

5. Diskussion

5.1. Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Darmoberfläche

Rasterelektronenmikroskopisch zeichnet sich die Darmschleimhaut, besonders des Duodenums und Ileums, aller Ferkel durch eine Vielfalt an Zottenformen aus. Alle diese Schleimhautmodifikationen sind jedoch nicht fütterungsbedingt.

TUCH und AMTSBERG (1973) untersuchten mit dem Stereomikroskop die intestinale Mukosa von Schweinen im Alter von 17 und 38 Tagen. Sie fanden sechs Zottentypen: finger-, zungen- und blattförmige, verzweigte, labyrinthartig verlaufende und atrophierte Zotten. Sie sind der Meinung, dass sich die Mukosastruktur einerseits durch eine Änderung der Fütterung oder der Darmflora verändert, aber dass andererseits die Zottenvielfalt auch zum normalen Bild der Darmschleimhaut gehört. Oft wird dieses Phänomen bei Schweinen mit dem Absetzen in Verbindung gebracht, da hier eine Veränderung der Zusammensetzung und Struktur des Futters stattfindet, die eine Wirkung auf die Darmschleimhaut haben kann.

LANGHOUT et al. (1999) fanden heraus, dass die Zugabe von hochmethyliertem Zitruspektin (HMC) die Zottenform im Ileum von Broilern beeinflusst, indem die Anzahl der zungenförmigen Zotten im Vergleich zu den Kontrolltieren zunahm, wohingegen die Anzahl der für Geflügel typischen zickzackförmigen sowie die der kammartigen Zotten durch die HMC-Diät reduziert wurde.

KENWORTHY (1976), HAMPSON (1986) und CERA et al. (1988) beschrieben auch beim Schwein diese Vielfalt, gehen jedoch nicht auf eine evtl. Fütterungsabhängigkeit ein.

Einen gewissen Einfluss auf die Zottenform scheint das Alter zu haben. So findet man im vorliegenden Fall bei den 14 Tage alten Tieren im Dünndarm keine Zottenkämme, sondern eher einzeln stehende, lange, fingerförmige Zotten. Zu dieser Erkenntnis gelangten auch andere Autoren (KENWORTHY, 1976; DUNSFORD et al., 1989; LI et al., 1990; JIN et al., 1994; WIESE, 2002). VODOVAR (1964) stellte fest, dass bei Schweinen die Zottenform mit zunehmendem Alter eine Verbreiterung aufweist. Und MOUWEN (1972) ist der Meinung, kammförmige Zotten entstünden möglicherweise durch eine Zottenfusion. Zusätzlich könnten diese Zotten eine Vorform darstellen, die nach dem Verlust der herkömmlichen (zungen- und blattförmigen) Zottenform entsteht.

MITJANS und FERRES (2004) untersuchten den Einfluss der Entwicklung auf die Zottenformen im Dünndarm von einem Tag, zwei und zwölf Wochen alten Meerschweinchen. Sie fanden dabei, dass die einen Tag alten Meerschweinchen

spitzauslaufende, fingerförmige Zotten besitzen. Bei den zwei Wochen alten Tieren waren die Zotten breiter und eher spatelförmig. Die Zottenspitzen waren abgerundet und ließen auf ihrer Oberfläche Risse erkennen. Bei den 12 Wochen alten Meerschweinchen waren die Zotten an ihrer Basis verbreitert und annähernd zungenförmig.

Auch Broiler lassen hinsichtlich ihrer Zottenformen ebenfalls eine Altersabhängigkeit erkennen (VAN LEEUWEN et al., 2004). Während bei den sieben Tage alten Tieren hauptsächlich zungen- und blattförmige Zotten im mittleren Abschnitt des Dünndarms gefunden wurden, stieg in der Zeit vom siebenten bis zum 14. Lebenstag die Anzahl der kammförmigen Zotten von 7% auf 63% an. In der Zeit vom 14. bis zum 28. Lebenstag waren die Veränderungen nicht so deutlich.

5.1.1. Das Duodenum

Die vorherrschende Zottenart im Duodenum ist zungenförmig.

Ausnahmen bilden extrem lange Zotten, die dann, wie im Jejunum, fingerförmig schlank sind, und kurze Zotten, die die Form einer Zigarre haben. Ihr freies Ende ist abgerundet.

Auch die Zottenkämme zeigen verschiedene Erscheinungsformen. Einige scheinen aus zwei Zotten zu bestehen, die sich bogenförmig verbunden haben, und andere bilden einen langen Kamm, der keine einzelne Zotte mehr erkennen lässt. Dazwischen gibt es noch Übergangsformen. Weiterhin ist auffällig, dass bei einigen Ferkeln eine Mischform aus einzelnen Zotten und Kämmen vorkommt, d.h. die beiden Typen liegen dicht nebeneinander. Bei anderen Tieren stehen Zotten und Zottenkämme isoliert.

Bei einem Vergleich der rasterelektronenmikroskopisch untersuchten Kämmen mit den lichtmikroskopischen Befunden ist zu erkennen, dass sich im Gewebeschnitt die Zottenkämme als flache, breite Zotten zeigen.

5.1.2. Das Jejunum

Das Jejunum ist der Darmabschnitt, in dem die längsten Zotten gefunden wurden, eine Erkenntnis, die auch von anderen Autoren (SMOLLICH, MICHEL, 1992; JUNGUEIRA, CARNEIRO, 1986; GOERKE, 2000; LIEBICH, 2003) beim Schwein bzw. anderen Tierarten getroffen wurde. Das rasterelektronenmikroskopische Bild bestätigt die in dem morphometrischen Teil bezüglich der Zottenlänge gewonnenen Erkenntnisse. Denn die Ausmessungen der Zotten ergaben für diesen Darmabschnitt die höchsten Werte.

Im Vergleich zu den anderen Dünndarmabschnitten kommt es hier nur selten zur Ausbildung von Zottenkämmen. Die Zotten, die nahezu alle gleich lang sind, bilden einen regelmäßigen Zottenrasen.

Hier gibt es überwiegend lange, zungen- und fingerförmige, schlanke Zotten.

5.1.3. Das Ileum

Das Ileum stellt den variantenreichsten Dünndarmabschnitt dar. Die Zotten stehen einzeln wie im Duodenum und Jejunum und haben ein zungenförmiges, manchmal auch blattförmiges Aussehen. Selten erreichen die Zotten einer Gewebsprobe eine einheitliche Höhe, so dass sich, im Gegensatz zu den anderen Dünndarmabschnitten, ein oft inhomogenes Bild ergibt. Das Bild der Darmschleimhaut wird durch sog. Dome bestimmt, d.h. zwischen herkömmlichen Dünndarmzotten liegen breite, kuppelförmige Schleimhauterhebungen.

LIEBICH (2003) beschreibt die Dome als kuppelförmige Vorwölbungen der Tunica mucosa, die häufig die Darmzotten verdrängen.

5.1.4. Der Dickdarm

Die Oberfläche der einzelnen Dickdarmabschnitte zeigt nur wenig lokale Unterscheidungsmerkmale.

Die Ursache für die weit über die Oberfläche herausragenden Krypteneingänge könnte einmal in den verschiedenen Kontraktionszuständen der Darmschleimhaut liegen oder auch präparationsbedingter Natur sein.

5.2. Lichtmikroskopische Untersuchungen

Die morphometrischen Untersuchungen zeigen eine große Variabilität zwischen den einzelnen Tieren innerhalb einer Gruppe und zwischen den Gruppen selbst.

5.2.1. Zottenlänge

Generell ergibt die Messung der Zottenlänge große Standardabweichungen, d.h. die Streuung innerhalb eines einzigen Individuums ist oft schon sehr groß, ganz zu schweigen von den fünf Tieren einer Alters- und Fütterungsgruppe.

So konnten auch bei allen Parametern, die die Länge der Zotten beschreiben, keine Gruppeneffekte festgestellt werden. Die Zotten können in einer der mit *E. faecium* gefütterten Tiergruppe länger sein, als die der zugehörigen Kontrollgruppe, an anderer Stelle herrschen umgekehrte Verhältnisse.

KLEIN und SCHMIDTS (1997), die Ferkeln über einen Zeitraum von 28 Tagen *B. cereus* applizierten hatten, gelangten diesbezüglich zu einem anderen Ergebnis. Sie erkannten bei Probiotikumfütterung eine Zunahme der Zottenlänge im Jejunumbereich.

Auch bei GOERKE (2000) kam es durch die Fütterung von *Sac. boulardii* und *B. cereus toyoi* zu einer Verlängerung der Zotten zumindest im Jejunum 50 und 64 Tage alter, abgesetzter Ferkel.

Die Ursache für die Unterschiede zu den von uns erhobenen Befunde könnte einmal in dem unterschiedlichen Tiermaterial gesucht werden, da die Tiere der anderen Autoren älter waren. Eine andere Ursache mögen auch die verschiedenartigen Probiotika sein, die bei den jeweiligen Untersuchungen zum Einsatz kamen.

DI GIANCAMILLO et al. (2003) fanden bei Absatzferkeln, denen sie über 30 Tage lang den Hefestamm CNCM I-1079 (Levucell® SB) im Futter verabreicht hatten, eine Verlängerung der Ileumzotten im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Im vorliegenden Fall konnten, wie auch schon im REM festgestellt, nur Alters- bzw. Darmabschnittseffekte beobachtet werden.

In allen Dünndarmabschnitten nimmt die Zottenlänge zunächst bis zum 28. Tag zu. Am 35. Tag sind die Zotten dann jedoch meist kürzer als am 28. Tag. Dieses Phänomen lässt sich vermutlich mit dem Effekt des Absetzens erklären. Die Ferkel sind nach dem Absetzen in einer Umgewöhnungsphase. Sie nehmen weniger von dem neuen Futter auf und verlieren dadurch etwas Gewicht. Bekommen die Ferkel aber nach dem Absetzen Sauenmilch, so kommt es zu einer geringeren Zottenatrophie als bei Ferkeln, die kommerzielles Ferkelfutter bekommen (BEERS- SCHREURS, 1996).

Auch eine Zufütterung während der Saugphase kann die Futtermittelaufnahme und das Wachstum nach dem Absetzen positiv beeinflussen (BRUININX et al., 2003).

Bei Verkürzung der Zotten ist die Resorptionsfläche verkleinert, so dass unter Umständen die ankommenden Nährstoffe nicht optimal resorbiert werden können.

Durch die geringere Nahrungsaufnahme aber verkürzen sich die Zotten, da sie nicht mehr zum Wachstum „angetrieben“ (aktiviert) werden. MILLER et al. (1986); CERA et al. (1988) und PLUSKE et al. (1996) stellten bei nichtabgesetzten Ferkeln eine Verkürzung der Zottenhöhe fest. BRUININX et al. (2003) fand beim älteren abgesetzten Ferkel im Gegensatz

zum jüngeren nichtabgesetzten 160 μm längere Zotten und ein deutlich höheres Zotten-/Kryptenverhältnis.

HAMPSON (1986) und NABUURS et al. (1993) beschrieben die geringsten Zottenhöhen am dritten und vierten Tag nach dem Absetzen. Der Wert für die Zottenhöhe, wie er vor dem Absetzen war, wurde erst wieder am 11. bis 14. Tag nach dem Absetzen erreicht.

Ähnliche Beobachtungen machten VENTE- SPREEUWENBERG et al. (2004) an mit 28 Tagen abgesetzten Ferkeln, die sie mit unterschiedlichen Proteindiäten fütterten. Sie stellten fest, dass, wenn die Ferkel an das neue Futter adaptiert waren, die Zotten wieder länger wurden. Laut BRUININX et al. (2003) beginnt etwa am fünften Tag nach dem Absetzen der Prozess der Zottenerneuerung.

In unseren Untersuchungen haben die Zotten aller Dünndarmabschnitte bei allen Tieren am 56. Tag (28 Tage p.w.) den höchsten Wert erreicht.

Bei Broilern, die natürlich keine Absetzphase durchmachen, kam es, im Gegensatz zu Ferkeln, mit zunehmendem Alter zu einer kontinuierlichen Zunahme der Zottenlängen (IJI, 2001). Wurde aber die erste Fütterung nach dem Schlupf aufgeschoben, so kam es hier zu einer verzögerten Entwicklung der Mucosa, d.h. die Zotten verkürzten sich, und die Kryptentiefe nahm ab. Bei Fütterung wurde die Abnahme nach etwa fünf Tagen wieder kompensiert und erreichte den Kontrollwert (ZEHAHA, SKLAN, 1999).

Auch Ratten, die eine Hungerperiode durchmachten, zeigten eine Mucosaatrophie. Eine komplette Wiederherstellung der Verhältnisse vor der Hungerperiode war drei Tage nach Beginn der Wiederfütterung abgeschlossen (HABOLD et al., 2004).

5.2.2. Kryptentiefe

So wie die Zotten, erfahren auch die Krypten aller untersuchten Ferkel eine altersabhängige Beeinflussung der Morphologie. Mit fortschreitendem Alter kommt es in allen Darmabschnitten zu einer kontinuierlichen Zunahme der Kryptentiefe, ohne dass das Absetzen einen Einfluss zu haben scheint. Zu diesem Ergebnis gelangten auch MILLER et al. (1986); CERA et al. (1988); PLUSKE et al. (1996) und VENTE- SPREEUWENBERG et al. (2004), die die Dünndarmmorphologie abgesetzter Ferkel untersuchten, sowie IJI et al. (2001), die den Einfluss eines kommerziellen Starterfutters an Broilern untersuchten.

Auch Meerschweinchen zeigen eine kontinuierliche Zunahme der Kryptentiefe mit dem Alter (MITJANS und FERRER, 2004).

Die Fütterung scheint im vorliegenden Fall keinen Einfluss auf die Krypten zu haben. Es gibt zwar unterschiedliche Werte für die Kryptentiefe, diese sind aber einmal bei den mit *E. faecium* gefütterten Ferkeln höher als bei den Kontrolltieren und ein anderes Mal herrschen umgekehrte Verhältnisse. Diese Unterschiede sind in keinem Fall signifikant.

Auch GOERKE (2000) fand bei den von ihr untersuchten Absatzferkeln keine Unterschiede hinsichtlich der Kryptentiefe in Abhängigkeit von der Fütterung.

DI GIANCAMILLO et al. (2003) fanden allerdings bei abgesetzten Ferkeln, die 30 Tage lang den Hefestamm CNCMI-1079 (Levucell® SB) erhalten hatten, Ileumkrypten, die signifikant tiefer waren als bei den Kontrollferkeln.

Die Kryptentiefe scheint von der Lage im Darmtrakt abhängig zu sein. Sie ist im gesamten Dickdarm größer als in allen Dünndarmabschnitten. Bei Broilern nimmt die Kryptentiefe vom Duodenum zum Ileum hin ab (IJI et al., 2001). Dieses Ergebnis konnte beim Ferkel nicht bestätigt werden.

5.2.3. Zotten-Krypten-Verhältnis

Das Zotten- Krypten- Verhältnis gibt an, um ein wie vielfaches die Darmoberfläche durch Zottenbildung im Verhältnis zu der Kryptenbildung vergrößert wird.

Auch hier sind keine Gruppeneffekte zu verzeichnen, es finden sich lediglich die bei der Vermessung der Zottenlänge gefundenen Variationen wieder.

MCDONALD et al. (2001) fanden bei der Fütterung von Ferkeln mit einer Reisdät unter dem Zusatz von Carboxymethylcellulose (CMC) mit niedriger Viskosität im Vergleich zu einer Fütterung mit dem Zusatz von CMC mit hoher Viskosität oder der reinen Reisdät, dass das Zotten-Krypten-Verhältnis bei CMC-Diät mit der hohen Viskosität signifikant reduziert war. Auch die Zottenhöhen zeigten hier geringere Werte. Bei den Kontrolltieren und den Ferkeln, die die CMC-Diät mit einer niedrigen Viskosität erhalten hatten, war das Zotten-Krypten-Verhältnis etwa gleich hoch.

Auch DI GIANCAMILLO et al. (2003), die den Einfluss eines Hefezusatzes auf die Morphologie des Ileums untersuchten, fanden in den Ferkelgruppen, die dieses Futter erhalten hatten, dass das Zotten-Krypten-Verhältnis im Ileum, verglichen mit der Kontrollgruppe, abnahm.

Ferkel, die zusätzlich zum Futter *Lactobacillus brevis* 1E-1 bekamen, hatten am 10.

Lebenstag ein größeres Zotten-Krypten-Verhältnis im Ileum als die Kontrollschweine. Am 21. und 28. Lebenstag waren keine Unterschiede mehr zu erkennen (DAVIS et al., 2003).

Kälber, die vom ersten bis dritten Tag reines Kolostrum und vom vierten bis siebenten Tag Kolostrum mit einem Zusatz von Milchaustauscher bekamen, hatten im Duodenum ein größeres Zotten-Krypten-Verhältnis als Kälber, die vom ersten bis dritten Tag Kolostrum und dann reinen Milchaustauscher bekommen hatten. Bei Kälbern, die nur Milchaustauscher erhielten, war das Zotten- Krypten- Verhältnis am kleinsten (BLÄTTLER et al., 2001). VAN NEVEL et al.(2003) fanden bei Ferkeln, die zusätzlich zum normalen Futter als β -Glucanquelle 0,1%iges Lentinan erhielten, ein höheres Zotten-Krypten-Verhältnis als bei den Kontrolltieren. Dieses kam dadurch zustande, dass die Zotten länger wurden, die Krypten aber unverändert blieben.

Vergleichsweise führte hingegen ein Zusatz von L-Glutamin und/oder Nukleotiden zu einer Abnahme des Zotten-Krypten-Verhältnisses im Ileum weiblicher, abgesetzter Ferkel, da sich hier sowohl Zottenhöhe als auch Kryptentiefe erhöhten (DOMENEGHINI et al., 2004). Bei den vorliegenden Untersuchungen passen die Ergebnisse der Bestimmungen der Zottenlänge und Kryptentiefe im Jejunum sehr gut zu den Werten des Zotten- Krypten-Verhältnisses, denn hier wurden die längsten Zotten und kürzesten Krypten gemessen, die Werte sind hier teilweise doppelt so hoch wie im Duodenum. Im Vergleich zum Ileum unterscheiden sich diese jedoch nicht so deutlich.

Auch hinsichtlich der Altersentwicklung bestätigen sich hier die bei der Vermessung der Zotten gewonnenen Erkenntnisse. Das Verhältnis Zotte-Krypte zeigt bei den 14 und 28 Tage alten Tieren in allen Darmabschnitten die größten Werte. Am 35. Tag ist der Faktor entsprechend den geringen Zottenlängen am niedrigsten. Auch dieses Ergebnis dürfte mit den Vorgängen nach dem Tag des Absetzens im Zusammenhang stehen. Am 56. Tag ist das Zotten-Krypten-Verhältnis bei sämtlichen Tieren wieder höher. Es erreicht allerdings nicht die Werte, die bei den 14 und 28 Tage alten Tieren gemessen wurden. Der Grund hierfür liegt darin, dass die Zotten nicht in dem Maße mit dem Alter länger werden, wie das bei der Kryptentiefe der Fall ist.

Untersuchungen zum Einfluss der Entwicklung auf die Morphologie des Dünndarms des Meerschweinchens zeigten, dass sich das Zotten-Krypten-Verhältnis in der Zeit vom ersten Lebenstag bis zur 12. Lebenswoche nicht signifikant verändert (MITJANS, FERRER, 2004). Nichtabgesetzte Ferkel haben ein deutlich höheres Zotten-Krypten-Verhältnis als Ferkel, die gleich alt sind, aber schon seit fünf Tagen abgesetzt waren (BRUININX et al., 2003). SPREEUWENBERG et al. (2001) fand beim Ferkel am 26. Lebenstag (Absetztag) und danach ähnliche Verhältnisse.

Auch TANG et al. (1999) kamen durch ihre Untersuchungen zu der Erkenntnis, dass das Absetzen einen Einfluss auf die Morphologie des Dünndarms hat. Sie untersuchten Ferkel, die mit 12 Tagen abgesetzt wurden, am 11. Tag, also einen Tag vor dem Absetzen, und am 15. Lebenstag (drei Tage nach dem Absetzen). Die 15 Tage alten Tiere hatten, bedingt durch eine Zottenverkürzung und Verlängerung der Krypten, ein, im Vergleich zu den noch nicht abgesetzten 11 Tage alten Ferkeln, reduziertes Zotten-Krypten-Verhältnis.

SHIRKEY et al. (2003) fanden bei 13 Tage alten Ferkeln, die keimfrei aufgezogen bzw. mit *Lactobacillus fermentum*, *E. coli* K88 oder Kot von adulten Schweinen inokuliert worden waren, hinsichtlich deren Zotten-Krypten-Verhältnisses die größten Unterschiede im distalen Dünndarm.

5.2.4. Der Vergrößerungsfaktor

Zur Charakterisierung der Schleimhautoberfläche wurde der von WIESE (2002) beschriebene Vergrößerungsfaktor für die Schleimhautoberfläche durch Zotten- bzw. Kryptenbildung herangezogen. Der Vorteil dieses Faktors besteht darin, dass er alle Zotten einbezieht, d.h., es werden nicht nur die geraden, fingerförmigen Zotten ausgewählt, was eine gewisse subjektive Beeinflussung beinhaltet, sondern es wird ein beliebiger Ausschnitt auf einem Gewebeschnitt gewählt und dann die gesamte Oberfläche, egal ob mit kurzen oder langen Zotten ausgestattet, bestimmt.

Für die Vermessung des Kryptenbereichs gilt dasselbe. Gerade und unverzweigte Krypten sind selten zu finden, stattdessen gelangt man über den Quotient aus dem Kryptenumfang und der Länge der Lamina muscularis mucosae zu zuverlässigen Werten. Ein weiterer Vorteil spiegelt sich auch in den gewonnenen Werten wider. Die Streuung eines Tieres und einer ganzen Gruppe ist bei dieser Art der Messung sehr gering.

Der hierbei berechnete Mittelwert ergibt ein realistischeres Ergebnis, als das bei der Vermessung der Zottenlänge bzw. Kryptentiefe der Fall ist. Allerdings ergibt auch dieser Parameter keine sicheren Erkenntnisse hinsichtlich einer fütterungsbedingten Beeinflussung der Darmschleimhaut.

Der Vergrößerungsfaktor der Zottenoberfläche erbringt, wie erwartet, bei allen untersuchten Tieren im Jejunum die größten Werte, d.h., die Zotten vergrößern hier die Darmoberfläche am stärksten. Den größten Faktor zeigt das distale Jejunum.

Bezüglich der altersabhängigen Entwicklung des Vergrößerungsfaktors sind die Ähnlichkeiten mit den aus der Bestimmung der Zottenlänge gewonnenen Messwerten zu erkennen.

So weisen die 35 Tage alten Ferkel beider Fütterungsgruppen in allen Dünndarmabschnitten einen kleineren Vergrößerungsfaktor für die Zottenoberfläche auf, als die jüngeren bzw. älteren Tiere. In einigen Fällen zeigen auch die 28 Tage alten Ferkel einen kleineren Vergrößerungsfaktor als die 14 und 56 Tage alten Geschwister.

Vergleichsweise stellten MITJANS und FERRER (2004) bei ihren Untersuchungen am Dünndarm des Meerschweinchens fest, dass der Vergrößerungsfaktor im Duodenum mit zunehmendem Alter um ein 1,4faches zunimmt. Im Jejunum und Ileum verringerte sich der Faktor um ein 0,8faches. Dabei ist allerdings festzuhalten, dass die Autoren zur Ermittlung des Vergrößerungsfaktors eine von unserer Methode abweichende Technik anwandten. Bezüglich der Darmkrypten bestätigen die für die Kryptenoberfläche gewonnenen Werte die aus der Vermessung der Kryptentiefe erzielten Befunde. Der Vergrößerungsfaktor ist in den Dünndarmabschnitten kleiner als in den Dickdarmabschnitten.

Im Gegensatz zu dem für die Zottenoberfläche ermittelten Vergrößerungsfaktor ist im Kryptenbereich eine kontinuierliche Zunahme mit dem Alter zu erkennen.

5.2.5. Becherzellen

Während die qualitative Auswertung nur eine Charakterisierung der Schleimsubstanzen ermöglicht, stellt die quantitative Bestimmung eine aussagekräftigere Beurteilung dieses Zelltyps dar. Im vorliegenden Material findet man allgemein in den Zotten und Krypten des Duodenums und Ileums mehr Becherzellen als im gesamten Jejunum.

Die Anzahl der Becherzellen in den Zotten ist geringer als in den Krypten und nimmt im Verlauf der Zottenbasis zur Zottenspitze ab, ein Ergebnis, dass auch DELLMANN und EURELL (1998) beschrieben haben.

Laut LIEBICH (2003) nimmt die Anzahl der Becherzellen bei verschiedenen Spezies vom Duodenum über das Jejunum zum Ileum hin zu. DELLMANN und EURELL (1998) fanden im Ileum des Menschen zwei- bis dreimal mehr Becherzellen als im Duodenum. Im vorliegenden Fall konnte dies für das Schwein nicht bestätigt werden.

Die Becherzellanzahl pro Zottenoberfläche ist der einzige Parameter, bei dem im vorliegenden Material ein Gruppeneffekt aufgetreten ist. Bei den 14 Tage alten Tieren besaßen die zur Probiotikumgruppe gehörenden Tiere signifikant mehr Becherzellen im Zottenepithel als die Kontrolltiere.

Trotzdem kann man nicht von einem Einfluss der Probiotikumaufnahme auf die Anzahl der Becherzellen sprechen. Ein Unterschied scheint hier eher zufällig zu sein, zumal in den

anderen Altersgruppen ein umgekehrtes Verhältnis vorliegt, aber der Unterschied nicht signifikant ist.

GOERKE (2000) fand bei der Behandlung von Absatzferkeln mit *Sac. boulardii* im Caecum eine gegenüber den Kontrolltieren erhöhte Anzahl der Becherzellen.

Ferkel, die während der Saugphase und nach dem Absetzen einen Zusatz von *L. brevis* erhalten hatten, wiesen am zehnten Lebenstag weniger sulfatierte Becherzellen auf als die Kontrolltiere der gleichen Altersgruppe. Im Alter von 21 und 28 Tagen konnte dann kein Unterschied mehr festgestellt werden (DAVIS et al., 2003).

Vergleichsweise konnte mit der Zunahme des Rohproteingehalts eine Zunahme der Anzahl der Becherzellen im distalen Jejunum abgesetzter Ferkel verzeichnet werden (GU, LI, 2004). Der Zusatz von niedrigmethyliertem und hochmethyliertem Zitruspektin zum normalen Futter führte bei Broilern zu einer Zunahme der Becherzellen in den Zotten. Die Anzahl der Becherzellen in den Krypten wurde durch den Zusatz von Zitruspektin nicht beeinflusst (LANGHOUT et al., 1999).

Auch SPREEUWENBERG et al. (2001), die den Einfluss von Protein- und Laktosegehalt im Futter bei abgesetzten Ferkeln untersuchten, stellten fest, dass die Zahl der Becherzellen in den Krypten durch diese Diät nicht beeinflusst wird und sich auch nicht im Verlauf der Zeit nach dem Absetzen verändert.

Bei einer totalen parenteralen Ernährung kam es zu einer Zunahme von Becherzellen, die sauren Schleim enthielten (CONOUR et al., 2002).

Das Alter der Tiere hat, wenn überhaupt, im vorliegenden Material einen geringen Einfluss auf die Anzahl der Becherzellen. So war nur in einigen wenigen Darmabschnitten, z.B. in den Zotten des distalen Jejunums und in den Krypten beider Jejunumabschnitte sowie des Colon descendens, eine gewisse altersabhängige Zunahme der Becherzellen zu erkennen.

Bei der qualitativen Bestimmung der Becherzellen fällt auf, dass der Schleim in den Becherzellen meist sauer reagiert bzw. gelegentlich saure und neutrale Anteile aufweist.

Schon MICHEL (1988) hatte festgestellt, dass man die Becherzellen des Schweins nicht eindeutig in Alcianblau- oder PAS- positiv einteilen kann. Seiner Meinung nach rührt dieser Befund vom Gehalt an sauren und neutralen Glykoproteinen her.

BROWN et al. (1988) sind der Meinung, dass die Qualität des Schleims der Becherzellen von deren Lokalisation im Darm abhängig ist. Sie fanden an der Kryptenbasis aller Darmabschnitte, vorrangig aber im Dickdarm der von ihnen untersuchten Altersgruppen, nicht sulfatierte saure Becherzellen. Becherzellen mit neutralem Muzin waren weiter oben in den Krypten bzw. in den Zotten zu finden. Auch sie konnten nach dem Absetzen einen

kontinuierlichen Anstieg der Becherzellzahl in den Zotten und Krypten mit zunehmendem Alter beobachten.

Der surface coat (Oberflächenschleim) ist im vorliegenden Untersuchungsgut, unabhängig von der Fütterung, meist neutral. Nur im Colonbereich ist diese Schleimschicht Alcianblau-positiv. Der Grund hierfür könnte der Schutz vor Bakterien sein, deren Population im Dickdarm dichter ist als im Dünndarm. Bakterien können nur neutralen Schleim durchdringen. Ist der Schleim aber sauer, so können sie ihre Enzyme, wie Proteasen usw., nicht anwenden (ROBERTON et al., 1997; FONTAINE et al., 1998).

5.2.6. Proliferation

Während aus der Literatur bekannt ist, dass bestimmte Futterzusatzstoffe, wie z.B. lösliches Faserpektin (FUKUNAGA et al., 2003) oder kurzkettige Fettsäuren wie Butyrat (SAKATA, 1987; BOFFA et al., 1992; SIAVOSHIAN et al., 1997), einen regulativen Einfluss auf die Proliferation von Darmepithelzellen haben, kann in unserem Material keinerlei Abhängigkeit von der Fütterung mit dem Probiotikum *E. faecium* ermittelt werden.

Allerdings muss man bei einem Vergleich mit anderen Untersuchungen den Einfluss der Tageszeit berücksichtigen, da die Mitose einem zirkadianem Rhythmus unterliegt (BARBEITO et al., 2003). Es kann außerdem keine altersabhängige Proliferation festgestellt werden.

Bei Mäusen hingegen wiesen die 14 Tage alten Tiere eine höhere Anzahl proliferierender Enterozyten im Duodenum und Kolon auf als die sieben Tage alten Tiere (BARBEITO et al., 2003).

Im vorliegenden Fall kann nur eine Abhängigkeit von der Lage im Darmtrakt festgestellt werden. So finden sich im Jejunum im Vergleich zu den anderen Darmabschnitten die größte Anzahl proliferierender Zellen. Offensichtlich korreliert hier die Anzahl proliferierender Zellen mit der großen Zottenlänge des Jejunums. Andererseits zeigen die Ergebnisse unserer Kryptenmessungen, dass bei tiefen Krypten die Proliferation eher gering ist.

Bei Mäusen ist die mitotische Aktivität im Duodenum vergleichsweise höher als im Kolon (BARBEITO et al., 2003).

Das Ileum weist gegenüber den übrigen Darmabschnitten eine Besonderheit auf. So sind in Zonen, wo die Lymphfollikel der Peyer' Plaques in der Tela submucosa liegen, die darüber liegenden Krypten weniger tief, dennoch enthalten sie deutlich proliferationsaktive Zellen.

In Arealen, wo die Lymphfollikel die Propria erfüllen und bis an das Schleimhautepithel reichen (sog. Domebildung), befinden sich keine Lieberkühn`Krypten. In diesem Epithelbereich sind keine proliferierenden Enterozyten auszumachen.

Es erhebt sich die Frage, wie hier der Nachschub an Enterozyten vonstatten geht.

Möglicherweise stammen die neugebildeten Zellen aus den seitlich der Dome liegenden Krypten.

5.2.7. Apoptose

Der Nachweis des programmierten Zelltodes wurde mit Hilfe drei verschiedener Methoden versucht.

Die TUNEL-Methode ergibt im Bereich des Schleimhautepithels auch bei Anwendung verschiedener Standardtechniken immer nur negative Ergebnisse im Bereich der Enterozyten. Im Gegensatz zu GROOS et al. (2003), die verschiedene Apoptosenachweise beurteilten und die TUNEL- Methode als wenig zuverlässig beschrieben, da sie für jede Spezies (sie untersuchten Menschen und Ratten) eine eigene Nachweisteknik entwickeln mussten, scheint in unserem Fall die Ursache nicht in der Methodik zu liegen. TUNEL- positive Zellen zeigen sich im Bereich der Lymphfollikel sowie in der Lamina propria, so dass unser Ergebnis nicht als rein negativ zu bewerten ist.

Weiterhin ist zu beachten, dass bei dieser Methode DNA- Fragmente, deren Enden hier markiert werden, nicht nur in histologisch definierten Apoptosezellen vorkommen, sondern auch in morphologisch intakten Zellen, die sich bereits im Prozess des programmierten Zelltods befinden (UMANSKY, 1982; MOTYLU und REYNOLDS, 1991). Apoptotische Zellen können mit der TUNEL- Methode erkannt werden, bevor sich die morphologischen Kriterien des PZT manifestieren.

SCHAUSER et al. (2005), die den Einfluss einer *S. typhimurium*- Infektion auf die Apoptose im Jejunum von Schweinen untersuchten, nutzten u. a. zum Nachweis auch die TUNEL- Methode. TUNEL- positive Zellen wurden v. a. im intestinalen Lumen, aber selten im Epithel und in der Lamina propria gefunden.

Der Nachweis mit Apostain zeigt in allen untersuchten Darmabschnitten nur negative Ergebnisse. Hier können auch im Bereich der Lymphfollikel und in der Lamina propria keine markierten Zellen entdeckt werden. Die Ursache hierfür ist hauptsächlich in der Nachweisteknik zu suchen.

Die dritte von uns genutzte immunhistochemische Methode, der Nachweis der Caspase-3, erbringt positive Ergebnisse. Vor allem in den Krypten, und zwar an deren Basis und Seitenwand, zeigen sich Caspase-3- positive Zellen (Enterozyten). Auch in den Zotten sind vereinzelt positiv markierte Zellen zu sehen, die sich vor allem im seitlichen Zottenepithel befinden. Allerdings kommt es zum Teil bei den Kontrollen mit R-Ig zu einer positiven Bindung von Zellen in der gleichen Lokalisation, wie bei dem Nachweis mit der Rah-Caspase-3. Man muss also davon ausgehen, dass es sich hier um unspezifische Bindungen handelt, die zu einem falsch positiven Ergebnis führen. Des Weiteren sind keine Caspase-3 positive Zellen in den Lymphfollikeln zu sehen, obwohl andere Autoren (NIELSEN et al., 2005; RYN et al., 2005) Caspase- 3 Aktivität in den Lymphozyten gefunden haben, so dass eine Kontrolle auf Zuverlässigkeit in dieser Hinsicht nicht durchgeführt werden kann. Es ist nicht bekannt, ob es zu einer Kreuzreaktion des Antikörpers (Rah- Caspase-3) mit dem Schwein kommt.

Ein weiterer Hinweis auf ein falsch positives Ergebnis bei dem Caspase- 3- Nachweis ist die hohe Anzahl markierter Zellen in den Darmepithelien. Wie schon an anderer Stelle erwähnt sieht man nur in etwa jeder fünften Krypte eine apoptotische Zelle (POTTEN et al., 1997). Aufgrund der unzuverlässigen Befunde, wird von einer systemischen morphometrischen Auswertung Abstand genommen. Möglicherweise sind diese Apoptosenachweismethoden für Schweinegewebe nicht spezifisch genug.

SCHAUSER et al. (2005) fanden Caspase-3- aktive Zellen vereinzelt in den Zotten des Jejunums vom Schwein, v. a. im Bereich der Zottenspitze, aber auch weiter unten in den Zotten. Die durchgeführten Kontrolluntersuchungen, bei denen der Antikörper mit einem korrespondierenden Peptid geblockt wird, waren in allen Fällen negativ.

KERR (1987) fand, entgegen der allgemeinen Annahme, keine apoptotische Zellen an der Zottenspitze

Laut GROOS et al. (2003) ist der Caspase- Nachweis ein zuverlässiger Nachweis von toten und sterbenden Zellen in frisch präparierten sowie fixierten Paraffin- Dünndarmproben bei Mensch und Ratte. Die positiv markierten, also apoptotischen Zellen wurden von diesen Autoren nur im Bereich der Lieberkühn' Krypten gefunden.

Dieses Ergebnis deckt sich mit den Erkenntnissen, die auch POTTEN (1997) gewonnen hat. Er fand vor allem in den Krypten von Mäusen und Menschen, und zwar in der Region, in der auch die Stammzellen liegen, spontane Apoptosen. Seiner Meinung nach dient das der Kontrolle der Stammzellen und ist die Basis für das Erhalten des Gleichgewichtes des zellulären outputs der Krypten und Zotten, um eine stabile Kryptengröße beizubehalten.

Nach seinen Untersuchungen gehen 10% der Stammzellen durch den Vorgang der Apoptose zugrunde.

Als weiteren Faktor, der die Apoptose beeinflusst, muss man die Tageszeit berücksichtigen. Denn wie die Proliferation, unterliegt auch die Apoptose einem zirkadianen Rhythmus, der, je nach Spezies, zeitlich variiert (POTTEN, 1977; FUJIMOTO et al., 1978; TABATA et al., 1986). In unseren HE- Schnitten sind nie apoptotic bodies im Epithel zu sehen, so dass evtl. zum falschen Tageszeitpunkt untersucht wurde.

Von anderen Autoren wurde beschrieben, dass es im Lichtmikroskop schwer ist, einen in situ Zelluntergang zu erkennen, da sein Erscheinen nur wenige Minuten dauert (RUSSELL et al., 1972; SANDEERSON, 1976 und MATTER, 1979).

BEST et al. (1999) fanden bei der lichtmikroskopischen Untersuchung im Dünndarmepithel von Broilern regelmäßig apoptotic bodies. Auch der TUNEL- Nachweis erwies sich hier als zuverlässig.