	0,650	0,865
Min/Max	0,482 / 1,43	0,638 / 2,67	0,561 / 2,15
P-Wert <sup>2</sup>		0,996	

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Zugabe von Zinkoxid je kg Futter

Es bestand kein Unterschied zwischen der MUC2-mRNA-Expression im Jejunum der drei Fütterungsgruppen.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Kruskal-Wallis-Test

### Aszendierendes Kolon



**Abbildung 17:** Quantitativer Vergleich der MUC2-mRNA-Expression im Kolon von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)

**Tabelle 23:** Ergebnisse des Vergleichs der MUC2-mRNA im Kolon von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)

Parameter	A (0 mg ZnO) <sup>1</sup>	B (100 mg ZnO) <sup>1</sup>	C (1000 mg ZnO) <sup>1</sup>
Median	0,959	1,24	0,793
Interquartilbereich	0,553	0,702	1,02
Min/Max	0,526 / 1,92	0,527 / 2,60	0,406 / 1,74
P-Wert <sup>2</sup>		0,333	

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Zugabe von Zinkoxid je kg Futter

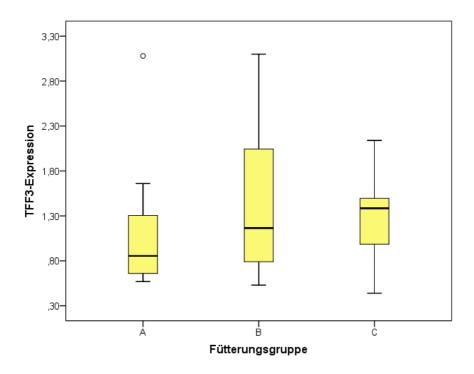
Es bestand kein Unterschied zwischen der MUC2-mRNA-Expression im Kolon der drei Fütterungsgruppen.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Kruskal-Wallis-Test

# <u>Einfluss der Fütterung unterschiedlicher Zinkkonzentrationen auf die TFF3-mRNA-</u> Expression im Jejunum und Kolon von Absetzferkeln

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die TFF3-mRNA-Expression im Jejunum und Kolon in Abhängigkeit zu drei unterschiedlichen Zinkgehalten im Futter (A=0 mg ZnO/kg Futter, B=100 mg ZnO/kg Futter, C=1000 mg ZnO/kg Futter) mittels qRT-PCR gemessen und verglichen. Die Ergebnisse für die TFF3-mRNA-Expression werden in Abbildung 18 und Tabelle 24 sowie Abbildung 19 und Tabelle 25 jeweils für das mittlere Jejunum und das aszendierende Kolon zusammenfassend dargestellt.

### Mittleres Jejunum



**Abbildung 18:** Quantitativer Vergleich der TFF3-mRNA-Expression im Jejunum von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)

**Tabelle 24:** Ergebnisse des Vergleichs der TFF3-mRNA-Expression im Jejunum von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)

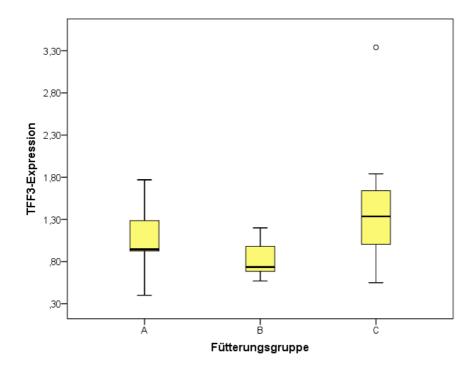
Parameter	A (0 mg ZnO) 1	B (100 mg ZnO) <sup>1</sup>	C (1000 mg ZnO) <sup>1</sup>
Median	0,855	1,16	1,39
Interquartilbereich	0,858	1,54	0,608
Min/Max	0,565 / 3,08	0,527 / 3,10	0,440 / 2,14
P-Wert <sup>2</sup>		0,619	

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Zugabe von Zinkoxid je kg Futter

Es bestand kein Unterschied zwischen der TFF3-mRNA-Expression im Jejunum der drei Fütterungsgruppen.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Kruskal-Wallis-Test

### Aszendierendes Kolon



**Abbildung 19:** Quantitativer Vergleich der TFF3-mRNA-Expression im Kolon von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)

**Tabelle 25:** Ergebnisse des Vergleichs der TFF3-mRNA-Expression im Kolon von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)

Parameter	A (0 mg ZnO) <sup>1</sup>	B (100 mg ZnO) <sup>1</sup>	C (1000 mg ZnO) <sup>1</sup>
Median	0,945	0,737	1,33
Interquartilbereich	0,517	0,347	0,824
Min/Max	0,396 / 1,77	0,571 / 1,2	0,548 / 3,34
P-Wert <sup>2</sup>		0,075	

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Zugabe von Zinkoxid je kg Futter

Die Analyse ergab einen tendenziellen Unterschied zwischen der TFF3-mRNA-Expression im Kolon der drei Fütterungsgruppen. Die Streuung der Werte war vergleichsweise gering.

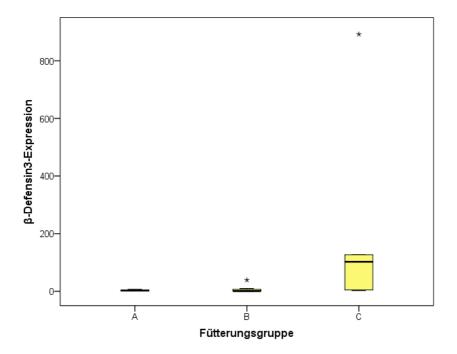
<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Kruskal-Wallis-Test

# Einfluss der Fütterung unterschiedlicher Zinkkonzentrationen auf die β-Defensin 3-mRNA-Expression im Jejunum und Kolon von Absetzferkeln

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die  $\beta$ -Defensin 3-mRNA-Expression im Jejunum und Kolon in Abhängigkeit zu drei unterschiedlichen Zinkgehalten im Futter (A=0 mg ZnO/kg Futter, B=100 mg ZnO/kg Futter, C=1000 mg ZnO/kg Futter) mittels qRT-PCR gemessen und verglichen. Die Ergebnisse für die  $\beta$ -Defensin 3-mRNA-Expression werden in Abbildung 20 und Tabelle 26 sowie Abbildung 21 und Tabelle 27 jeweils für das mittlere Jejunum und das aszendierende Kolon zusammenfassend dargestellt.

### Mittleres Jejunum

Bei fünf Tieren konnte keine Expression der  $\beta$ -Defensin 3-mRNA gemessen werden, darunter zwei Tiere aus Fütterungsgruppe A und drei Tiere aus Fütterungsgruppe C. Diese Tiere wurden in der Analyse nicht berücksichtigt.



**Abbildung 20:** Quantitativer Vergleich der  $\beta$ -Defensin 3-mRNA-Expression im Jejunum von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (Gruppe A: n=6, Gruppe B: n=8, Gruppe C: n=5)

**Tabelle 26:** Ergebnisse des Vergleichs der  $\beta$ -Defensin 3-mRNA-Expression im Jejunum von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)

Parameter	A (0 mg ZnO) <sup>1</sup>	B (100 mg ZnO) <sup>1</sup>	C (1000 mg ZnO) <sup>1</sup>
Median	1,77	0,556	102
Interquartilbereich	4,56	7,58	506
Min/Max	0,169 / 5,88	0,068 / 38,9	2,23 / 892
P-Wert <sup>2</sup>		0,055	

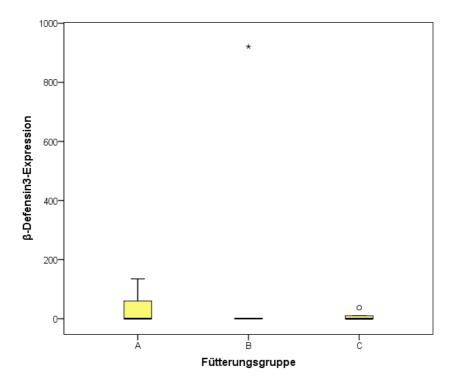
<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Zugabe von Zinkoxid je kg Futter

Die Analyse ergab einen tendenziellen Unterschied zwischen der  $\beta$ -Defensin 3-mRNA-Expression im Jejunum der drei Fütterungsgruppen. Die Streuung der Werte ist generell hoch.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Kruskal-Wallis-Test

### Aszendierendes Kolon

Bei fünf Tieren konnte keine Beta-Defensin 3-mRNA-Expression gemessen werden, darunter drei Tiere aus Fütterungsgruppe B und zwei Tiere aus Fütterungsgruppe C. Diese Tiere wurden in der Analyse nicht berücksichtigt.



**Abbildung 21:** Quantitativer Vergleich der β-Defensin 3-mRNA-Expression im Kolon von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (Gruppe A: n=8, Gruppe B: n=5, Gruppe C: n=6)

**Tabelle 27:** Ergebnisse des Vergleichs der  $\beta$ -Defensin 3-mRNA-Expression im Kolon von Absetzferkeln bei Verfütterung von drei unterschiedlichen Zinkkonzentrationen (n=8 je Gruppe)

Parameter	A (0mg ZnO) <sup>1</sup>	B (100mg ZnO) <sup>1</sup>	C (1000mg ZnO) <sup>1</sup>
Median	0,587	0,596	0,084
Interquartilbereich	75,7	460	17,3
Min/Max	0,009 / 135	0,086 / 920	0,009 / 37,3
P-Wert <sup>2</sup>		0,476	

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Zugabe von Zinkoxid (75%ig) je kg Futter

Es bestand kein Unterschied zwischen der  $\beta$ -Defensin 3-mRNA-Expression im Kolon der drei Fütterungsgruppen.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Kruskal-Wallis-Test

# 5. Kapitel V: Diskussion

# 5.1 Hintergrund und Zielstellung

Der histologische Nachweis der Mukusschicht stellt seit langem eine Herausforderung dar. In der Literatur werden unterschiedliche Methoden zur Darstellung des Mukus beschrieben. Bereits bei den direkten histologischen Nachweisverfahren existiert eine große Anzahl verschiedener Fixierungs- und Färbeprotokolle (Abbildung 1). Dies liegt sowohl an der Vielzahl der histologischen Arbeitsschritte als auch dem breitem Spektrum an Versuchstieren und Probengeweben. Aufgrund der Vielzahl dieser histologischen Protokolle zur Mukusdarstellung sind Ergebnisse von Mukusmessungen häufig nicht miteinander vergleichbar. Auch die Herstellung eines "Goldstandards" zum Mukuserhalt wurde bisher nicht etabliert. Daher stellte die Erarbeitung einer optimierten Methode zur Mukusdarstellung ein Ziel dieser Arbeit dar. Zu diesem Zweck wurden verschiedene histologische Methoden qualitativ und quantitativ verglichen.

Zink hat als Spurenelement vielfältige Auswirkungen auf den Organismus. In der Schweinehaltung wird Zink weltweit häufig zur Prophylaxe gegen Diarrhoe angewendet. Dabei sind viele Wirkungsmechanismen von Zink nur unzureichend geklärt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Auswirkungen verschiedener Zinkkonzentrationen im Futter auf die Schichtdicke und Zusammensetzung des sezernierten Mukus im Darm von Absetzferkeln.

# 5.2 Kritik an der Methode

# 5.2.1 Kritik an der Etablierung eines Fixierungs- und Färbeprotokolls zur histologischen Darstellung von Mukus im Darm

Zur histologischen Mukusdarstellung existieren seit vielen Jahren verschiedene Fixierungsund Färbeprotokolle (<u>Kapitel 2.5.11</u>, Tabelle 4). Aufgrund fehlender oder mangelnder
Einheitlichkeit ist eine vergleichende Betrachtung der jeweiligen Ergebnisse nur
eingeschränkt oder gar nicht möglich. Wegen der Vielzahl von Arbeitsschritten, von der
Auswahl der Tiere bis zur Auswertung der Mukusdicke als Teil des methodischen
Vorgehens, können die ermittelten Daten mehr oder minder starken Verzerrungen
unterliegen. Aus der Menge dieser Arbeitsschritte werden in der vorliegenden Arbeit einige
wesentliche unter Berücksichtigung der Literatur betrachtet. Mit zehn Tieren pro Gruppe liegt
die Probenzahl auf einem ausreichend hohem Niveau und ist vergleichbar zu anderen
Studien. Dessen ungeachtet stellt sich die Streuung der Messwerte innerhalb der Gruppen
aber auch der Individuen bei einzelnen ausgewiesenen Methoden als relativ hoch dar. Für
eine weitere Optimierung des Protokolls sind weitere Untersuchungen und größere Gruppen
denkbar. Ungeachtet dessen kann die vorliegende Arbeit zur Entwicklung eines Leitfadens
für ein entsprechend standardisiertes Fixierungs- und Färbeprotokolls beim Schwein
beitragen.

# 5.2.2 Kritik am Fütterungsversuch verschiedener Zinkkonzentrationen an Absetzferkeln

In vorangegangenen Studien wurden bei der Supplementierung von Zink sowohl positive als auch negative Auswirkungen auf die Darmgesundheit von Absetzferkeln beschrieben.

Die Wirkungen von Zink auf die Mukusschichtdicke im Darm sind in der Literatur bislang nicht untersucht. Ein Grund dafür könnte in der schwierigen histologischen Darstellung des Mukus liegen. In der vorliegenden Untersuchung gelang die Darstellung des Mukus, die Ergebnisse sind jedoch aufgrund der Vielzahl einzelner Arbeitsschritte durch mögliche systematische Fehler zu relativieren. Darüber hinaus zeigten sich in der histologischen Darstellung starke tierindividuelle Unterschiede. Dies konnte auch mittels biochemischer Verfahren über die Expression verschiedener mRNA bestätigt werden.

Eine abschließende Aussage zur Auswirkung des Spurenelements Zink auf den Mukus im Darm von Absetzferkeln kann diese Arbeit daher nicht liefern.

# 5.3 <u>Fixierungs- und Färbeprotokoll zur histologischen Darstellung von</u> Mukus im Darm von Absetzferkeln

### 5.3.1 Versuchstiere, Fütterung und Probenauswahl

#### Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurden Ferkel nach dem Absetzen untersucht. Sie besitzen ein relativ kleines Darmkaliber. Dies ermöglicht ein einfaches Sammeln und Bearbeiten der Proben. Die Handhabung großer Darmlumina ist schwieriger als die kleiner. Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass Darminhalt aufgrund mangelnden zellulären Verbunds nach der Fixierung zur Fragmentation neigt. Das Verhältnis von Darminhalt zur Darmwand ist bei kleineren Darmlumina geringer. Ein weiterer Grund liegt in der Bauweise von Kryostaten bzw. Mikrotomen, da diese eine begrenzte räumliche Kapazität aufweisen.

In der Literatur finden sich bereits eine Reihe von Studien zum Mukus von Ferkeln in vergleichbarem Alter (Bontempo et al., 2006, Le Bon et al., 2010, Callies, 2012), deren Zielstellungen sich auf den Einfluss der Futterstruktur und den Zusatz von Probiotika fokussieren

#### Probenauswahl

Das Jejunum stellt etwa 90 % des Dünndarms dar (Laerke und Hedemann, 2012). In der Literatur werden im Ileum höhere Mukusschichten als im Jejunum beschrieben (Atuma et al., 2001, Varum et al., 2010). Das Jejunum erwies sich für Untersuchungen des Schleims als ungeeignet. Die im Jejunum entnommenen Proben enthielten zwar Mukus, konnten jedoch aufgrund eines Mangels an Chymus als luminale Begrenzung in der vorliegenden Arbeit keiner Messung unterzogen werden. Eine mögliche Ursache ist die hohe motorische Aktivität in diesem Darmsegment. Diese ist im Jejunum gegenüber dem Ileum höher (Lindberg und Ogle, 2001). Außerdem herrschen unterschiedliche physikalische und chemische Eigenschaften zwischen diesen beiden Segmenten (Kararli, 1995) und könnten somit den Mukus beeinflussen. Zudem ist die Bedeutung des im Jejunum gegenüber dem Ileum höheren Wassergehalts zu berücksichtigen (Bargmann, 2013, Steinhausen, 2013). Diese könnten ein Abwaschen des wasserlöslichen Mukus begünstigen.

Trotz ähnlicher Zusammensetzung des Mukus verhält dieser sich in verschiedenen Darmabschnitten ungleich (Faderl *et al.*, 2015). In Abhängigkeit zum jeweiligen Dünndarmsegment existieren unterschiedliche Resorptionsmechanismen (Ermund *et al.*, 2013). Diese könnten den Mukus beeinflussen. Hierbei ist auch zu berücksichtigen, dass anders als im Ileum die Mukusschicht im Jejunum nicht die gesamten Villi intestinales bedeckt (Atuma *et al.*, 2001, Johansson *et al.*, 2011a, Johansson *et al.*, 2011b). Das Vorhandensein von Dünndarmzotten erschwert die histologische Darstellung des Mukus (Johansson *et al.*, 2011b). Der Kontakt zur gegenüberliegenden Darmwand wird durch lange Villi intestinales gefördert und steht dadurch einer morphometrischen Messung des Mukus entgegen. Die Länge der Dünndarmzotten fallen im Ileum im Vergleich zum Duodenum und Jejunum am geringsten aus (Vollmerhaus, 2004).

Im Dickdarm wurde im Rahmen dieser Arbeit das aszendierende Kolon untersucht. Dies hatte sich bereits in anderen Studien als vorteilhaft erwiesen, da es mit Darminhalt gefüllt war (Callies, 2012, Wlodarska *et al.*, 2015). Die Füllung kann durch die *ad libitum*-Fütterung der Tiere, durch den Verzicht auf Laxanzien bzw. durch das Auslassen der Spülung des Probenmaterials nach Probenentnahme begründet werden. Letztere führt zum Verlust von vorhandenem Mukus (Pullan *et al.*, 1994).

#### Fütterung

Fütterungsunterschiede sind wesentliche Faktoren, die eine Vergleichbarkeit von Studien erschweren. Die Fütterung umfasst die Fütterungstechnik, die Futterzusammensetzung sowie die Futterstruktur und beeinflusst den intestinalen Mukus (Brunsgaard, 1998).

Zur Fütterungstechnik zählt der Zugang zum Futter. Die Fütterung ad libitum ist sinnvoll, um den "natürlichen" Zustand des Organismus zu reflektieren und um die hormonelle und nervale Steuerung der Mukussekretion nicht zu beeinflussen (liboshi et al., 1994). Hierbei kann ein gefüllter Dünndarm jedoch nicht immer gewährleistet werden. Bei restriktiver Fütterung bzw. bei Fasten sind Dünn- als auch Dickdarm in der Regel nicht gefüllt. Ein nicht mit Darminhalt gefüllter Darm kollabiert. Die Mukusdarstellung ist dann zwar noch möglich, eine exakte morphometrische Dickenmessung des Mukus jedoch nicht. Für eine präzise Mukusdickenmessung ist Chymus als luminale Begrenzung essenziell, da der Kontakt vom Mukus zum Mukus der gegenüberliegenden Darmseite eine korrekte histologische Abgrenzung der Mukusdicke unmöglich macht (Jordan et al., 1998). Mangelnde Abtragung bzw. mangelnde Begrenzung des Mukus durch Darminhalt führt zur Quellung des Mukus. Messungen an gequollenem Mukus sind mit ungequollenen Mukusmessungen nicht vergleichbar. Zudem besitzt gequollener Mukus einen schwächeren Zusammenhalt (Johansson et al., 2008), was eine mögliche Erklärung für den luminalen Substanzverlust von Mukus im Jejunum ist, der teilweise beim Aufziehen der Schnitte auf die Objektträger in dieser Arbeit beobachtet wurde. Eine exakte morphometrische Messung des Mukus war in solchen Fällen nicht möglich.

Neben der Fütterungstechnik nimmt die Futterstruktur Einfluss auf den Mukus. Grob strukturiertes Futter steigert die Mukusproduktion, gleichzeitig aber auch die Abrasion des Mukus (Montagne *et al.*, 2004). In einem Versuch mit Absetzferkeln blieb die Schichtdicke des Mukus durch grob teiliges Futter unbeeinflusst (Callies, 2012). Vermutlich stehen die Stimulation der Mukusproduktion und Abrasion der Mukusschicht durch grob teiliges Futter im Gleichgewicht (Montagne *et al.*, 2004).

Auch die Futterzusammensetzung beeinflusst den Mukus. Die Zugabe von Eugenol in das Futter von Mäusen führte zu einer Erhöhung der Mukusschichtdicke (Wlodarska *et al.*, 2015). Die Zugabe von Erbsenfasern zur Futterration von Schweinen führte zu einer Steigerung der Mukussekretion (Leterme *et al.*, 1998, Lien *et al.*, 2001).

In den vorliegenden Untersuchungen variierte lediglich der Zinkgehalt des Futters innerhalb der Fütterungsgruppen. Dabei ergaben die Analysen, dass die Menge des Spurenelements Zink keinen Einfluss auf die Schichtdicke und somit auf die sezernierte Menge des Mukus hat. Der Gruppenvergleich unterschiedlicher Zinkfütterungen wird in Kapitel 5.4 erläutert.

## Schlussfolgerung

Die Fütterung und die Behandlung der Tiere vor der Probenentnahme sind bei histologischen Untersuchungen in der Literatur teilweise unzureichend beschrieben. Deren Auswirkungen auf Messungen des Mukus sind jedoch entscheidend. Daher ist die Entwicklung eines Leitfadens für eine korrekte methodische Vergleichbarkeit von Studien bedeutsam.

Hinsichtlich einer exakten morphometrischen Messung der Mukusdicke im Dünndarm lassen sich vor diesem Hintergrund folgende Lösungsansätze ableiten: Denkbar wäre eine synchronisierte, letztmalige Fütterung der Tiere zur Herstellung eines gefüllten Dünndarms vor der Probennahme. Außerdem könnte eine Probennahme an einem zur Mukusdarstellung geeigneten Dünndarmabschnitt, wie z. B. dem Ileum erfolgen (Bontempo et al., 2006, Johansson et al., 2011b). Neben diesen Empfehlungen ist für eine präzise Beurteilung und

Messung des sezernierten Mukus die Vermeidung überflüssiger oder fehlerhafter Manipulationen am Probenmaterial eine wesentliche Voraussetzung. Zu diesen Manipulationen zählen indirekt auch die bereits erwähnte restriktive Fütterung, die Gabe von Laxanzien sowie die fehlerhafte Präparation der Proben nach der Entnahme. Der Erhalt von Darminhalt im Darm ist essenziell für den Mukuserhalt in einer Gewebeprobe (Johansson et al., 2011a). Dennoch wurde beschrieben, dass das Vorhandensein von Chymusresten einer Mukusmessung aufgrund mangelnder Abgrenzbarkeit entgegensteht (Callies, 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde das nicht bestätigt. Eine Unterscheidung von Darminhalt zum Mukus stellte mit der AB-PAS Färbung keine Schwierigkeit im Rahmen von Messungen dar. In den folgenden Abschnitten wird auf weitere Risiken möglicher Manipulationen eingegangen.

#### 5.3.2 Gewebeentnahme für die histologischen Untersuchungen

Eine Mukusmessung nach Gewebeentnahme ist weniger aufwendig und kostengünstiger als eine *in vivo*-Messung. Ein weiterer Vorteil der Gewebeentnahme ist die vereinfachte Möglichkeit von Messungen an mehreren Abschnitten im Darm sowie die Probensammlung zur Berücksichtigung weiterer Untersuchungstechniken. *Ex vivo*-Versuche führen jedoch zur Schrumpfung des Mukus (Atuma *et al.*, 2001). Dessen Ausmaß ist von der jeweiligen Fixierung des Probenmaterials abhängig und fällt bei der Gefrierfixierung am geringsten aus (Mülberger, 2013).

Zur histologischen Darstellung des Mukus wurde in der vorliegenden Arbeit direkt nach dem Tod der Tiere das Darmkonvolut entfernt. Dies erwies sich als gut durchführbar. Eine zügige Bearbeitung der Proben ist notwendig, um autolytischen Prozessen entgegenzuwirken (Otto, 1983, Callies, 2012). Die Entnahme des Darms stellt eine mechanische Belastung bzw. Manipulation dar, die auf ein Minimum zu reduzieren ist (Varum et al., 2010, Callies, 2012). Die Viskosität des Darminhalts ist fütterungsabhängig (McDonald et al., 2001). Dadurch kann das Schneiden unter minimaler mechanischer Belastung eine Herausforderung darstellen. Die Entnahme ausreichend großer Darmproben sowie die Verwendung langer und scharfer Klingen minimiert nach eigenen Erfahrungen die Gefahr artifizieller Verschiebungen des Mukus.

### 5.3.3 Gewebepräparation der histologischen Proben

Das antimesenteriale Eröffnen des Darms führte vor allem im Kolon zur Ablösung des Darminhalts von der Schleimhaut. Dabei kam es zu Substanzverlust des Mukus. Neben der mechanischen Belastung kann das Eröffnen des Darmrohres zur schnelleren Dehydration und somit zur schnelleren Schrumpfung des Darminhalts gegenüber der Schleimhaut führen. Dies würde einen weiteren Substanzverlust erklären. Zudem führt ein Eröffnen des Darmrohres zu einem gewissen Stabilitätsverlust des Gewebes aufgrund des Fehlens einer physikalischen Abgrenzung des Darminhalts durch die Schleimhaut (Berendt, 2013).

Eine weitere Präparationsmöglichkeit des Gewebes war in der vorliegenden Arbeit die Injektion von Methacarn in das Darmlumen. Dies führte zu einem Verlust von Mukus, vor allem im Jejunum. Der Verlust kann auf die Druckentstehung sowie auf Spülungsartefakte zurück zu führen sein. Die Auswirkungen der Injektion von Methacarn waren im Kolon geringer als im Jejunum. Die Ursache könnte in der höheren Stabilität durch eine größere Menge an Darminhalt im Kolon begründet sein.

Bei histologischen Schnitten ohne vorherige Präparation des Probengewebes konnte mehr Mukus erhalten werden als bei Schnitten mit vorheriger Präparation. Dies dürfte in der Labilität des Schleims begründet liegen. Ein intaktes, mit Darminhalt gefülltes Darmrohr wirkt stabilisierend auf den Mukus (Johansson *et al.*, 2011a). Vor diesem Hintergrund ist der weitgehende Verzicht auf eine Präparation der Proben für eine exakte morphometrische Messung des Mukus notwendig.

#### 5.3.4 Gefrierfixierung des Probenmaterials

Durch Fixierung des Probenmaterials wird der Erhalt des natürlichen Zustands des Gewebes unterstützt. Eine umgehende Fixierung der Proben ist entscheidend, um autolytischen Prozessen vorzubeugen. Die Auswahl der Fixierung ist teilweise von der darauffolgenden Färbung abhängig (Mulisch und Welsch, 2010). Die Dehydration ist ein wesentlicher Bestandteil der Fixierung. In der Regel führt Dehydration zur Schrumpfung von Mukus (Pullan et al., 1994). Dem Ziel von Fixierungen, den ursprünglichen Zustand des Gewebes möglichst zu erhalten, kommt die Kryopräparation am nächsten (Mulisch und Welsch, 2010). Grundsätzlich bestand kein Unterschied in den Ergebnissen der Mukusschichtdicke zwischen der Gefrierfixierung und der Methacarnfixierung. Somit dürfte die Schrumpfung des Mukus aufgrund der Dehydration bei beiden Fixierungen vergleichbar sein. Dennoch waren deutliche Unterschiede im Erhalt der Schichtung von Schleimhaut-Mukus-Darminhalt erkennbar. Bei der Gefrierfixierung durch Stickstoff wird das Gewebe in gefrorenem Zustand geschnitten und in seiner ursprünglichen Struktur auf dem Objektträger aufgezogen. Die Silanisierung der Objektträger kann eine bessere Haftung des Gewebes bewirken (Mulisch und Welsch, 2010). Verschiebungen von Darminhalt, Mukus und Darmgewebe beim Gefrieren der Proben sind grundsätzlich nicht auszuschließen. Dagegen spricht jedoch, dass die Schichtung dieser drei Anteile auf den histologischen Schnitten in den vorliegenden Untersuchungen überwiegend erhalten blieb. Dies war ein wesentlicher Vorteil gegenüber den chemischen Fixierungen. Gefrierfixierungen durch Stickstoff erzielten in dieser Arbeit die besten Ergebnisse, da die Mukusschichtdicke bei allen Schnitten unter den beschriebenen Voraussetzungen (siehe Kapitel 3.6.5) morphometrisch messbar war. Eine vorangegangene Studie konnte trotz vorheriger Spülung der Proben ebenfalls in allen Gefrierschnitten den Mukus erhalten (Varum et al., 2010). Im Rahmen einer Dissertation zur Untersuchung des Mukus bei Absetzferkeln wurden die Fixierungen mit flüssigem Stickstoff und nach Carnoy verglichen. Hierbei wurde beim Mukuserhalt kein Unterschied zwischen Stickstoff und Carnoy festgestellt (Callies, 2012). Die Dehydration sowie die Postfixation der Gefrierschnitte wurden in den Untersuchungen von der Autorin nicht beschrieben. Die Postfixation stellte in der vorliegenden Arbeit dagegen einen wesentlichen Faktor zum Erhalt des Mukus dar. Grundsätzlich kann das Gefrieren von Proben wasserhaltige Strukturen schützen (Conger und Fairchild, 1953). Der Vorteil der Verwendung von Stickstoff ist die Verhinderung von Mukusschrumpfung (Mülberger, 2013), die durch andere Fixierungen bzw. durch Dehydration entstehen können (Varum et al., 2010). Die Dehydration bei Gefrierfixierung erfolgt erst, nachdem der Gefrierschnitt auf dem Objektträger haftet. Dieses stellt einen wesentlichen Unterschied zur chemischen Fixierung dar.

#### 5.3.5 Chemische Fixierung des Probenmaterials

Chemische Fixierungen zum Mukuserhalt werden derzeit in der Literatur am häufigsten beschrieben. Nachfolgend werden die in den vorliegenden Untersuchungen verwendeten chemischen Lösungen diskutiert.

#### Methacarn

Methacarn ist gegenwärtig die von vielen Autoren favorisierte chemische Fixierung zur Mukusdarstellung. Der Vorteil gegenüber Carnoy und reinem Ethanol ist der Ersatz des Ethanols durch Methanol. Ethanol hat Protein-vernetzende Eigenschaften, die Methanol nicht besitzt (Johansson et al., 2011a). Dennoch führt auch Methacarn zur Schrumpfung des Mukus (Ermund et al., 2013). In den vorliegenden Untersuchungen führte Methacarn zu einem gewissen Erhalt des Mukus, jedoch wurde eine ungleich schnellere und stärkere Dehydration des Darminhalts im Vergleich zur Darmwand beobachtet. Dies äußerte sich in der Ablösung des Darminhalts von der Darmwand. Dabei war häufig der Mukus vollständig vom Epithel getrennt. Eine exakte morphometrische Messung des Mukus dieser Proben war daher nicht durchführbar. In vorangegangenen Studien von Wlodarska et al. (2015) sowie Johannson et al. (2008), bei denen Methacarn verwendet wurde, sind Ablösungen des Mukus von der Darmwand ebenfalls erkennbar. Darminhalt besitzt einen höheren Gehalt an Wasser als das Darmgewebe (Armbruster et al., 2013, Bargmann et al., 2013) und dürfte somit einer stärkeren Schrumpfung bei der Dehydration unterliegen. Unterschiedliche Fixierungsdauern über zwei Stunden mittels Methacarn ergaben keinen Unterschied im Mukuserhalt. Das deutet darauf hin, dass nach zwei Stunden eine vollständige Fixierung des Gewebes erreicht ist. Die Ergebnisse des Mukusdickenvegleichs nach Gefrier- oder Methacarnfixierung sind in Kapitel 5.3.4 diskutiert. In dem Fixierungsvergleich waren bei der Verwendung von Methacarn vier von zehn Proben nicht auswertbar, da in diesen Schnitten der Mukus nicht erhalten blieb. Bei den restlichen sechs Proben war die Voraussetzung der intakten Schichtung von Schleimhaut-Mukus-Darminhalt nicht gegeben. Die Messungen der Schichtdicken wurden zu Vergleichszwecken dennoch durchgeführt.

#### Carnoy

Die Fixierung mittels Carnoy wurde in dieser Arbeit lediglich probeweise durchgeführt. Es konnte kein Vorteil gegenüber der Methacarnfixierung festgestellt werden. Die Ablösungen des Darminhalts und des Mukus von der Darmwand waren hierbei ebenfalls erkennbar. Mehrere Studien weisen darauf hin, dass der Mukuserhalt bei Verwendung von Carnoy nur teilweise gelingt (De Lisle et al., 2007, Callies, 2012).

#### **Bouin**

Eine Bouin-Fixierung erleichtert durch die enthaltene Pikrinsäure das Eindringen von Formol in das Gewebe und fördert so die schnellere Fixierung (Mulisch und Welsch, 2010). In den vorliegenden Untersuchungen wurde Bouin als Fixierung des Mukus probeweise durchgeführt und führte hierbei nur stellenweise zum Mukuserhalt. Bouin löst eine starke Gelbfärbung des Gewebes aus (Hedinger und Dhom, 2013). Die Verwendung der PAS Färbung ist somit ungünstig, da eine Abgrenzung von Mukus und Epithel erschwert wird. In einer weiteren Studie wurden unterschiedliche Fixierungen hinsichtlich des Mukuserhalts vergleichend betrachtet. Hierbei führte Bouin zu einer geringeren Mukusschichtdicke als herkömmliche Fixierungen (Le Bon et al., 2010).

# 5.3.6 Histologische Schritte nach der Gefrierfixierung

#### Schnittdicke bei der Gefrierfixierung

Der Erhalt des Mukus wird von der Schnittdicke indirekt beeinflusst. Bei zu geringer Schnittdicke ist ein Substanzverlust des Mukus unausweichlich. Generell nimmt die Schnittdicke Einfluss auf die Intensität Färbung (Mulisch und Welsch, 2010) und somit auf die Messdaten.

Darminhalt besitzt keinen zellulären Verbund und einen hohen Wassergehalt (Lewis und Heaton, 1997), daraus resultiert eine geringe Stabilität. Diese Labilität ist durch die Erhöhung der Schnittdicke zum Teil kompensierbar. Dies spielt vorrangig beim Kolon eine Rolle. Der Grund dafür ist die vergleichsweise hohe Menge an Darminhalt gegenüber dem Darmgewebe. Bei geringer Schnittdicke "zersplitterte" der Darminhalt, was häufig zu Substanzverlust des Mukus führte. Das Jejunum war in der Regel nicht oder geringgradig mit Chymus gefüllt. Auch hieraus resultierte oft ein Stabilitätsverlust des Mukus.

# Verwendete Objektträger für die Gefrierschnitte

Die Sialinsäuren von silanisierten Objektträgern wirken als Haftvermittler zwischen Glas und Gewebeschnitt (Mulisch und Welsch, 2010) und könnten dadurch zu einem höheren Mukuserhalt beitragen. Das Hauptprotein MUC2 trägt eine hohe Zahl an Sialinsäuren (Holmén Larsson *et al.*, 2009), die solche Bindungen eingehen können (Gröbe, 2008).

Celloidinbeschichtungen von Objektträgern und von Schnitten wirken ebenfalls stabilisierend auf labile Strukturen (Mulisch und Welsch, 2010). Die Celloidinbeschichtung führte in der vorliegenden Arbeit zu einem guten Erhalt von Mukus, was durch deren Wirkung als Schutzschicht gegen physikalische und chemische Belastungen bedingt ist (liboshi *et al.*, 1994). Allerdings schließt die AB-positive Anfärbung des Celloidins die Nutzung zum Mukuserhalt aus. Ein anschließendes Abwaschen des Celloidins hätte der AB-positiven Färbung entgegenwirken können, führte jedoch zum Mukusverlust. Der Substanzverlust durch Abwaschen des Celloidins lässt sich durch die mögliche Bindung zwischen Celloidin und Mukus erklären. Denkbar ist jedoch auch die Ablösung des Mukus aufgrund der histologischen Spülung.

In der vorliegenden Arbeit wurden Objektträger auf einer Hitzeplatte vorgewärmt (50 °C), was zum erleichterten Aufziehen der Schnitte auf den Objektträger und zum besseren Erhalt der Mukusschicht gegenüber luftgetrockneten Schnitten führte. Dies könnte an der schnelleren Dehydration liegen, die zu einer Minimierung von Schrumpfungsartefakten führt. Die Anwendung von Hitzeplatten kann allerdings antigene Eigenschaften zerstören (Mulisch und Welsch, 2010). Bezüglich der Fragestellung der Darstellung der Mukusschicht wurde in dieser Arbeit kein negativer Einfluss der Hitzeplatte auf den Erhalt respektive der Anfärbung des Mukus festgestellt.

# Dehydration der Gefrierschnitte

Die Lufttrocknung als Mittel der Dehydration ist vermutlich aufgrund ihrer mangelnden Geschwindigkeit weniger geeignet. Neben der höheren Geschwindigkeit der Dehydration bei Verwendung einer Hitzeplatte könnte auch die vorherige Erwärmung des Objektträgers entscheidend sein. Die Trocknung mittels Hitzeplatte hatte sich für den Becherzellerhalt bereits als positiv erwiesen (Rieger J. et al., 2016). Die Verwendung einer Hitzeplatte mit 80 °C führte nicht zu mehr Mukuserhalt als bei 50 °C. Um potenziellen negativen Effekten wie etwa Koagulationen entgegenzuwirken, wurde in dieser Arbeit eine Temperatur der

Hitzeplatte von 50 °C bevorzugt. Für eine Schnitttrocknung finden Temperaturen bis zu 60 °C Anwendung (Mulisch und Welsch, 2010).

#### Postfixation der Gefrierschnitte

- Färbungen ohne Postfixation und fixierende Färbelösungen

Färbungen ohne Postfixation und fixierende Färbelösungen führten vermutlich aufgrund des Wasseranteils in den Lösungen sowie den physikalischen Einwirkungen von Flüssigkeiten zum Verlust des Mukus. Die unspezifische Anfärbung des Mukus (z. B. mittels Astrablau) ist ebenfalls ein Hindernis, das einer morphometrischen Auswertung der Mukusschichtdicke entgegensteht. Eine Fixation des Gefrierschnittes stellte sich als notwendig heraus, um Verlust des Mukus bei weiteren histologischen Schritten vorzubeugen.

# - 4%iges neutral gepuffertes Formalin (4%NBF)

Bereits als chemische Fixierungen führen Formalinlösungen zu sehr geringen Mukusschichten (Bontempo et al., 2006, Di Giancamillo et al., 2008). Dies könnte auf einen nachteiligen Effekt von Formalin als Postfixation hinweisen. Der Nachteil der Verwendung von 4%NBF als Postfixation liegt im Wassergehalt dieser Lösung. Dadurch wies der Mukus eine inhomogene Anfärbung auf. Bei der Verwendung von 4%NBF war Mukus über die natürlichen Begrenzungen durch Schleimhaut bzw. Darminhalt hinaus sichtbar und erschien gequollen. Die wasserhaltige Lösung könnte die Ursache der Quellungsartefakte sein. Das Quellungsverhalten könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass bei dieser Fixation keine schollenartige Struktur wie bei der Ethanol- und PFA-Fixation im Jejunum zu beobachten war. Formol besitzt proteinvernetzende Eigenschaften (Mulisch und Welsch, 2010). Dies könnte ursächlich für das Fehlen der schollenartigen Struktur sein. Ein zusätzlicher Nachteil, der generell bei flüssigen Fixationen auftritt, besteht in der mechanischen Belastung für die Schnitte durch den Kontakt zu flüssigen Lösungen. Generell führen konventionelle Fixationen, wie Formalinlösungen, zu Verlust oder Schrumpfung des Mukus (Johansson et al., 2011a).

#### - Fthanol

Die Verwendung von -80 °C kaltem Ethanol führt im Vergleich zur PFA-Fixation zu einem geringeren Erhalt des Mukus. Die Ethanolfixation färbte den Mukus inhomogen an, d. h. sie scheint nachteilige Effekte auf das Gewebe zu besitzen. Das könnte an den vernetzenden Eigenschaften von Ethanol liegen (Johansson *et al.*, 2011a).

Im Jejunum lag der Mukus wie bei der PFA-Fixation in schollenartiger Struktur. Dies war im Kolon nicht zu beobachten, was als ein weiterer Hinweis auf unterschiedliche Mukuseigenschaften der jeweiligen Darmabschnitte gedeutet werden kann, wie es bereits beschrieben wurde (Faderl *et al.*, 2015). Es ist denkbar, dass neben differierenden chemischen und physikalischen Voraussetzungen der einzelnen Darmsegmente auch die jeweilige postranslationale Modifikation des MUC2 einen Einfluss auf das unterschiedliche Mukusverhalten darstellt (Johansson *et al.*, 2013). Allerdings könnte die schollenartige Struktur auch ein Zeichen für eine schnelle Dehydration auf der Hitzeplatte oder für Schrumpfungsartefakte durch die Stickstofffixierung sein. Dagegen spricht jedoch, dass sie im Kolon nicht beobachtet wurde.

Im Kolon lag bei Verwendung von Ethanol die Mukusschicht in netzartigen Strukturen. Da Ethanol keinen Wasseranteil enthält, könnte die "Schollenbildung" ein Phänomen sein, welches mittels Quellung durch wasserhaltige Fixationen umkehrbar ist.

## - Paraformaldehyddampf (PFA)

Bei der Verwendung von PFA war im Jejunum ebenfalls eine schollenartige Struktur des Mukus erkennbar, jedoch nicht im Kolon. Die mögliche Ursache wurde bei der Ethanolfixation bereits erörtert.

Nach Fixation durch Paraformaldehyddampf zeigte der Mukus im Kolon eine laminare Schichtung. Dies ist ein Zeichen eines guten Mukuserhalts und war ein Unterschied gegenüber den anderen Postfixationen. Die guten Ergebnisse durch PFA könnte durch den geringen physikalischen und chemischen Einfluss und durch die Abwesenheit von Wasser erklärbar sein. Positive Eigenschaften durch PFA hinsichtlich des Mukuserhalts wurden bereits in einer vorangegangenen Studie beschrieben (Jordan et al., 1998). Paraformaldehyddampf scheint gegenüber Fixationslösungen ein schonenderes Verfahren darzustellen. Grundsätzlich bestand iedoch kein Unterschied in der gemessenen Mukusschichtdicke im Vergleich von PFA und Ethanol sowie PFA und 4%NBF. Diese Ergebnisse geben einen Hinweis auf einen guten Fixierungserfolg durch Verwendung der Gefrierfixierung mit anschließender Dehydration auf einer Hitzeplatte. Der mangelnde Erfolg von Direktfärbungen bestärkt jedoch die Verwendung einer geeigneten Postfixation. In den eigenen Untersuchungen stellte PFA die favorisierte Fixation dar. Im Vergleich von PFAfixierten Serienschnitten zeigen sich geringe Streuungen der Mukusschichtdicken, die auf eine gute Reproduzierbarkeit dieses Fixationsprotokolls deuten. Nach Fixierung der Objektträger mit Paraformaldehyddampf war eine lange Lagerungsdauer über mehrere Wochen möglich, was somit als guter Fixationserfolg durch PFA gewertet werden kann. Grundsätzlich ist die Alterung von histologischen Schnitten auf Obiektträgern ein Faktor, der erheblichen Einfluss auf die Messdaten nehmen kann (Mirlacher et al., 2004). Nach einer Fixationsdauer von sechs Stunden im Trockenschrank bei 60 °C war der Schnitt in den eigenen Untersuchungen vollständig fixiert, d. h. eine längere Fixationsdauer erbrachte keinen weiteren Vorteil. Die geringere Färbeintensität von Alcianblau nach PFA-Fixation könnte auf einen chemischen Einfluss von PFA auf die Muzine hinweisen. Denkbar ist eine chemische Veränderung der Bindungsstellen für Alcianblau.

Eine zusätzliche Beobachtung bei der PFA Fixation lag in der guten Darstellung von Bakterien, die mittels Gramfärbung sichtbar wurden. Die grampositiven Stäbchen im Jejunum reichten dabei teilweise bis an das Epithel heran. Dies könnte für mukuszersetzende Eigenschaften der Bakterien sprechen. In der Literatur wurden bereits pathogene Bakterien wie auch gesundheitsfördernde Kommensale mit diesen Eigenschaften beschrieben (Deplancke et al., 2002, Everard et al., 2013).

#### - Kombination von Postfixationen

Die Kombination von PFA und Ethanol erbrachte hinsichtlich des Mukuserhalts keine Vorteile. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch eine frühere Studie (Jordan *et al.*, 1998).

#### Angewendete Färbungen bei den Gefrierschnitten

Unter Verwendung von PFA als Postfixation wurde der Mukuserhalt nicht von der anschließenden Färbung beeinflusst. Der Erhalt gelang bei allen verwendeten Färbungen. Ungeachtet dessen erwiesen sich spezifischere Anfärbungen als geeigneter, um den Mukus darzustellen. Aufgrund der mangelnden Spezifität der HE- und der Astrablau-Färbung waren genaue Messungen des Mukus mit diesen Färbungen nicht möglich. Spezifischere Anfärbungen des Mukus werden z. B. mit AB, PAS oder bestimmten Lektinen durchgeführt

(Mulisch und Welsch, 2010). Die Verwendung von PAS, AB, AB-PAS oder dem Lektin PNA zeigte keinen Vorteil im Mukuserhalt und kann somit als Hinweis auf eine gute Fixation der Schnitte gewertet werden. Dafür spricht auch der fehlende Einfluss unterschiedlicher pH-Werte von Alcianblau auf den Mukuserhalt. Neben der unvollständigen Lösbarkeit von Alcianblau bei pH 0,5, war der Kontrast zwischen Mukus und Darminhalt bei AB pH 2,5-PAS deutlicher als bei Verwendung von AB pH 0,5-PAS. Das könnte vor allem daran liegen, dass bei pH 2,5 alle sauren Gruppen angefärbt werden, bei pH 0,5 lediglich die sulfatierten (Mowry und Winkler, 1956, LEV und SPICER, 1964). Hieraus resultierte die Präferenz von AB pH 2,5. Der Vorteil der Kombinationsfärbung AB-PAS gegenüber den anderen Färbungen liegt in der deutlicheren Abgrenzbarkeit des Mukus gegenüber dem Darminhalt.

#### - Jeiunum

Im Jejunum gelangen die Anfärbungen des Mukus mittels AB, PAS und Lektinen. Die Kombinationsfärbung AB pH 2,5-PAS ermöglichte eine gute Darstellung und Differenzierung des Mukus wie auch der restlichen Strukturen. Die Farbintensität des Mukus nahm nach luminal ab. Aufgrund des fehlenden Chymus war, wie bereits im <u>Kapitel 5.3.1</u> beschrieben, eine morphometrische Dickenmessung im Jejunum nicht möglich.

Lektine färben spezifische Kohlenhydrate an (Mulisch und Welsch, 2010). Sie erreichten eine intensivere Anfärbung gegenüber AB-PAS, die ebenfalls von epithelial nach luminal abnahm. Die intensivere Anfärbung durch die Verwendung von Lektinen wäre dadurch erklärbar, dass die Kohlenhydrate nicht wesentlich von PFA-Dampf beeinflusst wurden. Die Abnahme der Farbintensität könnte einen kontinuierlichen Übergang von nicht geguollenem zu gequollenem Mukus darstellen. Die Diskussion über die Anzahl der Mukusschichten wird im Kapitel 5.3.8 geführt. Aufgrund der bräunlichen Färbung der Lektine war iedoch die Differenzierung zwischen Mukus und Chymuspartikeln weniger prägnant als bei AB-PAS. Das Lektin PNA führte gegenüber den anderen Lektinen zu der intensivsten Anfärbung des Mukus. Die Intensität von PNA liegt vermutlich an der Bindung an N-Acetyl-Galaktosamine sowie Galaktoseketten. N-Acetyl-Galaktosamine wurden als eine der häufigsten Zuckerverbindungen der Muzine beschrieben (Dekker et al., 2002, Bansil und Turner, 2006, Corfield. 2015). Galaktose ist wiederum der am häufigsten vorkommende Zucker in den Muzinen (Mantle et al., 1981). Eine Behandlung des Schnittes mit Neuraminidase vor der Verwendung von Lektinen führt zu einer vermehrten Anfärbung des Mukus (Mulisch und Welsch, 2010). Durch die Verwendung von Neuraminidase wurde in der vorliegenden Arbeit der Schleim zwischen den Villi intestinales deutlicher angefärbt. Die Bindungsstellen für die Lektine sind häufig belegt, z. B. durch Sialinsäuren. Neuraminidase spaltet Sialinsäuren und setzt diese Bindungsstellen anschließend frei. MUC2, welches das Hauptmuzin im Schleim darstellt, besitzt Sialinsäuren als häufigste Glykolisierung (Holmén Larsson et al., 2009). Die Verwendung von Neuraminidase ist bereits bei anderen Untersuchungen des Mukus erfolgreich angewendet worden, um die Sialinsäure abzuspalten (Strous, 1979).

### - Kolon

Im Kolon konnte durch Verwendung von Lektinen ebenfalls der Mukus nachgewiesen werden. Dies wurde bereits in früheren Studien gezeigt (Ota und Katsuyama, 1992). Lektine führten jedoch nicht zu einem besseren Erhalt des Mukus gegenüber AB-PAS gefärbten Schnitten. Die Darstellung des Mukus im Kolon hängt folglich weniger von der verwendeten Färbung als von den Fixierungs- und Fixationsprotokollen ab. Eine Abnahme der Färbeintensität nach luminal war mit keiner der im Kolon verwendeten Färbungen erkennbar.

Dies könnte ein Hinweis für die Quellung des Mukus (Johansson et al., 2008) als Ursache der inhomogenen Anfärbung im Jejunum sein. Im Kolon waren die Färbungen AB und PAS geeignet, den Mukus darzustellen. Die Kombinationsfärbung AB pH 2,5-PAS ermöglichte eine klare Abgrenzbarkeit des Mukus zum benachbarten Gewebe und damit eine Differenzierung von saurem und neutralem Schleim. Der pH-Wert von Alcianblau hat einen Einfluss auf die Anfärbung des Mukus (Mulisch und Welsch, 2010). Dennoch war bei pH 0,5 im Vergleich mit pH 2,5 kein Unterschied in der Mukusschichtdicke messbar. Es ist denkbar, dass sich vor allem die unterschiedlichen Seitenketten der einzelnen MUC2-Proteine unterschiedlich anfärben, wobei sich die Menge des angefärbten Mukus nicht ändert. Die Färbedauer, die bei AB durch PFA-Fixation vergleichsweise lang ausfällt, wurde bereits diskutiert. Die maximale Färbezeit von 45 Sekunden mit PAS ist auf die steigende Intensität und damit einer potenziellen Überfärbung zurückzuführen, die das ohnehin schwach färbende AB überdeckt.

#### Auswertung der Mukusschichtdicke an den Gefrierschnitten

Die Auswertung der Mukusdicke war im Jejunum nicht möglich. Gründe dafür lassen sich auf das Kollabieren des Darms, auf mangelnden Darminhalt und somit fehlende Abgrenzung des Mukus sowie auf Substanzverlust im Darmlumen zurückführen.

Im Kolon dagegen war eine Auswertung der Schichtdicke möglich. Es bestand kein Unterschied in der gemessenen Mukusschichtdicke zwischen der Zehnpunkte- und der Integralmessung. In den meisten Untersuchungen des intestinalen Mukus werden zehn bis vierzig Punkte gemessen (Jordan *et al.*, 1998, Le Bon *et al.*, 2010). Dagegen weist jedoch die Integralmessung aufgrund der Bildung eines Polygons eine höhere mathematische Genauigkeit auf und kann einer potenziell subjektiven Auswahl der Messstellen entgegenwirken.

### 5.3.7 Histologische Schritte nach der chemischen Fixierung

### Fixierungsdauer der Proben bei chemischer Fixierung

Eine unterschiedliche Fixierungsdauer mit Methacarn ergab keine Vorteile im Erhalt des Mukus. Denkbar ist, dass nach zwei Stunden bereits eine ausreichende Dehydration stattgefunden hat. Diese Zeitspanne kam auch in anderen Studien zur Anwendung (Matsuo et al., 1997, Swidsinski et al., 2007).

#### Schnittdicke der Paraffinschnitte

Paraffinblöcke besitzen aufgrund des umgebenden und eingedrungenen Paraffins eine bessere Stabilität als stickstofffixierte Proben. Dies ermöglicht dünnere Schnittdicken. Dabei kann die Schnittdicke grundsätzlich Einfluss auf das zu untersuchende Gewebe haben (Whitehead und Sheehan, 1971, Mulisch und Welsch, 2010). Neben der Schnittdicke ist das vorherige Kühlen der Paraffinblöcke nach eigenen Untersuchungen ein relevanter Faktor für die Schnittstabilität. Offensichtlich ist dies durch das Zusammenziehen des Gewebes aufgrund der niedrigen Temperatur begründet. Demnach würden dünnere Schnittdicken gekühlter Paraffinblöcke dickeren Schnittdicken ungekühlter Paraffinblöcke entsprechen. Denkbar sind daneben Veränderungen der Eigenschaften des Paraffins oder des Darminhalts bei niedrigeren Temperaturen, die eine kleinere Schnittdicke begünstigen. Die Schnittdicke spielt im Jejunum für die Stabilität eine geringere Rolle als im Kolon. Die Instabilität ist vorrangig im Darminhalt begründet, was wiederum durch einen Mangel des zellulären Verbunds des Darminhalts verursacht werden dürfte.

Im Kolon erwiesen sich größere Schnittdicken vorteilhaft auf den Mukuserhalt. Die generell große Menge an Darminhalt führte häufig zum Zersplittern des Schnittes bei ungekühlten Proben. Die schwierigere Handhabung großer Därme könnte abhängig von der Altersauswahl der Versuchstiere bei anderen Untersuchungen einen Einfluss haben.

## Verwendete Objektträger bei den Paraffinschnitten

Ein Vorteil silanisierter Objektträger liegt in der höheren Bindungsfähigkeit des Schnittes (Mulisch und Welsch, 2010). Bei Paraffinproben war in den eigenen Untersuchungen kein Vorteil im Mukuserhalt erkennbar. Die Bindungsstellen des Gewebes an die silanisierten Objektträger könnten durch die Paraffineinbettung verändert sein. Nach der Einbettung in Paraffin ist bereits der chemische Einfluss auf den Mukus erfolgt. Der Vorteil silanisierter Objektträger bei Methacarn-fixierten Proben wurde in dieser Arbeit nicht beobachtet.

# Durchgeführte Färbungen an den Paraffinschnitten

Der relativ geringe Einfluss einzelner Färbungen auf den Erhalt des Mukus kann in der Fixierung vor der Färbung begründet liegen. Kombinationsfärbungen wie AB-PAS führten zu einer vereinfachten Abgrenzung von Glykokonjugaten (Mulisch und Welsch, 2010) und somit einer besseren Abgrenzung von Schleim zu Darminhalt bzw. zur Schleimhaut. Die Anwendung dieser Kombinationsfärbung zur Mukusdarstellung ist eine gängige Methode (Callies, 2012).

# Auswertung der Mukusschichtdicke an den Paraffinschnitten

Die Vorteile der Integralmessung gegenüber der Zehnpunktemessung wurden bereits im Kapitel 5.3.6 beschrieben.

Grundsätzlich besteht das Risiko, den Bürstensaum des Jejunums mit der Mukusschicht zu verwechseln, da sich der Bürstensaum ebenfalls PAS positiv färbt. Bei einem Schräganschnitt weist er neben der mukusähnlichen Anfärbung eine Dicke von bis zu 3 µm auf. Diese Dicke stimmt mit Messergebnissen der Mukusdicke anderer Autoren überein (Bontempo et al., 2006, Di Giancamillo et al., 2008, Le Bon et al., 2010). Die Unterscheidung ist unter Verwendung eines 100-fach Ölimmersionsobjektivs eindeutig, wobei sich der Bürstensaum radiär gestreift darstellt. Eine Abgrenzung ist auch durch die Modifikation des Feinfokus zu visualisieren. Hier werden Zellen des Epithels im schräg angeschnittenen Bürstensaum erkennbar

# 5.3.8 Anzahl der Mukusschichten

Manipulationen am Darm schließen eine restriktive Fütterung, die Gabe von Medikamenten bzw. Laxantien sowie die Präparationen von Proben nach ihrer Gewinnung ein. Diese Einflussfaktoren sind als Ursache widersprechender Ergebnisse hinsichtlich einer Ein- oder Mehrschichtigkeit des Darmschleims denkbar.

Im Jejunum wurde in den vorliegenden Untersuchungen bei der Verwendung der AB-PAS Färbung keine Zweischichtigkeit des Mukus nachgewiesen. Andere Autoren bestätigen die Ergebnisse (Bontempo et al., 2006, Le Bon et al., 2010, Ermund et al., 2013). Bei den Färbungen sowohl mit AB-PAS als auch mit dem Lektin PNA zeigte der Mukus eine Abnahme der Färbeintensität nach luminal. Dies kann auf eine Konzentrationsabnahme des MUC2-Proteins deuten, wie in der Literatur bereits beschrieben (Johansson et al., 2008). Die abnehmende Färbeintensität kann als sekundär entstandene Mehrschichtigkeit des Mukus gedeutet werden. Der Unterschied in der MUC2-Konzentration lässt sich durch eine

zunehmende Mukuszersetzung und Quellung des Mukus begründen (Cayuela, 2000, Johansson *et al.*, 2008). Bei einer *in vivo*-Studie, in der die Tiere fasteten, wurde die Zweischichtigkeit im Dünndarm beschrieben, die sich jedoch nicht kontinuierlich darstellte (Atuma *et al.*, 2001). Das Vorliegen einer Zweischichtigkeit konnte in einer späteren *in vivo*-Studie jedoch nicht bestätigt werden (Ermund *et al.*, 2013).

Im Mukus des Kolons wurde in den vorliegenden Untersuchungen eine Zweischichtigkeit des Mukus nicht nachgewiesen. Der Mukus erschien laminiert geschichtet. Becherzellen gewährleisten eine permanente Sekretion von Mukus (Kim und Ho. 2010), hierbei könnten sich aufgrund des kontinuierlichen Weitertransports des Darminhalts die einzelnen sezernierten Schichten der Krypten übereinander schieben (Johansson et al., 2013). Je weiter luminal sich der Schleim befindet, umso mehr endogene und exogene proteolytische Prozesse und Quellungseffekte sind im Mukus zu erwarten (Johansson et al., 2008). Diese Prozesse führen zum Aufbrechen des Muzingitters. Die Mukuszersetzung unterliegt einer mehrstufigen Aufspaltung durch Glykosidasen, Esterasen und Proteinasen. Der vollständige Ablauf ist bisher nicht restlos geklärt (Roberton und Wright, 1997, Cayuela, 2000, Johansson et al., 2008). Durch die Aufspaltung des Muzingitters resultieren eine Quellung des Mukus und eine Besiedlung durch Mikroorganismen. Der Mukus verliert somit an Stabilität und wird durch den Weitertransport von Darminhalt kontinuierlich abgetragen (Montagne et al., 2004, Johansson et al., 2008). Bei fehlender Abtragung, z. B. aufgrund mangelnden Darminhalts. kann eine sekundäre Mehrschichtigkeit entstehen. Eine solche Mehrschichtigkeit wurde bei restriktiver Fütterung bei Mäusen im Dickdarm beschrieben. Hierbei stellte sich die innere Schicht multilaminiert dar. Die äußere Schicht erschien wiederum gequollen und von Mikroorganismen besiedelt (Johansson et al., 2011b, Johansson et al., 2013).

Da bestimmte Darmabschnitte nicht dauerhaft mit Darminhalt gefüllt sind, ist im Jejunum eine temporäre Mehrschichtigkeit des Mukus denkbar.

Die Diskussion über die Anzahl der Mukusschichten bedarf somit einer Definition des Futterzugangs der Versuchstiere sowie der Behandlung der Darmproben.

# 5.4 <u>Einfluss unterschiedlicher Zinkkonzentrationen im Futter auf die</u> Mukusschichtdicke und Kryptentiefe des Kolons von Absetzferkeln

#### 5.4.1 Einfluss unterschiedlicher Zinkkonzentrationen im Futter auf die Mukusdicke

Futterinhaltsstoffe können die Expression bestimmter Gene im Organismus beeinflussen. Dies geschieht einerseits durch Bindung an spezifische Tranksriptionsfaktoren, andererseits durch indirekte Interaktionen vermittelt über die Freisetzung von Hormonen oder Zytokinen. Zink ist zur Bindung an spezifische Tranksriptionsfaktoren fähig und wirkt zudem als Katalysator der RNA-Polymerase (Cousins, 1998). Eine Aktivierung bestimmter Gene durch hohe Dosen von Zink kann also zu Veränderungen der Mukusschicht führen. In einer Studie an Mäusen wurde aufgrund unterschiedlicher Darmflora ein Einfluss auf die Durchlässigkeit für Mikroorganismen nachgewiesen. Als Grund wurden Mukus immunstimulierende sowie entzündungsfördernde Mechanismen bestimmter Bakterien diskutiert (Jakobsson et al., 2015). Durch Verfütterung hoher Zinkdosen ist beim Schwein ein Einfluss auf die Zusammensetzung der Muzine im Darm dargestellt worden, hierbei wurden die schleimproduzierenden Becherzellen und nicht der Mukus untersucht (Liu et al., 2014a). Eine Veränderung der mikrobiellen Besiedlung aufgrund hoher Zinkdosen wäre hierfür als Ursache denkbar (Liu, 2014). In den vorliegenden Untersuchungen wurde kein Zusammenhang zwischen der Mukusschichtdicke im Kolon von Absetzferkeln und unterschiedlichen Zinkkonzentration im Futter nachgewiesen. Die Fütterungsgruppe mit der niedrigsten Zinkkonzentration wies den höchsten Medianwert der Mukusdicke auf. Die Streuung der Mukusschichtdicke war in allen Fütterungsgruppen relativ hoch. Die Spannbreite der Werte der einzelnen Gruppen variierte um das Drei- bis Fünffache. Ein Grund für den mangelnden Einfluss Zinks auf die Mukusschichtdicke in dieser Arbeit, könnte in der untersuchten Zinkkonzentrationen liegen (47 mg Zn je kg Futter in der Kontrollgruppe), da dieser Zinkgehalt in der Literatur teilweise als marginal bedarfsdeckend angesehen wird (Büttner et al., 2013). Adverse Effekte hoher Dosen Zink auf die Reifung der Schleimhaut im Kolon von Absetzferkeln wurden in vorangegangen Untersuchungen diskutiert. Hierbei führte die Fütterung von 164 mg ZnO je kg Futter zu größeren Kryptenflächen als die Fütterung von 2425 mg ZnO je kg Futter (Liu et al., 2014a). In der vorliegenden Arbeit konnte kein Hinweis zur Auswirkung von unterschiedlichen Zinkgehalten auf die Mukusschichtdicke nachgewiesen werden. Zum Einfluss von unterschiedlichen Zinkkonzentrationen im Futter auf die Mukusschichtdicke existieren bisher keine vergleichbaren Untersuchungen, was sich unter anderem durch die Labilität des Mukus und somit der methodischen Schwierigkeit der Darstellung des Mukus erklären lässt. Hohe Zinkkonzentrationen im Futter steigerten die Anzahl an Becherzellen mit gemischt neutral-sauren Muzinen sowie die Gesamtzahl der Becherzellen im Kolon von Absetzferkeln (Liu et al., 2014a). Die Autoren werteten dies als Hinweis auf einen besseren Schutz gegen Diarrhoe und pathogene Mikroorganismen.

In Rahmen von Untersuchungen zum Einfluss der Futterstruktur auf die Darmmorphologie von Schweinen konnte gezeigt werden, dass grob vermahlenes Futter einen positiven Einfluss auf den Magen-Darm-Trakt hat (Brunsgaard, 1998, Callies, 2012). Dabei wurde die zahlenmäßige Zunahme der Becherzellen mit einer Erhöhung der Mukusproduktion gleichgesetzt (Brunsgaard, 1998). Eine Erhöhung der Mukusschichtdicke durch grob strukturiertes Futter konnte mittels morphometrischer Messungen des Mukus im Ileum und Zäkum allerdings nicht nachgewiesen werden (Callies, 2012).

Zahlreiche Publikationen, die in Tabelle 5 (Kapitel 2.6) bereits aufgeführt wurden, bestätigen die Effekte von Zink auf den Organismus. Untersuchungen zum Einfluss von oral

zugeführten Zinkmengen auf die Mukusdicke liegen beim Schwein und anderen Tierarten bisher jedoch nicht vor.

## 5.4.2 Einfluss unterschiedlicher Zinkkonzentrationen im Futter auf die Kryptentiefe

Die Kryptentiefe im Kolon blieb in den eigenen Untersuchungen von unterschiedlichen Zinkkonzentrationen im Futter unbeeinflusst. Dies stimmt mit Ergebnissen anderer Arbeiten am Dickdarm überein (Hedemann et al., 2006, Liu et al., 2014a). Ein fehlender Zusammenhang zwischen Zinkkonzentration im Futter und der Kryptentiefe kann dadurch bedingt sein, dass bereits bei oraler Gabe niedriger Zinkdosen eine Bedarfsdeckung erzielt wird, welche für die Zellerneuerung in den Krypten ausreicht (Liu et al., 2014a). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass Zink keinen Einfluss auf die Wachstumsrate von Epithelzellen hat. Denkbar ist, dass die Untersuchungen der Kryptentiefe zu einem Zeitpunkt erfolgten, an dem sich die Morphologie der Krypten bereits stabilisiert hatte (Hedemann et al., 2006). Dies bedeutet, dass vor dem Absetzen möglicherweise größere Unterschiede zu erwarten wären. Auffällig ist, dass trotz fehlender statistischer Signifikanz die Fütterungsgruppe mit der höchsten Zinkkonzentration im Mittel die niedrigsten Kryptentiefen aufwies. Das Ergebnis deckt sich mit Ergebnissen einer anderen Studie (Liu et al., 2014a) und könnte auf adverse Effekte hoher Zinkdosen auf die Entwicklung der Schleimhaut deuten. Die Autoren konnten in ihren Untersuchungen eine altersabhängige Zunahme der Kryptenflächen im Kolon von Absetzferkeln nachweisen (Liu et al., 2014a). Diese wurde mit der Reifung des Darms infolge des höheren Alters der Tiere erklärt.

Im Dünndarm wurden die Kryptentiefen und die Villuslängen in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt. Vorangegangene Studien konnten im Dünndarm keinen Einfluss unterschiedlicher Zinkfütterungshöhen auf die Kryptentiefen nachweisen (Mavromichalis et al., 2000, Li et al., 2001, Hedemann et al., 2006, Liu et al., 2014b). Zu einem möglichen Einfluss der Zinkversorgung auf die Villuslänge existieren jedoch unterschiedliche Angaben. Einige Studien wiesen einen Einfluss auf die Villuslänge nach (Li et al., 2001, Hu et al., 2012), anderen gelang dieser Nachweis nicht (Mavromichalis et al., 2000, Hedemann et al., 2006, Liu et al., 2014b).

Eine Assoziation zwischen Zink und Kryptentiefen sowie Villuslängen ist dennoch denkbar und könnte sich deutlich komplexer darstellen. Hierfür sprechen Ergebnisse einer Studie, die eine Abhängigkeit der Morphologie des Dünndarmepithels bei unterschiedlichen Zinkquellen nachwies. Diese zeigen demnach einen differierenden Einfluss auf Villuslänge und Kryptentiefe im Dünndarm (Hu et al., 2012).

# 5.5 <u>Einfluss unterschiedlicher Zinkkonzentrationen im Futter auf die</u> <u>mRNA-Expression verschiedener Gene im Jejunum und Kolon von</u> Absetzferkeln

#### 5.5.1 Expression der mRNA von MUC2

In den vorliegenden Untersuchungen wurde kein Einfluss der Fütterung verschiedener Zinkkonzentrationen auf die Expression der mRNA von MUC2 im Jejunum oder Kolon von Absetzferkeln nachgewiesen. Bisher existieren wenige und zudem widersprechende Studien zu den Auswirkungen von Futterinhaltstoffen auf die Expression der mRNA von MUC2 (Liu et al., 2014a). So führte Algenextrakt bei Ferkeln zu einer erhöhten MUC2-mRNA-Expression im Kolon (Leonard et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl im Dünndarm als auch im Dickdarm die mRNA-Expressionen von MUC2 mittels gRT-PCR bestimmt. In keinem Darmabschnitt ergaben die Messungen einen Unterschied zwischen den Fütterungsgruppen. Diese Ergebnisse decken sich mit anderen Studien, die zeigten, dass die mRNA-Expression von MUC2 in keinem der beiden untersuchten Darmabschnitte durch verschiedene alimentäre Zinkkonzentrationen bei Absetzferkeln beeinflusst wurde. Allerdings konnten die Autoren eine Steigerung der Expression mit zunehmendem Alter der Versuchstiere beobachten (Liu et al., 2014a, Liu et al., 2014b). In einer Studie an Hühnern wurde bei Untersuchungen der MUC2-mRNA-Expression in Abhängigkeit zur Zinkfütterung im lleum ebenfalls kein Unterschied ermittelt (Zhang et al., 2012). Die Fütterung von Anethol führte bei Mäusen zur Erhöhung der MUC2-mRNA-Expression im Kolon. Carvacrol und Zimtaldehyd dagegen, die ebenfalls Bestandteile pflanzlicher Zusatzstoffe sind, reduzierten die Expression von MUC2 (Wlodarska et al., 2015). MUC2-mRNA bildet die Grundlage für das MUC2 Protein, als Hauptprotein des Schleims (Johansson et al., 2008). Eine signifikant höhere Expression der MUC2-mRNA sollte demnach zu einer größeren Mukusdicke führen. Eine signifikante Steigerung der MUC2-mRNA-Menge könnte einerseits durch eine höhere Anzahl von Becherzellen entstehen. Dies würde sich gegebenenfalls in einer größeren Kryptentiefe zeigen. Andererseits wäre bei gleicher Anzahl von Becherzellen auch eine höhere Expression der mRNA denkbar. Die von Zink unbeeinflusste MUC2-Expression im Dickdarm ist verglichen mit den vorherigen Ergebnissen der Mukusdicke und der Krypten plausibel. Sowohl Kryptentiefe als auch sezernierter Mukus waren im Kolon nicht in Abhängigkeit von der Fütterung unterschiedlicher Zinkdosen verändert.

#### 5.5.2 Expression der mRNA von TFF3

Trefoil factors sind Peptide, die in den Becherzellen produziert werden (Suemori et al., 1991) und die durch vernetzende Eigenschaften zur Mukusstruktur beitragen (Tomasetto et al., 2000, Hollingsworth und Swanson, 2004). Es existieren nur wenige und in ihren Ergebnissen divergierende Studien, die sich mit der fütterungsabhängigen mRNA-Expression von Trefoil factors beschäftigen. In dieser Arbeit wurden sowohl im Jejunum als auch im Kolon die mRNA-Expressionen von TFF3 mittels qRT-PCR gemessen. In keinem Darmabschnitt konnte ein fütterungsbezogener Unterschied nachgewiesen werden. Dies bestätigen Messungen im Dünndarm von Absetzferkeln, die ebenfalls keinen Einfluss hinsichtlich unterschiedlicher Zinkfütterungshöhen auf die mRNA-Expression von TFF3 nachweisen konnten (Liu et al., 2014b). Allerdings ergaben sich Unterschiede durch die Fütterung von Ferkeln mit bovinem Kolostrum, bei denen ein positiver Einfluss auf die TFF3-mRNA-Expression in einer in vitro-Studie im Dünndarm nachgewiesen werden konnte (Huguet et al., 2007). Ein weiterer Versuch an Mäusen zeigte eine Erhöhung der TFF3-Expression bei

der Fütterung von 100 mg je kg je Tag konjugierter Linolsäure (Borniquel *et al.*, 2012). Die Gabe von 13,3 µg je ml Trinkwasser Anethol oder Paprikaextrakt verringerte demgegenüber die Expression der mRNA von TFF3 im Kolon von Mäusen (Wlodarska *et al.*, 2015). Eine bedarfsdeckende Fütterung von Zink scheint nach den eigenen Untersuchungen für die TFF3-Expression bereits auszureichen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Expression von TFF3 unabhängig vom Zinkgehalt verläuft bzw. nur infolge einer Mangelerscheinung und der damit verbundenen Infektionsanfälligkeit beeinflusst wird.

#### 5.5.3 Expression der mRNA von beta-Defensin 3

Beta-Defensine gehören zur Gruppe der antimikrobiellen Peptide und werden als protektive Faktoren im Rahmen der angeborenen Immunantwort diskutiert (Wehkamp *et al.*, 2005). Die antimikrobiellen Peptide sind eine sehr heterogene Gruppe (Corrales-Garcia *et al.*, 2011). Es existieren nur wenige Studien, die sich mit der fütterungsabhängigen mRNA-Expression von beta-Defensinen beschäftigen. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl im Jejunum als auch im Kolon die mRNA-Expressionen von beta-Defensin 3 mittels qRT-PCR ermittelt.

Im Dünndarm zeigten sich nur tendenzielle Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen, insbesondere, da die Streuung innerhalb der Gruppen vergleichsweise groß war. Zudem konnten in fünf Proben keine Messwerte ermittelt werden. Die Gruppe mit dem höchsten Zinkanteil im Futter wies den höchsten Gehalt an mRNA von beta-Defensin 3 auf. Darauf folgte die Fütterungsgruppe ohne Zusatz von Zinkoxid, gefolgt von der mittleren Fütterungsgruppe. In einer anderen Studie war die mRNA-Expression von beta-Defensin 3 bei hoher Zinkfütterung (2425 mg ZnO/kg TM) reduziert, während die bedarfsdeckend versorgte-Gruppe (164 mg ZnO/kg TM) die höchste Expression zeigte (Liu et al., 2014b). Eine weitere Studie untersuchte den Einfluss von Zinksulfat an kultivierten Epithelzellen der IPEC-J2 Zelllinie des Dünndarms von neonatalen Ferkeln und zeigte erhöhte Expressionen der mRNA von beta-Defensin 1, 2 und 3 bei der Behandlung mit 100 µmol je ml Zinksulfat für zwölf Stunden. Ein Rückgang dieser Expressionen war bei der Behandlung mit 250 und 500 µmol je ml Zinksulfat zu verzeichnen (Mao et al., 2013).

Der Einfluss einer unterschiedlichen Zinkaufnahme auf die beta-Defensin 3-Expression bleibt demnach umstritten. In den eigenen Untersuchungen verzerrte die hohe Streuung der Daten innerhalb der Gruppen als auch fehlende Werte die Aussagekraft der Messungen. Denkbar wäre, dass die bedarfsdeckende Fütterung von Zink für eine beta-Defensin 3-Expression bereits ausreicht.

Im Dickdarm war kein Unterschied zwischen den Gruppen bei Verfütterung verschiedener Zinkkonzentrationen nachweisbar. Die Werte unterlagen wie im Jejunum innerhalb der Fütterungsgruppen einer hohen Streuung. Unter fünf Proben, für die keine Messwerte bestimmbar waren, befanden sich zwei Tiere, bei denen bereits im Dünndarm keine beta-Defensin 3-mRNA zu ermitteln war. In einer der wenigen verfügbaren Studien, die sich mit der Expression von beta-Defensinen im Dickdarm beschäftigt, konnte bei einer *in vitro*-Untersuchung an kultivierten humanen Kolonzellen eine erhöhte Expression von beta-Defensin 1 durch eine Behandlung mit Arginin, Isoleucin sowie Albumin nachgewiesen werden (Sherman *et al.*, 2006). Es bleibt zu hinterfragen, ob ein Einfluss von Zink auf die Expression von beta-Defensin 3 existiert oder ggf. aufgrund von Mangelerscheinungen oder Sekundärerkrankungen bei niedrigen Zinkkonzentrationen entstehen kann.

# 5.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Schweine spielen als Nutztier traditionell in vielen Regionen weltweit eine herausragende Rolle. Die Zeit nach dem Absetzen der Ferkel ist wegen häufig auftretender Darmerkrankungen eine kritische Phase und somit sowohl betriebswirtschaftlich als auch ethisch relevant. Durch eine Reihe wissenschaftlicher Untersuchungen wurde eine beachtliche Bandbreite an Wirkungen des Spurenelements Zink auf den Organismus abgeleitet. Untersuchungen der Auswirkungen von Zink auf die intestinale Mukusschichtdicke existieren bisher nicht.

Mukus nimmt als eine der ersten Abwehrbarrieren vor der Epithelschicht eine Schlüsselrolle für die Darmgesundheit ein. Die histologische Darstellung des Schleims wird in der Literatur mit einer Vielzahl differierender histologischer Methoden beschrieben. Auch wenn viele Studien ähnliche Methoden verwenden, ist für die Vergleichbarkeit erhobener Messdaten ein nachvollziehbares und reproduzierbares Verfahren zur Darstellung des Mukus zwingend erforderlich. Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die wesentlichen methodischen Verfahrensschritte am Kolon und am Jejunum aus der Literatur zu systematisieren und einer kritischen Betrachtung zu unterziehen.

Eine Methode zum Erhalt des Mukus wurde im Kolon und Jejunum erfolgreich etabliert. Eine morphometrische Dickenmessung war iedoch nur im Kolon möglich. Das Jeiunum war aufgrund mangelnden Darminhalts und mangelnder luminaler Begrenzung des Mukus nicht auswertbar. Die Gründe hierfür liegen weniger in der unzureichenden histologischen Methodik als vielmehr in der Physiologie in diesem Bereich des Dünndarms, der keine dauerhafte Füllung mit Darminhalt aufweist. Es ist denkbar, dass die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Methodik im Ileum bessere Ergebnisse liefern könnte, überprüft wurde dies in den eigenen Untersuchungen jedoch nicht. Neben der Etablierung eines Fixierungsund Färbeprotokolls zur Darstellung des Mukus im Kolon wurde der Effekt der Gabe unterschiedlicher Zinkkonzentrationen auf die Darmmorphologie und mRNA-Expression mehrerer Gene untersucht. Aus den vorliegenden Untersuchungen konnte kein Einfluss unterschiedlicher Zinkgehalte im Futter auf die Schichtdicke des sezernierten Mukus im Kolon abgeleitet werden. Auch die Expression des Hauptproteins MUC2 war sowohl im Jeiunum als auch im Kolon unverändert. Die Ergebnisse der morphometrischen Auswertung der Kryptentiefen im Kolon bestärken Hinweise auf den fehlenden Einfluss bedarfsdeckender bzw. -überschreitender Zinkkonzentrationen. Die Expressionsmuster zweier antimikrobiell wirkender Peptide (Trefoil factor 3 und beta-Defensin 3) wiesen sowohl im Jejunum als auch im Kolon keine nachweisbaren Unterschiede auf. Lediglich im Jejunum war die Expression von beta-Defensin 3 bei der höchsten Zinkkonzentration im Futter tendenziell erhöht. Dieses Ergebnis kann jedoch auch als zufälliger Effekt gewertet werden. Gegebenenfalls sind Effekte einer unterschiedlichen Versorgung mit Zink auf die untersuchten Parameter bereits durch bedarfsgerechte Dosierungen ausgeschöpft.

# 6. Kapitel VI: Zusammenfassung / Summary

# 6.1 Zusammenfassung

Thema: Etablierung eines histologischen Protokolls zur intestinalen Mukusdarstellung sowie Untersuchungen des Einflusses unterschiedlicher Zinkaufnahmen auf den Mukus im Darm von Absetzferkeln

Die Förderung der Tiergesundheit ist aus ökonomischen sowie ethischen Aspekten ein zentrales Anliegen wissenschaftlicher Untersuchungen. In der Schweineaufzucht ist das Absetzen der Ferkel von der Sau eine besonders kritische Phase, insbesondere hinsichtlich der Darmgesundheit. Eine bedarfsüberschreitende Fütterung des Spurenelements Zink erwies sich in wissenschaftlichen Untersuchungen als wirksam gegen Durchfall nach dem Absetzen und zeigte positive Auswirkungen auf die Futteraufnahme und Gewichtszunahme sowie Einfluss auf die Mukuszusammensetzung im Darm. Der Mukus wird von Becherzellen produziert und stellt eine wichtige physikalische und immunologische Barriere vor dem Schleimhautepithel dar. Da bisher keine Untersuchungen zu Auswirkungen von Zink auf die intestinale Mukusschichtdicke vorliegen, war das Ziel dieser Arbeit, den Effekt unterschiedlicher alimentärer Zinkdosen auf die Mukusschichtdicke und die Kryptentiefe der Schleimhaut im Kolon sowie der Expression verschiedener Peptide des Mukus im Jejunum und im Kolon von Absetzferkeln zu untersuchen. Die histologische Darstellung und Quantifizierung des Mukus ist aus methodischer Sicht äußerst schwierig. Zudem existiert eine Vielzahl von Nachweismethoden, deren Spektrum von den üblichen histologischen Fixierungsprotokollen bis zu aufwendigen in vivo-Untersuchungen reicht, sodass eine Vergleichbarkeit der jeweiligen Ergebnisse nicht uneingeschränkt möglich ist. Vor diesem Hintergrund war die Etablierung eines optimierten Fixierungs- und Färbeprotokolls zur intestinalen Mukusschichtdarstellung ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 24 gesunde, früh abgesetzte Ferkel im Alter vom 25. bis 38. Lebenstag, davon 12 Tiere weiblich und 12 Börge. Die Säugeperiode betrug Mittel 25 Tage. Während der Säugeperiode wurde den Ergänzungsfuttermittel angeboten. Die Aufzucht erfolgte in klimatisierten Ferkelaufzuchtställen (Vollspalten-Flatdeck) mit zwei Ferkeln je Einzelbucht. Es wurden jeweils acht Ferkel (vier Börge, vier weibliche Tiere) gleichmäßig auf drei Versuchsgruppen mit und ohne Zulage von Zinkoxid in unterschiedlichen Dosierungen aufgeteilt (A = 0 mg ZnO/kg Futter, B = 100 mg ZnO/kg Futter, C = 1000 mg ZnO/kg Futter). Die Aufzuchtperiode betrug zwei Wochen. Hierbei wurden ein Alleinfuttermittel sowie Wasser ad libitum angeboten. Unmittelbar nach der Tötung der Tiere wurden Proben des mittleren Jeiunums und aszendierenden Kolons entnommen und umgehend physikalisch mittels flüssigem Stickstoff oder chemisch mittels Methacarn, probeweise auch mittels Carnoy und Bouin fixiert.

Stickstofffixierte Schnitte wurden anschließend mit einer Hitzeplatte dehydriert. Neben der probeweisen Durchführung von Direktfärbungen wurden die histologischen Gefrierschnitte in der Regel vor der Färbung mittels Paraformaldehyddampf (PFA), vierprozentiger neutral gepufferter Formalinlösung (4%NBF), Ethanol und weiteren Fixationen postfixiert. Bei der

anschließenden Färbung wurden Alcianblau, PAS, Alcianblau-PAS, Hämatoxylin-Eosin, Astrablau und verschiedene Lektine verglichen.

Die Ermittlung der Mukusschichtdicke erfolgte einerseits über eine "Zehnpunktemessung" senkrecht zum Epithel bis zum Darminhalt. Zum anderen wurde die Mukusfläche durch Bildung eines Polygons als Ganzes berechnet und die berechnete Fläche durch die Länge der darunter liegenden Schleimhaut dividiert ("Integralmessung").

Anschließend wurde die Auswirkung unterschiedlicher Zinkdosen im Futter von Absetzferkel auf die Schichtdicke des Mukus sowie die Kryptentiefe im Kolon untersucht. Darüber hinaus wurden die Expressionshöhen der mRNA von MUC2, Trefoil factor 3 sowie beta-Defensin 3 mittels qRT-PCR im mittleren Jejunum und im aszendierenden Kolon analysiert.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Gefrierfixierung durch Stickstoff zu einem zuverlässigen Mukuserhalt führte. Bei Verwendung von Methacarn waren in der Regel Ablösungen des Darminhalts sowie der Mukusschicht von der Darmwand zu beobachten. Der Vergleich der Mukusschichtdicke nach Gefrier- oder chemischer Fixierung ergab keinen Unterschied. Der entscheidende Vorteil der Gefrierfixierung lag in der überwiegend intakten Schichtung von Darmwand – Mukus – Darminhalt.

Die Postfixation der Gefrierschnitte erwies sich als notwendig für den Mukuserhalt. Der Vergleich von Ethanol, 4%NBF und PFA als Postfixationen ergab keinen Unterschied in den gemessenen Mukusschichtdicken. Dagegen hatte die Auswahl der anschließenden Postfixation einen Einfluss auf die Mukusdarstellung. PFA zeigte gegenüber Ethanol und 4%NBF eine laminare Schichtung des Mukus im Kolon, der dem bisherigen Verständnis des Schleims entspricht. In der anschließenden AB-PAS-Färbung wurde keine Abhängigkeit der Mukusdicke von unterschiedlichen pH-Werten der Alcianblaulösung nachgewiesen. Alcianblau pH 2,5-PAS wurde jedoch aufgrund der vollständigen Löslichkeit des Färbemittels gegenüber Alcianblau pH 0,5-PAS bevorzugt. Auch die Auswertung der Mukusschichtdicke mittels Zehnpunkte- bzw. Integralmessung ergab keinen Einfluss auf die Messergebnisse der Mukusschicht. Durch die Bildung eines Polygons ist die Integralmessung wahrscheinlich mathematisch präziser und verringert die Gefahr von Ergebnisverzerrungen.

Die Parameter für die favorisierte Methode lassen sich wie folgt definieren:

- Verwendung von Absetzferkeln bei ad libitum-Fütterung.
- Vorsichtige Probenentnahme unmittelbar post mortem.
- Verwendung der Gefrierfixierung des intakten Darmrohres durch Stickstoff, ohne Spülung des Darms oder andere Gewebepräparationen.
- Schneiden der Proben im Kryostaten und Aufziehen der Schnitte auf vorgewärmte (50 °C), silanisierte Objektträger.
- Trocknung der Schnitte auf einer Hitzeplatte (mindestens 30 min bei 50 °C) und anschließende Postfixation mittels Paraformaldehyddampf für 6 h bei 60 °C im Brutschrank.
- Färbung der histologischen Schnitte mittels Alcianblau pH 2,5-PAS und Eindecken mittels Roti-Histokitt.
- Messung und Auswertung der Mukusschichtdicke mittels "Integralmessung".

Im Jejunum konnte Mukus auf diese Weise histologisch dargestellt werden. Allerdings war in diesem Darmabschnitt aufgrund mangelnder Begrenzung durch Chymus keine morphometrische Schichtdickenmessung möglich. Für weitere Studien am Dünndarm ist die

Auswahl eines anderen Darmsegments oder eine gezielte letztmalige Fütterung zur Herstellung eines gefüllten Jejunums denkbar.

Hinsichtlich der Fütterung unterschiedlicher Zinkdosen wurde im Kolon kein Einfluss auf die Mukusdicke, die Kryptentiefe oder die MUC2-Expression nachgewiesen. Bei Betrachtung der Kryptentiefe als einen Parameter für die Anzahl der Becherzellen bzw. die MUC2-Expression als einen Parameter für die Aktivität der Becherzellen, erscheint plausibel, dass die Mukusschichtdicke von unterschiedlichen Zinkgehalten unbeeinflusst blieb. Die MUC2-Expression im Jejunum sowie die Expression von Trefoil factor 3 im Jejunum und im Kolon wiesen ebenfalls keinen Einfluss unterschiedlicher Zinkgehalte im Futter auf. Lediglich die Expression von beta-Defensin 3 im Jejunum zeigte sich bei hoher Zinkfütterung tendenziell erhöht. Auffällig ist die hohe Streuung der Messungen innerhalb der Gruppen. Dieses Ergebnis ist somit eher als zufälliger Effekt der Messdatenverteilung zu interpretieren.

In der vorliegenden Arbeit war der Mukuserhalt abhängig von der Auswahl des Fixierungsprotokolls. Die Verwendung der Gefrierfixierung mit anschließender Dehydration auf einer Hitzeplatte sowie Verwendung von Paraformaldehyddampf als Postfixation führte im Kolon zu einem zuverlässigen Mukuserhalt und ergab reproduzierbare Ergebnisse. Chemische Fixierungen wie Methacarn oder Carnoy waren für den Mukuserhalt nicht geeignet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten zur Etablierung eines "Goldstandards" für die histologische Mukusdarstellung im Kolon von Schweinen beitragen.

Die Auswertung der Fütterung unterschiedlicher Zinkdosen zeigte keinen Einfluss auf die Mukusschichtdicke im Kolon von Absetzferkeln.

# 6.2 Summary

Subject: Establishing a histological standard protocol for the depiction of intestinal mucus, and an examination of the influence of different zinc intakes on the mucus in the intestines of weaned piglets

Promoting animal health is a central concern in scientific research, for economical as well as ethical reasons. In pig breeding, the period after weaning is particularly critical, especially with regard to intestinal health. Feeding the trace element zinc in amounts above the normally required level has been proven by scientific studies to be effective in preventing diarrhoea after weaning and has shown positive effects on food intake and weight gain as well as an effect on the mucus consistency in the colon.

Mucus is produced by goblet cells and is an important physical and immunological barrier to the epithelium of mucosa. As there are no studies to date about the effect of zinc on the thickness of the intestinal mucus layer, the aim of this thesis was to examine the effects of different alimentary zinc dosages on the mucus layer thickness, crypt depth of the intestinal mucosa in the colon and the expression of different mucus peptides in the jejunum and the colon of weaned piglets.

The histological description and quantification of the mucus is very difficult from a methodological point of view. In addition, there are a large number of standard protocols ranging from the usual histological fixation method to complex *in vivo* studies, so that the various results may not lend themselves to direct comparison. Therefore, the establishing of an optimised fixation and staining standard protocol for the intestinal mucus layer was another focus of this thesis.

The test animals were 24 healthy piglets, which had been weaned early and were between 25 and 38 days old. 12 were female, 12 male. The lactation period was 25 days on average. During the lactation period the piglets were offered no feed supplements. They were bred in climatized pig breeding stables with two piglets per bay. Three test groups of eight piglets (four males, four females each) were formed and given various amounts of zinc oxide (respectively: A = 0 mg ZnO per kg of feed, B = 100 mg ZnO per kg of feed, C = 1000 mg ZnO per kg of feed). During the two-week feeding period, feed and water were offered ad libitum. Immediately after putting the animals to death, specimens of the middle part of the jejunum and ascending colon were taken and instantly fixed by means of liquid nitrogen, or chemically by means of methacarn, and, for test purposes, of Carnoy's and Bouin's solutions.

Nitrogen fixed specimens were then dehydrated by means of a heating plate. Apart from direct staining on a trial basis, the histological frozen sections were, as a rule, postfixed before the staining using paraformaldehyde vapour (PFA), a 4% neutrally buffered formalin solution (4%NBF), ethanol, and other fixations. In the staining, Alcian blue, PAS, Alcian blue/PAS, haematoxylin-eosin, Astra blue and various lectins were compared.

In order to determine the thickness of the mucus layer, two methods were compared. Firstly, a "ten point measurement" was performed where the mucus layer thickness between the epithelium and the colon contents was measured at ten points, vertically to the epithelial layer. Secondly, the mucus area as a whole was calculated by forming a polygon and dividing the calculated area by the length of the mucosa underneath ("calculus / integral measurement").

Subsequently, the effect was examined which different doses of zinc in the feed of weaned piglets have on the mucus layer thickness and the crypt depth in the colon. Furthermore, the expression of MUC2, trefoil factor 3 as well as beta-defensin-3 mRNA were analysed by means of the reverse transcription quantitative PCR in the middle section of the jejunum and the ascending colon.

The results showed that the nitrogen freeze fixation resulted in reliable mucus preservation. When using methacarn, a detachment of the colon contents and the mucus layer from the intestinal epithelium could generally be observed. The comparison of the mucus layer thickness after nitrogen or after chemical fixation returned no differences. The decisive advantage of freeze fixation is the largely intact layering of: intestinal epithelium - mucus - colon contents.

The postfixation of the freeze specimens proved necessary for the preservation of the mucus. The comparison of ethanol, 4% NBF and PFA as postfixations showed no differences between the measured mucus layer thicknesses. However, the choice of the subsequent postfixation had an effect on the description of the mucus. Unlike ethanol and 4% NBF, PFA displayed a laminar layering of the mucus in the colon which corresponds to the hitherto existing understanding of the mucus.

In the subsequent AB-PAS staining, a dependency of the mucus thickness on the different pH-values of the Alcian blue solution could not be detected. However, Alcian blue with a pH-value of 2.5-PAS was preferred to Alcian blue with a pH-value of 0.5-PAS due to its complete solubility. The evaluation of the mucus layer thickness by means of the 10 point measurement vs. the calculus / integral measurement returned no effect either on the measurement results of the mucus layer. The calculus method based on the polygon is probably mathematically more precise and reduces the risk of result distortion.

The parameters of the favoured method can be defined as follows:

- use of weaned piglets with ad libitum feeding
- careful specimen-taking immediately post mortem
- use of freeze fixation of the intact colon by means of nitrogen, without rinsing the colon or preparing the tissue in any other way
- sectioning of specimens in the cryostat and mounting them on silanized slides preheated to 50°C
- drying of specimens on a heating plate (30 mins minimum at 50°C) and subsequent postfixation by means of paraformaldehyde vapour for 6 hours at 60°C in the incubator
- staining of histological specimens by means of Alcian blue pH 2.5-PAS and covering them with Roti-Histokit
- measuring and evaluating the mucus layer thickness by means of the "calculus / integral measurement".

In the jejunum, mucus could be described histologically by use of the favoured method. However, a morphometric layer thickness measurement was not feasible in this section of the colon because of interference with chyme. For further studies on the small intestine, the

selection of a different colon segment or a targeted last feed for the purpose of a filled jejunum are conceivable.

Concerning the feeding of different doses of zinc, there was no effect on the mucus thickness, the crypt depth or the MUC2 expression. Regarding the crypt depth as a parameter for the number of goblet cells or the MUC2 expression as a parameter for the activity of the goblet cells, it seems plausible that the mucus layer thickness remained unaffected by different zinc contents. The MUC2 expression in the jejunum or the expression of trefoil factor 3 in the jejunum and the colon were not affected, either, by different zinc contents in the feed. Only the expression of beta-defensin-3 in the jejunum appeared tendentiously increased with a high zinc dosage. There is a striking variance in the measurements within the groups. As a consequence, this result can be considered as a coincidental effect of the dispersal of the measured data.

In this study, the mucus preservation proved dependent on the choice of the fixation method. Using freeze fixation with subsequent dehydration on a heating plate as well as postfixation by means of paraformaldehyde vapour led to reliable mucus preservation in the colon with reproducible results. Chemical fixations by means of methacarn or Carnoy's solution proved unsuitable. These studies might serve as a contribution to establishing a "Gold Standard" for the histological description of mucus in the colon of pigs.

The analysis of different zinc dosages in the feed returned no relation to the thickness of the mucus layer in the colons of weaners. The positive effects of zinc on the quantity of the secreted mucus may already be exhausted by feeding the normally required concentration. It is possible that zinc only has an effect on the quality and thereby the composition of the mucus.

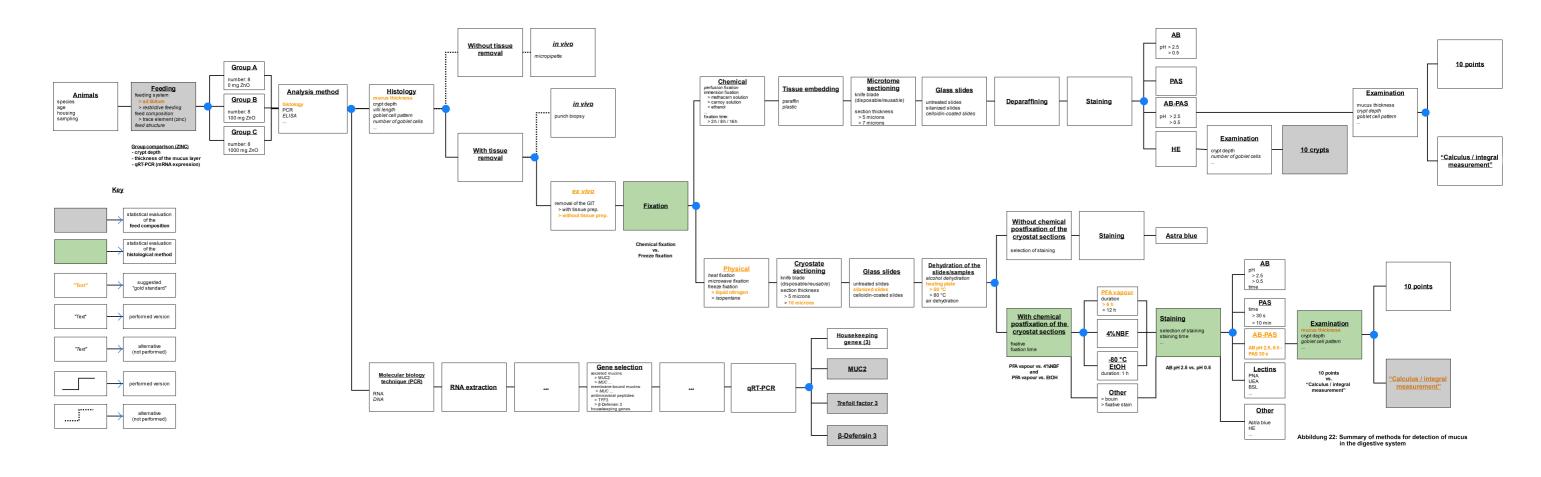


Abbildung 22: Summary of methods for detection of mucus in the digestive system

# 7. Protokolle

# 7.1 Protokolle der Gefrierfixierung

# 7.1.1 Postfixationsprotokolle der Gefrierschnitte

**Protokoll 1:** 4%iges neutral gepuffertes Formalin (4%NBF)

Herstellung der 4%NBF-Fixation:

11 ml 37 % Formol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

+ 50 ml doppelt konzentrierte PBS-Lösung, aus Pulver angesetzt (VWR, Radnor, USA);

ad 100 ml (Auffüllung mit Aq.bidest.)

Anschließend Kühlung auf 4 °C.

Fixation mittels 4%NBF:

Einstellen der Objektträger in die Fixationslösung 2 h bei 4  $^{\circ}$ C Spülung in PBS (einfach konzentriert) 2 x 5 min Spülung in Aq. bidest. 2 x 2 min Weiter mit Färbung

#### Protokoll 2: 100%iges Ethanol

Herstellung der Ethanol-Fixation:

100 % Ethanol (Berkel, Ludwigshafen, Deutschland) in Küvette ca. 2 h vorkühlen auf -80 °C im Tiefkühlschrank.

Fixation mittels Ethanol:

Einstellen der Objektträger in die Fixationslösung 1 h bei -80 °C Trocknung auf Trockenplatte bei 50 °C 30 min Weiter mit Färbung

#### Protokoll 3: Paraformaldehyddampf (PFA)

Herstellung der PFA-Fixation:

1 Löffel PFA (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf den Boden der Küvette geben.

Darüber zur Abdeckung unter der Färbebank 1 Stück Papier (Roth, Karlsruhe, Deutschland) legen.

Fixation mittels PFA:

Färbebank in Küvette stellen und mittels Parafilm abdichten

Fixierung der Schnitte über Nacht / 6 h

bei 60 °C \*

Schnitte unter Abzug abkühlen und entgasen 30 min

Anschließend entweder:

- Lagerung (bis zu mehreren Wochen)

Weiterverarbeitung:

Spülung in PBS (einfach konzentriert) 2 x 5 min Spülung in Aq.bidest. 2 x 2 min

Weiter mit Färbung

<sup>\*</sup> Aufheizung ab Einstellung der Küvette im Brutschrank (Heraeus B 5042, Hanau, Deutschland)

# Protokoll 4: Färbung ohne Postfixation

Celloidinbeschichtung: \*

OT eintauchen in Ether / abs. Ethanol 1:1 wenige sek
0,2 % Celloidin (Merck, Darmstadt, Deutschland) 1 min
OT ablaufen lassen in Ether / abs. EtOH 1:1 \*\*
80 % Ethanol 1 min
Spülung in Aq. bidest. 2 min

Anschließend Färbung: AB 2,5 – PAS siehe Färbung

# Direktfärbung:

Hierbei wurden die Objektträger direkt nach der Lufttrocknung mit Astrablau gefärbt.

# Protokoll 5: Färbung in fixierender Farbstofflösung

Astrablaulösung

Herstellung der Astrablaulösung:

1 ml 37 % Formol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

+ 4 ml Astrablau (Chroma, Waldeck, Münster, Deutschland) 0,5 % in 2,0 % wässriger Weinsäurelösung (L+-Weinsäure, Merck, Art. Nr. 100804)

# Färbung mittels Astrablaulösung:

OT liegend auf der Bank in feuchter Kammer

Färbelösung auftropfen 10 min \* nach Trocknung auf Hitzeplatte bei 50 °C 30 min

#### Alcianblaulösung

Herstellung der Alcianblaulösung:

11 ml 37 % Formol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

+ 39 ml Alcianblau 0,5 % in 0,1 M HCl pH 1,0

#### Färbung mittels Alcianblaulösung:

Schnitte ohne Lufttrocknung direkt nach Aufziehen in die Lösung2 h \*Spülung in 0,1 M HCI20 sekSpülung in PBS2 x 5 minSpülung in Aq. bidest.2 min

Entwässerung, Roti-Histokitt (Roth, Karlsruhe, Deutschland) siehe Färbung

#### 7.1.2 Protokolle zur Färbung der Gefrierschnitte

# Protokoll 6: Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)

Herstellung der Reagenzien PAS:

1 % wässrige Periodsäure (aus Periodäure, Merck, Darmstadt, Deutschland) (frisch angesetzt mittels Rührfisch), bis zur vollständigen Lösung.

<sup>\*</sup> Die Celloidinbeschichtung wurde probeweise vor sowie nach dem Aufziehen der histologischen Schnitte durchgeführt. Im zweiten Fall würde die Celloidinbeschichtung als Postfixation betrachtet werden können, da der Schnitt zusätzlich fixiert wird

<sup>\*\*</sup> bis Tropfen zähflüssig sind

<sup>\*</sup> Bei Raumtemperatur

Nutzung von Schiff'sches Reagenz (Merck, Art. Nr. 9033; frische Lösung) sowie Hämalaun nach Mayer (Roth, Karlsruhe, Deutschland) als Gegenfärbung.

Anschließend Eindeckung mittels Roti-Histokitt (Roth, Karlsruhe, Deutschland).

#### PAS-Färbung:

1% wässrige Periodsäure 10 min Spülung in Aq. bidest 3 x 2 min

Färbung in Schiff'sches Reagenz im Dunklen \*\* 10 sek / 45 sek /5 min / 10 min\*

Spülung in fließenden Leitungswasser 5 min / 10 min Spülung in Ag. bidest 2 x 2 min Färbung in Hämalaun n. Mayer \*\* 5 min \*\*\* Bläuung in fließendem Leitungswasser 10 min \*\*\* 70 % Ethanol 2 min 80 % Fthanol 2 min 96 % Ethanol 5 min 100 % Ethanol 10 min Xylol 2 x 5 min

Roti-Histokitt

\* Es wurde die Färbung mit unterschiedlichen Färbezeiten verglichen

\*\* Bei Raumtemperatur

# Protokoll 7: Alcianblau (AB)

Herstellung der Reagenzien AB pH 2,5:

Alcianblau (Chroma, Waldeck, Münster, Deutschland) 1,0% ig lösen in 3 % Essigsäure durch Rührfisch, bis zur vollständigen Lösung. Anschließend Filtration durch Filterpapier (Rotilabo®-Rundfilter, Typ 111A, Ø 185 mm, Roth, Karlsruhe, Deutschland).

#### AB pH 2,5-Färbung:

Einstellen in 3 % Essigsäure 3 min bei \* Färbung in Färbelösung 2 h / 5 h / 12 h \* Spülung in 3 % Essigsäure 30 sek Spülung in Ag. bidest 3 x 2 min 70 % Ethanol 2 min 80 % Ethanol 2 min 96 % Ethanol 5 min 100 % Ethanol 10 min Xylol 2 x 5 min

<sup>\*\*\*</sup> Zum Teil wurde diese Gegenfärbung ausgelassen

<sup>\*</sup> Bei Raumtemperatur

Herstellung der Reagenzien AB pH 0,5:

Alcianblau (Chroma, Waldeck, Münster, Deutschland) 1,0% ig lösen in 0,2 M Salzsäure durch Rührfisch, bis zur vollständigen Lösung. Anschließend Filtration durch Filterpapier (Rotilabo®-Rundfilter, Typ 111A, Ø 185 mm, Roth, Karlsruhe, Deutschland).

# AB pH 0,5-Färbung:

Einstellen in 0,2 M Salzsäure 3 min bei \* Färbung in Färbelösung 2 h / 5 h / 12 h \* Spülung in 0,2 M Salzsäure 30 sek 3 x 2 min Spülung in Ag. bidest 70 % Ethanol 2 min 80 % Fthanol 2 min 96 % Fthanol 5 min 100 % Fthanol 10 min Xvlol 2 x 5 min

Eindecken mit Roti-Histokitt

#### Protokoll 8: Alcianblau-PAS

Herstellung der Reagenzien AB-PAS:

Siehe oben "Färbung AB pH 0,5/2,5" und "Färbung PAS" \*

# AB-PAS-Färbung:

Einstellen in 3 % Essigsäure / 0,2 M Salzsäure

Färbung in AB-Färbelösung

Spülung in 3 % Essigsäure / 0,2 M Salzsäure Spülung in Aq. bidest 1% wässrige Periodsäure Spülung in Aq. bidest

Färbung in Schiff'sches Reagenz im Dunklen

Spülung in fließenden Leitungswasser

Spülung in Aq. bidest 70 % Ethanol 80 % Ethanol 96 % Ethanol 100 % Ethanol Xylol

Roti-Histokitt

\* Ohne Verwendung von Hämalaun nach Mayer

3 min bei \*\*
2 h / 5 h / 12 h \*\*

30 sek 3 x 2 min 10 min 2 x 2 min

10 sek / 30 sek / 5 min / 10 min \*\*

5 min / 10 min 2 x 2 min 2 min 2 min 5 min 10 min 2 x 5 min

<sup>\*</sup> Bei Raumtemperatur

<sup>\*\*</sup> Bei Raumtemperatur

#### Protokoll 9: Lektine

Herstellung der Reagenzien:

Lektin: Peanut-Agglutinin, Biotinylated (Linaris, Dossenheim, Deutschland), Stammlösung: 5 mg lösen in Aq. dest, Lagerung der Aliquots bei -20  $^{\circ}$ C. Endkonzentration: 5-20  $\mu$ g in TBS empfohlen.

Ethanol 96 %-absol

Blockreagenz: 3 % BSA-LSG in TBS (Biotinfrei)

Korrespondierender Zucker: Galaktose + N-Acetylgalactosamin 200 mM in TBS + 1 % BSA

PBS-Puffer nach Dulbecco (Serva, Heidelberg, Deutschland)(0,02 M)

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

Inkubationspuffer: Lektin in 1 % BSA in TBS (Biotinfrei)

StrepABComplex/HRP von Dako K 0377: 2,5 ml TBS in Flasche geben + 20 µl Reagenz A+

20 µl Reagenz B, gut mischen, 30 min stehen lassen; 3 Tage bei 4 °C lagern

HRP-Nachweis: 10 mg DAB (Tablette von Sigma, St. Louis, USA) in 10 ml PBS pH 7,6 lösen. Filtration durch Filter SS 593. Vor Gebrauch 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>0<sub>2</sub> (30 %) /10 ml zusetzen, End-pH 7.6.

Lektin-Färbung:

Spülung in TBS 10 min \* Vorinkubation 3 % BSA in TBS 20 min

1 µl Lektin in 1 ml TBS+1 % BSA => verdünnen 1:20 in TBS+1 % BSA

\*\*

je Schnitt ca. 40 μl aufgeben

Inkubation über Nacht, 4 °C, feuchter

Spülung in TBS 2 x 3 min
Strept/ABC-Komplex (10 μl / 10 μl in 1 ml PBS) 45 min, 4 °C
Spülung in PBS 2 x 3 min \*\*\*
Spülung in Aq. bidest 2 min
70 % Ethanol 2 min

70 % Ethanol 2 min
80 % Ethanol 2 min
96 % Ethanol 5 min
100 % Ethanol 10 min
Xylol 2 x 5 min

# Roti-Histokitt

\* Alternativ zu diesem Schritt erfolgte eine Neuraminidase-Behandlung mit folgenden Schritten:

Na-Acetatpuffer pH 5,5 0,1 % CaCl2 20 Minuten

Neuramidase 1/3 in Na-Acetatpuffer 0.1 % CaCl2 über Nacht 37 °C

über Nacht 37 °C

In der negativ-Kontrolle wurde das Lektin mit D-Galaktose + N-Acetylgalactosamin (200 mM) in TBS + 1 % BSA vorinkubiert, bevor es auf die Objektträger aufgegeben wurde

<sup>\*\*\*</sup> Bei Raumtemperatur

#### Protokoll 10: Hämatoxylin-Eosin (HE)

Herstellung der Reagenzien:

Hämalaun nach Mayer:

Hämatoxylin (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 1 g auf Magnetrührer lösen in Aq. bidest. 1000 ml Natriumjodat (Na JO3) (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 200 g und Kalialaun (Kaliumaluminiumsulfat-Dodecahydrat) (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 50 g zugeben und lösen => Farbe der Lösung blauviolett Chloralhydrat (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 50 g und Zitronensäure (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 1 g zugeben und lösen => Farbumschlag nach rotviolett.

Lösung sofort gebrauchsfertig. Vor Gebrauch filtrieren. Haltbarkeit der Lösung (in gut verschlossener Flasche) ca. 1 Jahr.

# Eosin:

Eosin 0,1 % in Aq. bidest.: 0,2 g Eosin (gelblich) lösen in 100 ml Aq. bidest. Vor Gebrauch filtrieren. Bei schlechtem Färbeerfolg Lösung ansäuern: 1 Tropfen Eisessig (100 % Essigsäure) zusetzen. Lösung 1-2 Monate haltbar; bei Trübung verwerfen. Anschließend Eindeckung mittels Roti-Histokitt (Roth, Karlsruhe, Deutschland).

# HE-Färbung:

Einstellen in Mayer`s Hämalaun	5 min
Spülung in Leitungswasser	10 min
Spülung in Aq.bidest.	1 min
Einstellen in Eosin	7 min
Spülung in Aq.bidest.	30 sek
70 % Ethanol	30 sek
80 % Ethanol	30 sek
90 % Ethanol	30 sek
96 % Ethanol	2 x 1 min
100 % Ethanol	2 x 1 min
Spülung in Xylol	2 x 5 min
Eindecken mit Roti-Histokitt	

# 7.2 Protokolle der chemischen Fixierungen

# 7.2.1 Protokolle zur Probenvorbereitung

#### Protokoll 11: Entwässerung

Reagenzien: 99 % Ethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland), Methanol (Sigma), Xylol (Roth, Karlsruhe, Deutschland), Paraffin (Leica, Wetzlar, Deutschland)

99 % Ethanol	2 x 30 min
Methanol	2 x 20 min
Xylol	2 x 15 min
Einlegen in Einbettkästchen in Paraffin 60 °C	über Nacht

# Protokoll 12: Entparaffinierung

Reagenzien: Xylol (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 70/80/96/100 % Abs. Ethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland), Aq. bidest

Xylol I	10 min
Xylol II	10 min
100 % Ethanol	2 x 3 min *
96 % Ethanol	3 min
80 % Ethanol	3 min
70 % Ethanol	3 min
Aq. bidest. I	3 min
Aq. bidest. II	3 min
Aq. bidest. I	3 min

<sup>\*</sup> Dieser Schritt ist auch mittels 2 x 3 min Isopropanol ersetzbar und teilweise durchgeführt worden.

# 7.2.2 Protokolle zur Färbung der Schnitte

# Protokoll 13: PAS-Färbung

Reagenzien: Aq. bidest, PAS staining Kit (Merck, Darmstadt, Deutschland), 70/96/100 % Abs. Ethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland), Xylol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Spülung in Aq.bidest.	2 min
Reagenz 1 (Periodsäurelösung)	10 min
Spülung in Leitungswasser	3 min
Spülung in Aq.bidest.	2 min
Reagenz 2 (Schiff's Reagenz)	15 min
Spülung in Leitungswasser	3 min
Spülung in Aq.bidest.	2 min
70 % Ethanol	2 x 1 min
96 % Ethanol	2 x 1 min
100 % Ethanol	2 x 1 min
Xylol	2 x 5 min

# Protokoll 14: Alcianblau-Färbung

Reagenzien: Aq. bidest, Alcianblau 8GS (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 70/96/100 % Abs. Ethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland), Xylol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Spülung in Aq.bidest. 2 min Färbung in Alcianblau 5 min Spülung in Leitungswasser 3 min Spülung in Ag.bidest. 2 x 2 min 70 % Ethanol 2 x 1 min 96 % Ethanol 2 x 1 min 100 % Ethanol 2 x 1 min Xvlol 2 x 5 min

Eindecken mit Roti-Histokitt (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

# Protokoll 15: AB-PAS-Färbung

Reagenzien: Aq. bidest, PAS staining Kit (Merck, Wetzlar, Deutschland), Alcianblau 8GS (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 70/96/100 % Abs. Ethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland), Xylol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Spülung in Aq.bidest. 2 min Färbung in Alcianblau 5 min Spülung in Leitungswasser 3 min Spülung in Aq.bidest. 2 min Spülung in Aq.bidest. 2 min Reagent 1 (Periodsäurelösung) 10 min Spülung in Leitungswasser 3 min Spülung in Ag.bidest. 2 min 15 min Reagent 2 (Schiff's Reagenz) Spülung in Leitungswasser 3 min Spülung in Aq.bidest. 2 min 70 % Ethanol 2 x 1 min 96 % Fthanol 2 x 1 min 100 % Ethanol 2 x 1 min 2 x 5 min Xvlol

# Protokoll 16: HE-Färbung

Reagenzien: Aq. bidest, Hämatoxilyn (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 70/80/90/96/100 % Abs. Ethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland), Xylol (Roth, Karlsruhe, Deutschland), siehe auch Protokoll 10 (Kapitel 7.1.2)

Einstellen in Mayer`s Hämalaun	5 min
Spülung in Leitungswasser	10 min
Spülung in Aq.bidest.	1 min
Einstellen in Eosin	7 min
Spülung in Aq.bidest.	30 sek
70 % Ethanol	30 sek
80 % Ethanol	30 sek
90 % Ethanol	30 sek
96 % Ethanol	2 x 1 min
100 % Ethanol	2 x 1 min
Xylol	2 x 5 min

# 8. Literaturverzeichnis

- ANDRIANIFAHANANA, M., MONIAUX, N., und BATRA, S. K., 2006: Regulation of mucin expression: Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. Biochimica et Biophysica Acta Reviews on Cancer. 1765:189-222.
- ARMBRUSTER, N., HONCAMP, N., KIRSCH, N., LEHMANN, N., LINTZEL, N., MANGOLD, N., PAECHTNER, N., SEUFFERT, N., VÖLTZ, N., und WUNDSCH, N., 2013: Stoffwechsel der Landwirtschaftlichen Nutztiere: Einschliesslich der Ernährung und des Stoffwechsels der Fische und Bienen. Springer Berlin Heidelberg.
- ASKER, N., AXELSSON, M. A. B., OLOFSSON, S.-O., und HANSSON, G. C., 1998:

  Dimerization of the Human MUC2 Mucin in the Endoplasmic Reticulum Is
  Followed by a N-Glycosylation-dependent Transfer of the Mono- and Dimers to
  the Golgi Apparatus. Journal of Biological Chemistry, 273:18857-18863.
- ATUMA, C., STRUGALA, V., ALLEN, A., und HOLM, L., 2001: The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **280**:G922-G929.
- AURICH, C., und VON ENGELHARDT, W., 2009: **Physiologie der Haustiere**. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- BABU, S. D., JAYANTHI, V., DEVARAJ, N., REIS, C. A., und DEVARAJ, H., 2006: Expression profile of mucins (MUC2, MUC5AC and MUC6) in Helicobacter pylori infected pre-neoplastic and neoplastic human gastric epithelium. *Molecular Cancer*, **5**:5-10.
- BANSIL, R., und TURNER, B. S., 2006: Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **11**:164-170.
- BARGMANN, W., 2013: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen: Band 5, Teil 3: Zähne, Darm, Atmungsapparat. Springer Berlin Heidelberg.
- BARGMANN, W., HEISS, R., LEHNER, J., PATZELT, V., und PLENK, H., 2013: **Verdauungsapparat**. *Springer Berlin Heidelberg*.
- BEDNORZ, C., OELGESCHLÄGER, K., KINNEMANN, B., HARTMANN, S., NEUMANN, K., PIEPER, R., BETHE, A., SEMMLER, T., TEDIN, K., SCHIERACK, P., WIELER, L. H., und GUENTHER, S., 2013: The broader context of antibiotic resistance: Zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant Escherichia coli in vivo. International Journal of Medical Microbiology, 303:396-403.
- BERENDT, H. W., 2013: Der Stoffwechsel: Teile a und b. Springer Berlin Heidelberg.
- BICKEL, M., und KAUFFMAN JR, G., 1981: Gastric gel mucus thickness: effect of distention, 16, 16-dimethyl prostaglandin e2, and carbenoxolone. *Gastroenterology*. 80:770-775.
- BIEMANN, K., BOARDMAN, N. K., BREYER, B., BURG, S. P., BUTLER, W. L., DAVID, D. J., DAVIS, P. S., DIMOND, A. E., HILDEBRANDT, A. C., und HOMMES, F. A., 2012: Modern Methods of Plant Analysis / Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Springer Berlin Heidelberg.
- BONTEMPO, V., DI GIANCAMILLO, A., SAVOINI, G., DELL'ORTO, V., und DOMENEGHINI, C., 2006: Live yeast dietary supplementation acts upon intestinal morphofunctional aspects and growth in weanling piglets. *Animal Feed Science and Technology*, **129**:224-236.
- BORNIQUEL, S., JÄDERT, C., und LUNDBERG, J. O., 2012: Dietary Conjugated Linoleic Acid Activates PPARy and the Intestinal Trefoil Factor in SW480 Cells and Mice with Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. The Journal of Nutrition, 142:2135-2140.
- BRAHM, C., KRZYWANEK, F. W., MANGOLD, E., PETER, K., SCHEUNERT, A., und SCHIEBLICH. M., 2013: **Verdauung und Ausscheidung**. *Springer Vienna*.
- BRAUNSCHWEIG, T., CHUNG, J.-Y., CHOI, C. H., CHO, H., CHEN, Q.-R., XIE, R., PERRY, C., KHAN, J., und HEWITT, S. M., 2015: Assessment of a panel of tumor markers

- for the differential diagnosis of benign and malignant effusions by well-based reverse phase protein array. *Diagnostic Pathology*. **10:**1-10.
- BRUNSGAARD, G., 1998: Effects of cereal type and feed particle size on morphological characteristics, epithelial cell proliferation, and lectin binding patterns in the large intestine of pigs. *Journal of Animal Science*, **76**:2787-2798.
- BÜTTNER, W., CREMER, H. D., GEBAUER, H., KISTNER, G., SEELENTAG, W., und STERN, P., 2013: **Erzeugung von Krankheitszuständen durch das Experiment**. In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie. *Springer Berlin Heidelberg*.
- CALLIES, A. U., 2012: Untersuchungen zur Menge des intestinalen Mukus und seines Mannosegehaltes sowie zur in vitro-Adhäsion von Salmonella Typhimurium an der Mukosa von Ileum und Zäkum junger Schweine unter dem Einfluss der Futterstruktur. Tierärztliche Hochschule Hannover. Dissertation.
- CARIO, E., GERKEN, G., und PODOLSKY, D. K., 2004: Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. Gastroenterology, 127:224-238.
- CARLSON, M. S., HILL, G. M., und LINK, J. E., 1999: Early- and traditionally weaned nursery pigs benefit from phase-feeding pharmacological concentrations of zinc oxide: effect on metallothionein and mineral concentrations. *Journal of Animal Science*. 77:1199-207.
- CASE, C. L., und CARLSON, M. S., 2002: Effect of feeding organic and inorganic sources of additional zinc on growth performance and zinc balance in nursery pigs. *Journal of Animal Science*, **80**:1917-1924.
- CAYUELA, M. F. C., 2000: Microbial Modulation of Host Intestinal Glycosylation Patterns. *Microbial Ecology in Health and Disease*, **12**:165-178.
- COHAN, V. L., SCOTT, A. L., DINARELLO, C. A., und PRENDERGAST, R. A., 1991: Interleukin-1 is a mucus secretagogue. *Cellular Immunology*, **136**:425-434.
- CONGER, A. D., und FAIRCHILD, L. M., 1953: A Quick-Freeze Method for Making Smear Slides Permanent. Stain Technology, 28:281-283.
- CORFIELD, A. P., 2015: Mucins: A biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Biochimica et Biophysica Acta General Subjects*, **1850**:236-252.
- CORFIELD, A. P., MYERSCOUGH, N., LONGMAN, R., SYLVESTER, P., ARUL, S., und PIGNATELLI, M., 2000: **Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease**. *Gut*, **47**:589-594.
- CORRALES-GARCIA, L., POSSANI, L., und CORZO, G., 2011: Expression systems of human β-defensins: vectors, purification and biological activities. *Amino Acids*, 40:5-13
- COUSINS, R. J., 1998: A role of zinc in the regulation of gene expression. *Proceedings of the Nutrition Society*, **57**:307-311.
- DE LISLE, R. C., ROACH, E., und JANSSON, K., 2007: Effects of laxative and Nacetylcysteine on mucus accumulation, bacterial load, transit, and inflammation in the cystic fibrosis mouse small intestine. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 293:G577-G584.
- DEKKER, J., ROSSEN, J. W. A., BÜLLER, H. A., und EINERHAND, A. W. C., 2002: **The MUC family: an obituary**. *Trends in Biochemical Sciences*, **27**:126-131.
- DEPLANCKE, B., VIDAL, O., GANESSUNKER, D., DONOVAN, S. M., MACKIE, R. I., und GASKINS, H. R., 2002: Selective growth of mucolytic bacteria including Clostridium perfringens in a neonatal piglet model of total parenteral nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76:1117-1125.
- DI GIANCAMILLO, A., VITARI, F., SAVOINI, G., BONTEMPO, V., BERSANI, C., DELL'ORTO, V., und DOMENEGHINI, C., 2008: Effects of orally administered probiotic Pediococcus acidilactici on the small and large intestine of weaning piglets. A qualitative and quantitative micro-anatomical study. *Histology and Histopathology*, 23:651-664.
- ERMUND, A., SCHÜTTE, A., JOHANSSON, M. E., GUSTAFSSON, J. K., und HANSSON, G. C., 2013: Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. I.

- Gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location as well as over the Peyer's patches. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **305**:G341-G347.
- EU, 2003a: Verordnung (EG) Nr. 1334/2003 der Kommission vom 25. Juli zur Änderung der Bedingungen für die Zulassung einer Reihe von zur Gruppe der Spurenelemente zählenden Futtermittelzusatzstoffen Amtsblatt der Europäischen Union, 187:11-15.
- EU, 2003b: Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung. Amtsblatt der Europäischen Union, 268:29-43.
- EVERARD, A., BELZER, C., GEURTS, L., OUWERKERK, J. P., DRUART, C., BINDELS, L. B., GUIOT, Y., DERRIEN, M., MUCCIOLI, G. G., DELZENNE, N. M., DE VOS, W. M., und CANI, P. D., 2013: Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110:9066-9071.
- FADERL, M., NOTI, M., CORAZZA, N., und MUELLER, C., 2015: **Keeping bugs in check:**The mucus layer as a critical component in maintaining intestinal homeostasis.

  International Union of Biochemistry and Molecular Biology, **67**:275-285.
- FAIRBROTHER, J. M., NADEAU, É., und GYLES, C. L., 2005: Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Research Reviews*. **6**:17-39.
- FLEMING, A., und ALLISON, V., 1922: Observations on a bacteriolytic substance ("lysozyme") found in secretions and tissues. British journal of experimental pathology, 3:252.
- FORSTNER, J., und FORSTNER, G., 1994: **Gastrointestinal mucus**. *Physiology of the gastrointestinal tract*, **1994**:1255-1283.
- FORSTNER, J., OLIVER, M., und SYLVESTER, F., 1995: **Production, structure, and biologic relevance of gastrointestinal mucins**. *Infections of the gastrointestinal tract.* **1995**:71-88.
- FORSTNER, J. F., 1978: Intestinal Mucins in Health and Disease. *Digestion*, 17:234-263. FREY, N., HOEPKE, N., REIN, N., ROTHMAN, N., SCHAAF, N., und UNNA, N., 2013: Physiologie der Haut-Chemie Histologische Technik P. G. Unnas Färbemethoden. *Springer Vienna*.
- GAUDIER, E., RIVAL, M., BUISINE, M.-P., ROBINEAU, I., und HOEBLER, C., 2009:

  Butyrate enemas upregulate Muc genes expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon. *Physiological Research*, 58:111.
- GENDLER, S., und SPICER, A., 1995: Epithelial mucin genes. Annual review of physiology, 57:607-634.
- GENDLER, S. J., LANCASTER, C. A., TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J., DUHIG, T., PEAT, N., BURCHELL, J., PEMBERTON, L., LALANI, E. N., und WILSON, D., 1990: Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. Journal of Biological Chemistry, 265:15286-93.
- GFE, 2006: Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Schweinen. Frankfurt: Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft-Verlag.
- GFE, 2008: **Proceedings of the Society of Nutrition Physiology Band 17**. Frankfurt: Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft-Verlag.
- GRÖBE, D., 2008: Biochemische Modifikation von Glykan-Strukturen durch nicht natürliche Monosaccharide und ihr Einfluss auf die Sialidase-Resistenz. Freie Universität Berlin. Dissertation.
- GUM, J. R., BYRD, J. C., HICKS, J. W., TORIBARA, N. W., LAMPORT, D. T., und KIM, Y. S., 1989: Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism. *Journal of Biological Chemistry*, 264:6480-6487.
- GUM, J. R., HICKS, J. W., TORIBARA, N. W., SIDDIKI, B., und KIM, Y. S., 1994: Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA. Identification of the amino

- terminus and overall sequence similarity to prepro-von Willebrand factor. Journal of Biological Chemistry. **269**:2440-2446.
- GUM JR, J. R., CRAWLEY, S. C., HICKS, J. W., SZYMKOWSKI, D. E., und KIM, Y. S., 2002: MUC17, a Novel Membrane-Tethered Mucin. Biochemical and Biophysical Research Communications, 291:466-475.
- HALLER, D., und HÖRMANNSPERGER, G., 2013: **Darmgesundheit und Mikrobiota**. In: Biofunktionalität der Lebensmittelinhaltsstoffe. *Springer Berlin Heidelberg*.
- HANISCH, F.-G., und MÜLLER, S., 2000: **MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin**. *Glycobiology*, **10:**439-449.
- HATTRUP, C. L., und GENDLER, S. J., 2008: Structure and Function of the Cell Surface (Tethered) Mucins. *Annual review of physiology*, **70**:431-457.
- HEDEMANN, M. Ś., JENSEN, B. B., und POULSEN, H. D., 2006: Influence of dietary zinc and copper on digestive enzyme activity and intestinal morphology in weaned pigs. *Journal of Animal Science*, **84**:3310-3320.
- HEDINGER, C. E., und DHOM, G., 2013: Pathologie des männlichen Genitale: Hoden · Prostata · Samenblasen. Springer Berlin Heidelberg.
- HOFFBAUER, C. H., und JUNCKER, J., 1734: **De ignobili Muco Ingrato Multorum Nobilium Hospite**. *Medizinische Universität Halle*, *Dissertation*.
- HØJBERG, O., CANIBE, N., POULSEN, H. D., HEDEMANN, M. S., und JENSEN, B. B., 2005: Influence of Dietary Zinc Oxide and Copper Sulfate on the Gastrointestinal Ecosystem in Newly Weaned Piglets. Applied and Environmental Microbiology. 71:2267-2277.
- HOKARI, R., LEE, H., CRAWLEY, S. C., YANG, S. C., GUM, J. R., MIURA, S., und KIM, Y. S., 2005: Vasoactive intestinal peptide upregulates MUC2 intestinal mucin via CREB/ATF1. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 289:G949-G959.
- HOLLINGSWORTH, M. A., und SWANSON, B. J., 2004: **Mucins in cancer: protection and control of the cell surface**. *Nature Reviews Cancer*, **4:**45-60.
- HOLM, A., 1990: E. coli associated diarrhoea in weaner pigs: zinc oxide added to the feed as a preventive measure. In: Proceedings, International Pig Veterinary Society, 11th Congress. Lausanne, Switzerland, Swiss Association of Swine Medicine.
- HOLMÉN LARSSON, J. M., KARLSSON, H., SJÖVALL, H., und HANSSON, G. C., 2009: A complex, but uniform O-glycosylation of the human MUC2 mucin from colonic biopsies analyzed by nanoLC/MSn. *Glycobiology*, 19:756-766.
- HOYER, H., 1890: Über den Nachweis des Mucins in Geweben mittelst der Färbemethode. Archiv für mikroskopische Anatomie, 36:310-374.
- HU, C. H., GU, L. Y., LUAN, Z. S., SONG, J., und ZHU, K., 2012: Effects of montmorillonite-zinc oxide hybrid on performance, diarrhea, intestinal permeability and morphology of weanling pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 177:108-115.
- HU, C. H., XIAO, K., SONG, J., und LUAN, Z. S., 2013: Effects of zinc oxide supported on zeolite on growth performance, intestinal microflora and permeability, and cytokines expression of weaned pigs. Animal Feed Science and Technology, 181:65-71.
- HUANG, S. X., MCFALL, M., CEGIELSKI, A. C., und KIRKWOOD, R. N., 1999: Effect of dietary, zinc supplementation on Escherichia coli septicemia in weaned pigs. Swine Health and Production. 7:109-112.
- HUGUET, A., LE NORMAND, L., FAUQUANT, J., KAEFFER, B., und LE HUËROU-LURON, I., 2007: Influence of bovine colostrum on restoration of intestinal mucosa in weaned piglets. *Livestock Science*, **108:**20-22.
- IIBOSHI, Y., NEZU, R., KENNEDY, M., FUJH, M., WASA, M., FUKUZAWA, M., KAMATA, S., TAKAGI, Y., und OKADA, A., 1994: Total Parenteral Nutrition Decreases

  Luminal Mucous Gel and Increases Permeability of Small Intestine. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 18:346-350.
- INOUE, J., LEE, J. C., und TROY, F. A., 1999: Sialobiology and Other Novel Forms of Glycosylation. Osaka: Gakushin Publishing Company.

- IRINTSCHEFF, A., und DAVIDOFF, M., 1981: Über die Verteilung einiger Hydrolasen in der Rattenniere. Histochemistry. 71:463-480.
- ITOH, Y., KAMATA-SAKURAI, M., DENDA-NAGAI, K., NAGAI, S., TSUIJI, M., ISHII-SCHRADE, K., OKADA, K., GOTO, A., FUKAYAMA, M., und IRIMURA, T., 2008: Identification and Expression of Human Epiglycanin/MUC21: a Novel Transmembrane Mucin\*. *Glycobiology*, 18:74-83.
- IVEMARK, B., WEBER, E., LÖHRER, A., und SONDEREGGER, P., 2013: Kinderpathologie: Wege zur Diagnose. Springer Berlin Heidelberg.
- JAKOBSSON, H. E., RÖDRÍGÜEZ-PIÑEIRO, A. M., SCHÜTTE, A., ERMUND, A., BOYSEN, P., BEMARK, M., SOMMER, F., BÄCKHED, F., HANSSON, G. C., und JOHANSSON, M. E., 2015: The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. European Molecular Biology Organization reports, 16:164-177.
- JENSEN-WAERN, M., MELIN, L., LINDBERG, R., JOHANNISSON, A., PETERSSON, L., und WALLGREN, P., 1998: Dietary zinc oxide in weaned pigs effects on performance, tissue concentrations, morphology, neutrophil functions and faecal microflora. Research in Veterinary Science, 64:225-231.
- JOHANSEN, P. G., und KAY, R., 1969: **Histochemistry of rectal mucus in cystic fibrosis of the pancreas**. *The Journal of pathology*. **99:**299-306.
- JOHANSSON, M. E. V., LARSSON, J. M. H., und HANSSON, G. C., 2011a: The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108:4659-4665.
- JOHANSSON, M. E. V., PHILLIPSON, M., PETERSSON, J., VELCICH, A., HOLM, L., und HANSSON, G. C., 2008: The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences. 105:15064-15069.
- JOHANSSON, M. E. V., SJOVALL, H., und HANSSON, G. C., 2013: The gastrointestinal mucus system in health and disease. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, 10:352-361.
- JOHANSSON, M. V., AMBORT, D., PELASEYED, T., SCHÜTTE, A., GUSTAFSSON, J., ERMUND, A., SUBRAMANI, D., HOLMÉN-LARSSON, J., THOMSSON, K., BERGSTRÖM, J., VAN DER POST, S., RODRIGUEZ-PIÑEIRO, A., SJÖVALL, H., BÄCKSTRÖM, M., und HANSSON, G., 2011b: Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. Cellular and Molecular Life Sciences, 68:3635-3641.
- JONCKHEERE, N., SKRYPEK, N., FRÉNOIS, F., und VAN SEUNINGEN, I., 2013: Membrane-bound mucin modular domains: From structure to function. *Biochimie.* **95**:1077-1086.
- JONCKHEERE, N., und VAN SEUNINGEN, I., 2010: The membrane-bound mucins: From cell signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers. *Biochimie*, **92**:1-11.
- JORDAN, N., NEWTON, J., PEARSON, J., und ALLEN, A., 1998: A novel method for the visualization of the in situ mucus layer in rat and man. Clinical Science, 95:97-106.
- KARARLI, T. T., 1995: Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals.

  Biopharmaceutics & Drug Disposition, 16:351-380.
- KATOULI, M., MELIN, L., JENSEN-WAERN, M., WALLGREN, P., und MÖLLBY, R., 1999: The effect of zinc oxide supplementation on the stability of the intestinal flora with special reference to composition of coliforms in weaned pigs. *Journal of Applied Microbiology*, **87**:564-573.
- KERSS, S., ALLEN, A., und GARNER, A., 1982: A simple method for measuring thickness of the mucus gel layer adherent to rat, frog and human gastric mucosa: influence of feeding, prostaglandin, N-acetylcysteine and other agents. Clinical Science. 63:187-195.

- KHUTORYANSKIY, V. V., 2014: **Mucoadhesive Materials and Drug Delivery Systems**. Chichester: *John Wilev & Sons*.
- KIM, D. Y., TAKEUCHI, K., ISHINAGA, H., KISHIOKA, C., SUZUKI, S., BASBAUM, C., und MAJIMA, Y., 2004: Roxithromycin Suppresses Mucin Gene Expression in Epithelial Cells. *Pharmacology*, **72**:6-11.
- KIM, Y., und HO, S., 2010: Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. Current Gastroenterology Reports, 12:319-330.
- LAERKE, H., und HEDEMANN, M., 2012: **The digestive system of the pig**. In: Nutritional Physiology of Pigs. Kopenhagen, *Videncenter for Svineproduktion*.
- LAMONT, J. T., VENTOLA, A. S., MAULL, E. A., und SZABO, S., 1983: Cysteamine and Prostaglandin F 2β Stimulate Rat Gastric Mucin Release. *Gastroenterology*, 84:306-313.
- LANCASTER, C. A., PEAT, N., DUHIG, T., WILSON, D., TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J., und GENDLER, S. J., 1990: Structure and expression of the human polymorphic epithelial mucin gene: an expressed VNTR unit. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 173:1019-1029.
- LANG, G., 2006: Histotechnik. Wien: Springer-Verlag.
- LANG, T., HANSSON, G. C., und SAMUELSSON, T., 2007: Gel-forming mucins appeared early in metazoan evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104:16209-16214.
- LARHED, A., ARTURSSON, P., und BJÖRK, E., 1998: The Influence of Intestinal Mucus Components on the Diffusion of Drugs. *Pharmaceutical Research*, **15**:66-71.
- LARSEN, T., und SANDSTROM, B., 1993: Effect of dietary calcium level on mineral and trace element utilization from a rapeseed (Brassica napus L.) diet fed to ileum-fistulated pigs. British Journal of Nutrition, 69:211-224.
- LE BON, M., DAVIES, H. E., GLYNN, C., THOMPSON, C., MADDEN, M., WISEMAN, J., DODD, C. E. R., HURDIDGE, L., PAYNE, G., LE TREUT, Y., CRAIGON, J., TÖTEMEYER, S., und MELLITS, K. H., 2010: Influence of probiotics on gut health in the weaned pig. *Livestock Science*, **133**:179-181.
- LEE, H.-W., AHN, D.-H., CRAWLEY, S. C., LI, J.-D., GUM, J. R., BASBAUM, C. B., FAN, N. Q., SZYMKOWSKI, D. E., HAN, S.-Y., LEE, B. H., SLEISENGER, M. H., und KIM, Y. S., 2002: Phorbol 12-Myristate 13-Acetate Up-regulates the Transcription of MUC2 Intestinal Mucin via Ras, ERK, and NF-κB. Journal of Biological Chemistry, 277:32624-32631.
- LEHMANN, J. M., RIETHMÜLLER, G., und JOHNSON, J. P., 1989: MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86:9891-9895.
- LEONARD, S. G., SWEENEY, T., BAHAR, B., LYNCH, B. P., und O'DOHERTY, J. V., 2011: Effects of dietary seaweed extract supplementation in sows and post-weaned pigs on performance, intestinal morphology, intestinal microflora and immune status. *British Journal of Nutrition*, **106**:688-699.
- LETERME, P., FROIDMONT, E., ROSSI, F., und THÉWIS, A., 1998: The High Water-Holding Capacity of Pea Inner Fibers Affects the Ileal Flow of Endogenous Amino Acids in Pigs. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46:1927-1934.
- LEV, R., und SPICER, S. S., 1964: SPECIFIC STAINING OF SULPHATE GROUPS WITH ALCIAN BLUE AT LOW ph. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 12:309.
- LEWIS, S. J., und HEATON, K. W., 1997: **Stool Form Scale as a Useful Guide to**Intestinal Transit Time. Scandinavian Journal of Gastroenterology, **32**:920-924.
- LI, B. T., VAN KESSEL, A. G., CAINE, W. R., HUANG, S. X., und KIRKWOOD, R. N., 2001: Small intestinal morphology and bacterial populations in ileal digesta and feces of newly weaned pigs receiving a high dietary level of zinc oxide. Canadian Journal of Animal Science, 81:511-516.
- LIEBICH, H.-G., 2010: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel. Stuttgart: Schattauer Verlag.

- LIEN, K., SAUER, W., und HE, H., 2001: Dietary influences on the secretion into and degradation of mucin in the digestive tract of monogastric animals and humans. *Journal of Animal and Feed Sciences*, **10**:223-245.
- LINDBERG, J. E., und OGLE, B., 2001: **Digestive Physiology of Pigs**. Wallingford: *Centre for Agriculture and Biosciences International*.
- LIU, P., 2014: Influence of Dietary Zinc Oxide on Morphological and Immunological Characteristics in the Jejunum and Colon of Weaned Piglets. Freie Universität Berlin, Dissertation.
- LIU, P., PIEPER, R., RIEGER, J., VAHJEN, W., DAVIN, R., PLENDL, J., MEYER, W., und ZENTEK, J., 2014a: Effect of Dietary Zinc Oxide on Morphological Characteristics, Mucin Composition and Gene Expression in the Colon of Weaned Piglets. Public Library of Science ONE, 9:e91091.
- LIU, P., PIEPER, R., TEDIN, L., MARTIN, L., MEYER, W., RIEGER, J., PLENDL, J., VAHJEN, W., und ZENTEK, J., 2014b: Effect of dietary zinc oxide on jejunal morphological and immunological characteristics in weaned piglets. *Journal of Animal Science*, **92**:5009-5018.
- LÜLLMANN-RAUCH, R., 2012: **Taschenlehrbuch Histologie**. Stuttgart: *Thieme*. MANTLE, M., MANTLE, D., und ALLEN, A., 1981: **Polymeric structure of pig small-intestinal mucus glycoprotein**. **Dissociation by proteolysis or by reduction of disulphide bridges**. *Biochemical Journal*, **195**:277-285.
- MAO, X., QI, S., YU, B., HE, J., YU, J., und CHEN, D., 2013: **Zn2+ and I-isoleucine induce** the expressions of porcine β-defensins in IPEC-J2 cells. *Molecular biology* reports, **40**:1547-1552.
- MARTIN, L., LODEMANN, U., BONDZIO, A., GEFELLER, E.-M., VAHJEN, W., ASCHENBACH, J. R., ZENTEK, J., und PIEPER, R., 2013a: A High Amount of Dietary Zinc Changes the Expression of Zinc Transporters and Metallothionein in Jejunal Epithelial Cells in Vitro and in Vivo but Does Not Prevent Zinc Accumulation in Jejunal Tissue of Piglets. The Journal of Nutrition, 143:1205-1210
- MARTIN, L., PIEPER, R., SCHUNTER, N., VAHJEN, W., und ZENTEK, J., 2013b:

  Performance, organ zinc concentration, jejunal brush border membrane
  enzyme activities and mRNA expression in piglets fed with different levels of
  dietary zinc. Archives of Animal Nutrition, 67:248-261.
- MATSUO, K., OTA, H., AKAMATSU, T., SUGIYAMA, A., und KATSUYAMA, T., 1997: Histochemistry of the surface mucous gel layer of the human colon. *Gut*, 40:782-789.
- MATTAR, A., TEITELBAUM, D. H., DRONGOWSKI, R., YONGYI, F., HARMON, C., und CORAN, A., 2002: Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model. *Pediatric Surgery International*, 18:586-590.
- MAVROMICHALIS, I., PETER, C. M., PARR, T. M., GANESSUNKER, D., und BAKER, D. H., 2000: Growth-promoting efficacy in young pigs of two sources of zinc oxide having either a high or a low bioavailability of zinc. *Journal of Animal Science*, 78:2896-902.
- MAWHINNEY, T. P., LANDRUM, D. C., GAYER, D. A., und BARBERO, G. J., 1992: Sulfated sialyl-oligosaccharides derived from tracheobronchial mucous glycoproteins of a patient suffering from cystic fibrosis. *Carbohydrate Research*, 235:179-197.
- MCDONALD, D. E., PETHICK, D. W., MULLAN, B. P., und HAMPSON, D. J., 2001: Increasing viscosity of the intestinal contents alters small intestinal structure and intestinal growth, and stimulates proliferation of enterotoxigenic Escherichia coli in newly-weaned pigs. *British Journal of Nutrition*, 86:487-498.
- MCMANUS, J. F. A., 1948: **Histological and Histochemical Uses of Periodic Acid**. *Stain Technology*, **23**:99-108.
- MELNICK, M., CHEN, H., ZHOU, Y.-M., und JASKOLL, T., 2001: An alternatively spliced Muc10 glycoprotein ligand for putative I-selectin binding during mouse

- embryonic submandibular gland morphogenesis. *Archives of Oral Biology*, **46:**745-757.
- MIRLACHER, M., KASPER, M., STORZ, M., KNECHT, Y., DURMULLER, U., SIMON, R., MIHATSCH, M. J., und SAUTER, G., 2004: Influence of slide aging on results of translational research studies using immunohistochemistry. *Modern pathology*, 17:1414-1420.
- MONTAGNE, L., PIEL, C., und LALLES, J. P., 2004: Effect of Diet on Mucin Kinetics and Composition: Nutrition and Health Implications. *Nutrition Reviews*, **62**:105-114.
- MOWRY, R., und WINKLER, C. H., 1956: The coloration of acidic carbohydrates of bacteria and fungi in tissue sections with special reference to capsules of Cryptococcus neoformans, pneumococci, and staphylococci. *American Journal of Pathology.* 32:628-629.
- MÜLBERGER, A., 2013: Grundzüge der pathologisch-histologischen Technik. Springer Berlin Heidelberg.
- MULISCH, M., und WELSCH, U., 2010: Romeis-mikroskopische technik. Heidelberg: Springer-Verlag.
- NAKADA, H., 2015: Mucin and Cancer. In: Glycoscience: Biology and Medicine. Tokio, Springer-Verlag.
- NAUMANN, K., BASSLER, R., SEIBOLD, R., und BARTH, K., 2004: **Die chemische Untersuchung von Futtermitteln**. In: Methodenbuch Band III Vol. 3. Darmstadt, *Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungs Anstalten-Verlag*
- NEUTRA, M., 1987: Gastrointestinal mucus: synthesis, secretion, and function. Physiology of the gastrointestinal tract, 2:975-1009.
- NEUTRA, M. R., O'MALLEY, L. J., und SPECIAN, R. D., 1982: **Regulation of intestinal goblet cell secretion. II. A survey of potential secretagogues**. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **242**:G380-G387.
- NRC, 2012: **Nutrient Requirements of Swine: Eleventh Revised Edition**. Washington, D.C.: *National Academies Press*.
- OFFNER, G. D., NUNES, D. P., KEATES, A. C., AFDHAL, N. H., und TROXLER, R. F., 1998: The Amino-Terminal Sequence of MUC5B Contains Conserved Multifunctional D Domains: Implications for Tissue-Specific Mucin Functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **251**:350-355.
- OTA, H., und KATSUYAMA, T., 1992: Alternating laminated array of two types of mucin in the human gastric surface mucous layer. *The Histochemical Journal*, **24**:86-92. OTTO, H. F., 1983: Dünndarmbiopsie. In: Handbuch der inneren Medizin. *Springer Berlin*
- OTTO, H. F., 1983: **Dünndarmbiopsie**. In: Handbuch der inneren Medizin. *Springer Berlin Heidelberg*.
- PALLESEN, L. T., BERGLUND, L., RASMUSSEN, L. K., PETERSEN, T. E., und RASMUSSEN, J. T., 2002: Isolation and characterization of MUC15, a novel cell membrane-associated mucin. European Journal of Biochemistry, 269:2755-2763.
- PEREZ-VILAR, J., und HILL, R. L., 1999: The Structure and Assembly of Secreted Mucins. Journal of Biological Chemistry, 274:31751-31754.
- PETERSON, L. W., und ARTIS, D., 2014: Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, **14**:141-153.
- PFAFFL, M. W., 2001: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic acids research*, **29**:e45-e45.
- PHILLIPS, T. E., PHILLIPS, T. H., und NEUTRA, M. R., 1984: **Regulation of intestinal goblet cell secretion. IV. Electrical field stimulation in vitro**. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **247**:G682-G687.
- PIEPER, R., KRÖGER, S., RICHTER, J. F., WANG, J., MARTIN, L., BINDELLE, J., HTOO, J. K., VON SMOLINSKI, D., VAHJEN, W., und ZENTEK, J., 2012a: Fermentable fiber ameliorates fermentable protein-induced changes in microbial ecology, but not the mucosal response, in the colon of piglets. *The Journal of Nutrition*, 142:661-667.
- PIEPER, R., VAHJEN, W., NEUMANN, K., VAN KESSEL, A. G., und ZENTEK, J., 2012b: Dose-dependent effects of dietary zinc oxide on bacterial communities and

- metabolic profiles in the ileum of weaned pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. **96**:825-833.
- PODOLSKY, D. K., GERKEN, G., EYKING, A., und CARIO, E., 2009: Colitis-Associated Variant of TLR2 Causes Impaired Mucosal Repair Because of TFF3 Deficiency. *Gastroenterology*, 137:209-220.
- PUCHTLER, H., WALDROP, F., MELOAN, S., TERRY, M., und CONNER, H. M., 1970: Methacarn (methanol-Carnoy) fixation. *Histochemie*, 21:97-116.
- PULLAN, R. D., THOMAS, G. A., RHODES, M., NEWCOMBE, R. G., WILLIAMS, G. T., ALLEN, A., und RHODES, J., 1994: Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut*, **35**:353-359.
- RADHAKRISHNAN, P., HALAGOWDER, D., und DEVARAJ, S. N., 2007: Altered expression of MUC2 and MUC5AC in response to Shigella infection, an in vivo study. Biochimica et Biophysica Acta General Subjects, 1770:884-889.
- RAKOFF-NAHOUM, S., PAGLINO, J., ESLAMI-VARZANEH, F., EDBERG, S., und MEDZHITOV, R., 2004: Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. *Cell*, 118:229-241.
- RAMAKER, K., 2009: Die Glykocalyx-und Mukusbarriere des Darms: Analyse der Zugänglichkeit der Oberfläche von Schleimhauttumoren für diagnostische Wirkstoffe. Christian-Albrechts Universität Kiel, Dissertation.
- REIS, C. A., DAVID, L., CORREA, P., CARNEIRO, F., BOLÓS, C. D., GARCIA, E., MANDEL, U., CLAUSEN, H., und SOBRINHO-SIMÕES, M., 1999: Intestinal Metaplasia of Human Stomach Displays Distinct Patterns of Mucin (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6) Expression. Cancer Research, 59:1003-1007.
- RIEGER J., BRIEST-FORCH K., DREWES B., HUENIGEN H., und PLENDL, J., 2016:

  Mucosubstances in the porcine gastrointestinal tract: Fixation, staining and
  quantification. In: Proceedings of the 31st Conference of the European Association
  of Veterinary Anatomists Vol. 45, (H. ANATOMIA, EMBRYOLOGIA, ed. Vienna,
  Austria.
- RIORDAN, J., 1976: **Biochemistry of zinc**. *The Medical clinics of North America*, **60**:661-674.
- ROBERTON, A., und WRIGHT, D., 1997: **Bacterial glycosulphatases and sulphomucin degradation**. *Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology*, **11:**361 366.
- ROKHSEFAT, S., LIN, A., und COMELLI, E. M., 2016: Mucin–Microbiota Interaction

  During Postnatal Maturation of the Intestinal Ecosystem: Clinical Implications.

  Digestive diseases and sciences, 61:1473-1486.
- ROUSSEL, P., DEGAND, P., LAMBLIN, G., LAINE, A., und LAFITTE, J. J., 1976:

  Biochemical definition of human tracheobronchial mucus. *Lung*, 154:241-260.
- SAKAMOTO, K., HIROSE, H., ONIZUKA, A., HAYASHI, M., FUTAMURA, N., KAWAMURA, Y., und EZAKI, T., 2000: Quantitative Study of Changes in Intestinal Morphology and Mucus Gel on Total Parenteral Nutrition in Rats. *Journal of Surgical Research*, **94**:99-106.
- SAKATA, T., und ENGELHARDT, W. V., 1981: Luminal mucin in the large intestine of mice, rats and guinea pigs. *Cell and Tissue Research*, **219**:629-635.
- SAKATA, T., und SETOYAMA, H., 1995: Local stimulatory effect of short-chain fatty acids on the mucus release from the hindgut mucosa of rats (Rattus norvegicus). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 111:429-432.
- SCHROEDER, H. A., NASON, A. P., TIPTON, I. H., und BALASSA, J. J., 1967: Essential trace metals in man: Zinc. Relation to environmental cadmium. *Journal of Chronic Diseases*, 20:179-210.
- SHERMAN, H., CHAPNIK, N., und FROY, O., 2006: Albumin and amino acids upregulate the expression of human beta-defensin 1. *Molecular Immunology*, **43**:1617-1623.
- SILBERNAGL, S., 2012: Taschenatlas Physiologie. Georg Thieme Verlag.
- SIMMONS, P. J., LEVESQUE, J.-P., und HAYLOCK, D. N., 2001: Mucin-like Molecules as Modulators of the Survival and Proliferation of Primitive Hematopoietic Cells.

  Annals of the New York Academy of Sciences, 938:196-207.

- SMIRNOVA, M. G., GUO, L., BIRCHALL, J. P., und PEARSON, J. P., 2003: LPS upregulates mucin and cytokine mRNA expression and stimulates mucin and cytokine secretion in goblet cells. *Cellular Immunology*, 221:42-49.
- SOJKA, W., LLOYD, M., und SWEENEY, E., 1960: Escherichia coli serotypes associated with certain pig diseases. Research in Veterinary Science, 1:17-27.
- SPECIAN, R. D., und NEUTRA, M. R., 1982: Regulation of intestinal goblet cell secretion. I. Role of parasympathetic stimulation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **242**:G370-G379.
- SRIVASTAVA, R., FAROOKH, A., AHMAD, N., MISRA, M., HASAN, S., und HUSAIN, M., 1995: Reduction of cis-platinum induced nephrotoxicity by zinc histidine complex: the possible implication of nitric oxide. *Biochemistry and molecular biology international*. **36**:855-862.
- STARKE, I. C., 2014: Einfluss von pharmakologisch verabreichtem Zinkoxid auf Struktur und ausgewählte funktionelle Aspekte der intestinalen Mikrobiota im Absetzferkel. Freie Universität Berlin, Dissertation.
- STEINHAUSEN, M., 2013: Lehrbuch der Vegetativen Physiologie. Springer Berlin Heidelbera.
- STREHLE, M., 2004: Die Rolle des Met-Signalübertragungssystems bei der Muskelentwicklung in der Maus. Freie Universität Berlin, Dissertation.
- STROUS, G. J., 1979: Initial glycosylation of proteins with acetylgalactosaminylserine linkages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **76:**2694-2698.
- STUART-LOW, W., 1901: MUCIN IN DESICCATION, IRRITATION, AND ULCERATION OF MUCOUS MEMBRANES. The Lancet, 158:972-976.
- SUEMORI, S., LYNCH-DEVANEY, K., und PODOLSKY, D. K., 1991: Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. Proceedings of the National Academy of Sciences, 88:11017-11021.
- SWALLOW, D. M., GENDLER, S., GRIFFITHS, B., CORNEY, G., TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J., und BRAMWELL, M. E., 1987: The human tumourassociated epithelial mucins are coded by an expressed hypervariable gene locus PUM. *Nature*. 328:82-84.
- SWIDSINSKI, A., LOENING-BAUCKE, V., THEISSIG, F., ENGELHARDT, H., BENGMARK, S., KOCH, S., LOCHS, H., und DÖRFFEL, Y., 2007: Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut*, **56**:343-350.
- SZENTKUTI, L., RIEDESEL, H., ENSS, M.-L., GAERTNER, K., und VON ENGELHARDT, W., 1990: **Pre-epithelial mucus layer in the colon of conventional and germ-free rats**. *The Histochemical Journal*. **22**:491-497.
- THEODOROPOULOS, G., und CARRAWAY, K. L., 2007: Molecular signaling in the regulation of mucins. *Journal of Cellular Biochemistry*. **102**:1103-1116.
- TITLBACH, M., 1968: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Langerhansschen Inseln von Nattern (Natrix natrix L., Natrix tessellata Laurenti). Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie, 90:519-534.
- TIZARD, I., 2012: Veterinary Immunology. Toronto: Elsevier Health Sciences.
- TOMASETTO, C., MASSON, R., LINARES, J. L., WENDLING, C., LEFEBVRE, O., CHENARD, M. P., und RIO, M. C., 2000: pS2/TFF1 interacts directly with the VWFC cysteine-rich domains of mucins. *Gastroenterology*, 118:70-80.
- VAHJEN, W., PIEPER, R., und ZENTEK, J., 2010: Bar-Coded Pyrosequencing of 16S rRNA Gene Amplicons Reveals Changes in Ileal Porcine Bacterial Communities Due to High Dietary Zinc Intake. Applied and Environmental Microbiology, 76:6689-6691.
- VARUM, F. J. O., VEIGA, F., SOUSA, J. S., und BASIT, A. W., 2010: An investigation into the role of mucus thickness on mucoadhesion in the gastrointestinal tract of pig. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 40:335-341.
- VILLODRE TUDELA, C., BOUDRY, C., STUMPFF, F., ASCHENBACH, J. R., VAHJEN, W., ZENTEK, J., und PIEPER, R., 2015: **Down-regulation of monocarboxylate** transporter 1 (MCT1) gene expression in the colon of piglets is linked to

- bacterial protein fermentation and pro-inflammatory cytokine-mediated signalling. *British Journal of Nutrition*. **113**:610-617.
- VOLLMAR, A., ZÜNDORF, I., und DINGERMANN, T., 2013: Immunologie: Grundlagen und Wirkstoffe. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- VOLLMERHAUS, B., 2004: **Lehrbuch der Anatomie der Haustiere**. Stuttgart: *Thieme Verlag*.
- VON DEIMLING, O., 1964: Die Darstellung phosphatfreisetzender Enzyme mittels Schwermetall-Simultan-Methoden. Histochemie, 4:48-55.
- WEBER, G. M., 2012: **Bedeutung, Nutzen und Effizienz von Zusatzstoffen in Futtermitteln**. In: 24. Hülsenberger Gespräche Zusatzstoffe in der Ernährung. *Heinz Wilhelm Schaumann Stiftung*.
- WEHKAMP, J., FELLERMANN, K., HERRLINGER, K. R., BEVINS, C. L., und STANGE, E. F., 2005: **Mechanisms of disease: defensins in gastrointestinal diseases**. *Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology*, **2**:406-415.
- WEISS, L., 1984: **Modern concepts of gastrointestinal histology**. New York: *Elsevier*. WHITEHEAD, D. R., und SHEEHAN, M. C., 1971: **Measurement as a Means of Identifying**
- Fossil Maize Pollen, II: The Effect of Slide Thickness. Bulletin of the Torrey Botanical Club, 98:268-271.
- WILLIAMS, O. W., SHARAFKHANEH, A., KIM, V., DICKEY, B. F., und EVANS, C. M., 2006: Airway Mucus. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, **34:**527-536.
- WILLIAMS, S. J., WRESCHNER, D. H., TRAN, M., EYRE, H. J., SUTHERLAND, G. R., und MCGUCKIN, M. A., 2001: MUC13, a Novel Human Cell Surface Mucin Expressed by Epithelial and Hemopoietic Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276:18327-18336.
- WLODARSKA, M., WILLING, B. P., BRAVO, D. M., und FINLAY, B. B., 2015: **Phytonutrient** diet supplementation promotes beneficial Clostridia species and intestinal mucus secretion resulting in protection against enteric infection. *Scientific Reports*, **5**:9253.
- WU, Q., CASE, S. R., MINOR, M. N., JIANG, D., MARTIN, R. J., BOWLER, R. P., WANG, J., HARTNEY, J., KARIMPOUR-FARD, A., und CHU, H. W., 2013: A Novel Function of MUC18: Amplification of Lung Inflammation during Bacterial Infection. The American Journal of Pathology, 182:819-827.
- XIA, H. H.-X., YANG, Y., LAM, S. K., WONG, W. M., LEUNG, S. Y., YUEN, S. T., ELIA, G., WRIGHT, N. A., und WONG, B. C.-Y., 2004: Aberrant epithelial expression of trefoil family factor 2 and mucin 6 in Helicobacter pylori infected gastric antrum, incisura, and body and its association with antralisation. *Journal of Clinical Pathology*. 57:861-866.
- ZENTEK, J., HELLWEG, P., und KHOL-PARISINI, A., 2007: **Spurenelemente als Faktoren der Tiergesundheit**. In: BOKU Symposium Tierernährung, Sekundärwirkungen von Futterinhaltsstoffen vom Nährstoff zum Wirkstoff -. Wien.
- ZHANG, B., SHAO, Y., LIU, D., YIN, P., GUO, Y., und YUAN, J., 2012: **Zinc prevents**Salmonella enterica serovar Typhimurium-induced loss of intestinal mucosal barrier function in broiler chickens. *Avian Pathology*, **41**:361-367.
- ZUHDI ALIMAM, M., PIAZZA, F. M., SELBY, D. M., LETWIN, N., HUANG, L., und ROSE, M. C., 2000: Muc-5/5ac Mucin Messenger RNA and Protein Expression Is a Marker of Goblet Cell Metaplasia in Murine Airways. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 22:253-260.

# **Danksagung**

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jürgen Zentek danke ich herzlich für das Ermöglichen der Arbeit sowie für die fachliche Unterstützung und für das Vertrauen bei der Bearbeitung meiner Dissertation.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Ilen Röhe für die stete Unterstützung.

Ein großer Dank geht auch an Frau Prof. Dr. Johanna Plendl für die Möglichkeit der Zusammenarbeit mit den kompetenten Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Anatomie der FU Berlin. Ich möchte mich hierbei besonders bei Frau Barbara Drewes, Frau Tania Fuhrmann-Selter und Frau Karin Briest-Forch für die wegweisende fachliche Unterstützung in der histologischen Arbeit bedanken. Außerdem bedanke ich mich bei Frau Juliane Rieger, phD, Frau Dr. Hana Hünigen sowie Herrn Dr. Carsten Hopperdietzel für die Unterstützung bei der Auswertung der histologischen Schnitte am Lichtmikroskop.

Herzlichen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Klaus Männer für Hilfe bei der Probenentnahme.

Vielen Dank Frau Marita Eitinger und Frau Alina Zetschke für die Einarbeitung sowie Unterstützung bei Durchführung der PCR.

Aufrichtigen Dank an meine Eltern und meinen Bruder für die Hilfe in fachlicher, persönlicher und finanzieller Hinsicht.

Vielen Dank Madeleine, Bima, Peter und Ingo für die Hilfe beim Vollenden der Arbeit.

Danke Matze für alles, was Du für mich getan hast.

Zum Schluss einen unendlichen Dank an Lisa und Oskar für die dauerhafte Geduld und das Verständnis, das in den vielen Momenten notwendig war.

# Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 13.07.2017

Friedrich Hüttner