

Aus dem Institut für Veterinäranatomie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Einfluss des Probiotikums *Enterococcus faecium* SF 68 (NCIMB 10415)
auf die Morphologie der Darmschleimhaut des Schweines

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

vorgelegt von
Katja Reiter
Tierärztin
aus Berlin

Berlin 2005

Journal-Nr.: 2980

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Prof. Dr. K.D. Weyrauch
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. O. Simon
Dritter Gutachter: Prof. Dr. K.H. Lahrmann

Deskriptoren: probiotic, pig, intestine, intestinal mucosa, intestinal epithelium

Tag der Promotion: 09.12.2005

Meiner Tochter Emily

AB	Alcianblau
AC	Department of Agriculture and Health
B./Bac.	Bacillus
B-Lymphozyt	Lymphozyten, die im Bursa äquivalent heranreifen
BrdU	Brom-Desoxyuridin
BSA	bovine serum albumine (ROTH 8076.2)
C.asc.	Colon ascendens
C.desc.	Colon descendens
Cae	Caecum
CD8 ⁺	Lymphozyten- Cluster of Differentiation
CMC	Carboxymethylcellulose
d	day
DAB	Diaminobenzidin
DFM	direct- fed microbials
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Duo	Duodenum
dUTP	deoxy Uracil Tri Phosphat
E. coli	Echerischia coli
EC-FLAIR	European Community-Food linked Agro Industrial Research Group
EGF	epidermal growth factor
EHCP	ecological health control products
ETEC	enterotoxische E.coli
FAO	Food and Agriculture Organization
GALT	gut associated lymphoid tissue
GaR-Ig	Goat-anti-Rabbit- Immunglobulin (DAKO, Z0421)
GM-CSF	granulocyt- macrophage colony- stimulating factor
HDMS	1,1,1,3,3,3,-Hexamethyldisilazan
HMC	hochmethyliertes Citruspektin
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IGF	insulin-like-growth factor
IL	Interleukin
Ile	Ileum

Jej.	Jejunum
KBE	Koloniebildende Einheiten
Ki67	zelluläres Protein, beteiligt an Zellproliferation
L.	Lactobacillus
LAB	Laktabildende Bakterien
LM	Lichtmikroskop
MaMIB-1	Mäuse-MIB-1 (DAKO M 7240)
MIB-1	Monoklonaler Antikörper
MMC	Mitomycin C
MNS	Maus- Normalserum (DAKO, X0910)
M-PAP	Mouse- Peroxidase- anti- Peroxidase (DAKO, B0650)
mRNA	messanger Rbonukleinsäure
M-Zelle	membranous Zelle
NK	natural killer
NRS	normales Kaninchenserum (DAKO X 0902)
NSwS	normales Schweineserum (DAKO X 0901)
p-Wert	statistische Signifikanz (p von probability)
p.i.	post infectionem
p.p.	post partum
p.w.	post weaning
PAP	Peroxidase-Antiperoxidase
PAS	Perjodic- Acid-Schiffs-Reagenz
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PEN	Fütterung : 80% parenteral + 20% enteral
POD	Peroxidase
PP	Peyer Plaque
PZT	Programmierter Zelltod
RahCaspase-3	Rabbit-ant-Human- Caspase-3 (Serotec, AHP476)
RaMIg	Rabbit-Anti-Maus-Immunglobulin (DAKO Z 0259),
REM	Rasterelektronenmikroskop
R-IG	Rabbit- Immunglobulin (DAKO, X09032)
R-PAP	Rabbit- Peroxidase- anti- Peroxidase (DAKO, Z113)
S.	Salmonella
SABC-Kit	Streptavidin- Biotin- Komplex- POD (DAKO)

Sac.	Saccharomyces
Spp.	subspezies
ss-DNA	single-strang-DNA
TBS	Tris buffered saline
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
TEN	Fütterung: total enteral
TGEV	Transmissibler Gastroenteritis-Virus
TGF	transforming growth factor
T-Lymphozyt	im Thymus geprägter Lymphozyt
TNF	Tumornekrosefaktor
TPN	Fütterung : total parenteral
TRIS	TRIS (Hydroxymethyl)-Aminomethan
TRS	Target Retrieval Solution (DAKO, S1700)
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated Biotin- deoxy Uracil Tri Phosphat Nick End
ZNS	Ziegen-Normalserum (DAKO, X 0907)

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1. Aufbau des Darmes	2
2.1.1. Der Dünndarm	2
2.1.2. Der Dickdarm	4
2.2. Histologie des Darmes	5
2.2.1. Allgemeiner Aufbau	5
2.2.2. Histologischer Aufbau des Dünndarms	8
2.2.3. Histologischer Aufbau des Dickdarms	10
2.2.4. Die lymphatischen Darmkrypten im Dün- und Dickdarm	11
2.3. Die postnatale Entwicklung des Schweinedarms	12
2.4. Becherzellen- Vorkommen und Verteilung im Darm	13
2.5. Probiotika	14
2.5.1. Geschichte der Probiotika	14
2.5.2. Entstehung der Definition	16
2.5.3. Auswahlkriterien	17
2.5.4. Allgemeine Wirkungsmechanismen	18
2.5.5. Durchgeführte Untersuchungen zu den Wirkungsmechanismen	19
2.5.5.1. Untersuchungen zur Anheftung und Besiedlung des Gastrointestinaltraktes	19
2.5.5.2. Untersuchungen zur Wirkung der ausgeschiedenen antimikrobiellen Substanzen	21
2.5.5.3. Untersuchungen zur Veränderung der Immunität durch Probiotika	22
2.5.5.4. Einfluss auf die Morphologie der Darmschleimhaut	26
2.5.5.5. Beeinflussung bestimmter Darmerkrankungen durch Probiotika	27
2.5.5.5.1. Einfluss auf virale Diarrhöen	27
2.5.5.5.2. Einfluss auf bakterielle Diarrhöen	27
2.5.5.5.3. Einfluss auf antibiotika- assoziierte Diarrhöen	28
2.5.5.5.4. Weitere Mechanismen der Probiotika, den Darm vor schädlichen Einflüssen zu schützen	28

2.5.5.6.	Anheftung probiotischer Bakterien	29
2.5.5.7.	Einfluss der Probiotika auf die Qualität und Quantität der Becherzellen bzw. des Muzins	30
2.6.	Einfluss anderer Faktoren auf die Darmschleimhaut	31
2.6.1.	Einfluss verschiedener Faktoren auf Zottenlänge und Kryptentiefe	31
2.6.2.	Einfluss der Fütterung auf Qualität und Quantität der Becherzellen	34
2.6.3.	Einfluss anderer Faktoren auf die Becherzellen	37
2.7.	Proliferation	37
2.7.1.	Einfluss auf die Proliferation im Darm	39
2.8.	Apoptose	43
2.8.1.	Einfluss der Fütterung auf die Apoptose	46
2.8.2.	Einfluss anderer Faktoren auf die Apoptose im Darm	47
2.8.3.	Nekrose	49
2.8.4.	Apoptosenachweise und ihre Eignung	50
3.	Material und Methoden	52
3.1.	Versuchsaufbau, Fütterung und Haltung der Tiere	52
3.2.	Probengewinnung, -aufbereitung und- aufbewahrung	53
3.2.1.	Zubereitung der Proben für die Paraffineinbettung	55
3.2.2.	Zubereitung der Proben für die Rasterelektronenmikroskopie	56
3.3.	Färbung der Paraffinschnitte	56
3.3.1.	Hämatoxylin- Eosin (HE)- Färbung	57
3.4.	Histochemie	57
3.4.1.	Nachweis von Schleimsubstanzen mittels Alzianblau (2,5)- Perjod- Schiff-Färbung (AB (2,5)- PAS- Färbung)	57
3.5.	Immunhistochemie	58
3.5.1.	Nachweis von proliferierenden Zellen mit dem Antikörper MIB- 1	58
3.5.2.	Nachweis apoptotischer Zellen	59
3.5.2.1.	Nachweis mit Apostain	59
3.5.2.2.	Nachweis nach der TUNEL- Methode	60
3.5.2.3.	Nachweis der Caspase-3	61

3.6.	Auswertung der Proben	62
3.6.1.	Morphometrische Auswertung	62
3.6.1.1.	Bestimmung der Zottenlänge	62
3.6.1.2.	Bestimmung der Kryptentiefe	63
3.6.1.3.	Bestimmung des Vergrößerungsfaktors für die Schleimhautoberfläche durch Zotten- bzw. Kryptenbildung	63
3.6.1.4.	Qualitative Bestimmung der Becherzellen	64
3.6.1.5.	Quantitative Bestimmung der Becherzellen	65
3.6.2.	Quantitative Bestimmung der MIB-1- positiven Zellen	65
3.7.	Statistische Auswertung	66
4.	Ergebnisse	67
4.1.	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen	67
4.1.1.	Zottenformen des Duodenums	67
4.1.1.1.	Einzel stehende Zotten	67
4.1.1.2.	Kammbildung	69
4.1.1.3.	Kämme und Zotten	69
4.1.2.	Zottenformen des proximalen Jejunums	70
4.1.2.1.	Einzel stehende Zotten	70
4.1.3.	Zottenformen des distalen Jejunums	71
4.1.3.1.	Einzel stehende Zotten	72
4.1.3.2.	Zotten und Krypten	73
4.1.4.	Zottenformen des Ileums	73
4.1.4.1.	Dome und einzelne Zotten	74
4.1.4.2.	Kammbildung	74
4.1.5.	Schleimhautoberfläche des Dickdarms	75
4.2.	Lichtmikroskopische Untersuchungen	76
4.2.1.	Zottenlänge	77
4.2.2.	Kryptentiefe	82
4.2.3.	Zotten-Krypten-Verhältnis	87
4.2.4.	Vergrößerungsfaktor	90
4.2.4.1.	Vergrößerungsfaktor für die Schleimhautoberfläche durch Zottenbildung	90
4.2.4.2.	Vergrößerungsfaktor für die Schleimhautoberfläche	92

	durch Kryptenbildung	
4.2.5.	Becherzellen und Schleimsubstanzen	95
4.2.5.1.	Qualitative Beurteilung der Becherzellen und Schleimsubstanzen	95
4.2.5.2.	Quantitative Beurteilung der Becherzellen	97
4.2.5.2.1.	Anzahl der Becherzellen pro Millimeter Zottenoberfläche	97
4.2.5.2.2.	Anzahl der Becherzellen pro Millimeter Kryptenumfang	101
4.2.6.	Ergebnisse der Untersuchungen zur Proliferation	104
4.2.7.	Untersuchungen zur Apoptose	108
5.	Diskussion	110
5.1.	Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Darmoberfläche	110
5.1.1.	Das Duodenum	111
5.1.2.	Das Jejunum	111
5.1.3.	Das Ileum	112
5.1.4.	Der Dickdarm	112
5.2.	Lichtmikroskopische Untersuchungen	112
5.2.1.	Zottenlänge	112
5.2.2.	Kryptentiefe	114
5.2.3.	Zotten-Krypten-Verhältnis	115
5.2.4.	Der Vergrößerungsfaktor	117
5.2.5.	Becherzellen	118
5.2.6.	Proliferation	120
5.2.7.	Apoptose	121
6.	Zusammenfassung	124
7.	Summary	126
8.	Literaturverzeichnis	128
9.	Tabellenanhang	178
10.	Danksagung	184
11.	Lebenslauf	185
12.	Selbständigkeitserklärung	186