

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, eventuelle Einflüsse der Keime *Enterococcus faecium* und *Bacillus cereus* var. *toyoi* als Futterzusatzstoff bei tragenden Sauen und deren Ferkel aufzuzeigen. Untersucht wurden die Enzymbeschaffenheit der Darmschleimhaut und die Entwicklung der endokrinen Zellen des Darmes bei säugenden und abgesetzten Ferkeln.

Zunächst wird die verwendete Methodik diskutiert, um anschließend auf die allgemeinen Ergebnisse und die durch das Probiotikum entstandenen Abweichungen zu den Kontrollgruppen einzugehen.

5.1. Methodik

Nachdem BRIEL (2000) bereits einen signifikanten Einfluss des Keimes *Bacillus cereus* var. *toyoi* auf die Morphologie der Schleimhaut des Schweinedarms nachweisen konnte, und EGGBRECHT (2006) diese Beobachtungen bis zu einem gewissen Grad bestätigen konnte, sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss dieses Keims auf die Enzymaktivität der Darmschleimhaut und die Entwicklung der endokrinen Zellen untersucht werden. Des Weiteren wurde der Keim *Enterococcus faecium* in einem identischen Versuch (REITER 2005) verwendet, um eventuelle Abweichungen der Ergebnisse in Verbindung mit dem verwendeten Keim bringen zu können, werden doch in der Literatur uneinheitliche Aussagen zu den verschiedenen Wirkungsmechanismen bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen der verwendeten Probiotika gemacht (HINRICHS, 2005). Ein weiteres Ziel war also die vergleichende Prüfung der beiden Probiotika anhand eines standardisierten Versuchsaufbaus. GÖRKE (2000) konnte bei einem ähnlich vergleichenden Versuchsaufbau schon die Wirkung der beiden Keime *Bacillus cereus* var. *toyoi* und *S. boulardii* auf die Morphologie der Darmschleimhaut untersuchen und eine scheinbare Wachstumsstimulation der Zotten nach Gabe der Probiotika beobachten.

In einem dritten Versuch wurde wiederum der Keim *Enterococcus faecium* verwendet. Allerdings wurden in diesem Durchgang bei identischen Haltungsbedingungen nur die abgesetzten Ferkel ab dem 29.Tag mit dem Probiotikum gefüttert, um den Einfluss der Fütterung der tragenden Sauen auf die Veränderungen im Ferkel betrachten zu können.

5.2. Alkalische Phosphatase

Zur Beurteilung der durch Probiotika eventuell veränderter Transport- und Stoffaustauschprozesse an der Zellmembran der Enterozyten wurde die membrangebundene Intestinale Alkalische Phosphatase qualitativ und quantitativ bestimmt.

Der Nachweis wurde bei allen drei Versuchsdurchgängen an einem Homogenat aus sämtlichen Schichten des Darmes durchgeführt.

Auf eine Präparation des Epithels, und somit dem Trennen von den übrigen Schleimhautschichten wurde bewusst verzichtet, da während der qualitativen Auswertung an den histologischen Schnitten nur sehr wenige positive Zellen außerhalb des Darmepithels zu finden waren. Auch war qualitativ kein Einfluss der unterschiedlichen Fütterungen auf das Verteilungsmuster und Häufigkeit des Auftretens dieser diffusen AP-positiven Zellen zu erkennen.

Sowohl im Duodenum als auch im Jejunum konnte im Bereich der apikalen Zellmembran der Enterozyten bei allen untersuchten Tieren das Enzym Alkalische Phosphatase gefunden werden.

FAN et al. (1999) konnten die membran-gebundene AP im Duodenum, Jejunum und Ileum unter Verwendung von p-Nitrophenylphosphat nachweisen. In ihren Untersuchungen konnten sie außerdem feststellen, dass die Aktivität der AP entlang des Schweine-Dünndarms unterschiedlich stark ist. Im Duodenum konnten mit Abstand die höchste Aktivität gemessen werden. Im Jejunum nahm die Aktivität deutlich ab, und war im Ileum nochmals niedriger.

Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. In allen drei Fütterungsversuchen und in sämtlichen Altersgruppen konnten, sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den Probiotika-Tieren, für die AP im Duodenum jeweils deutlich höhere Aktivitätswerte ermittelt werden, als im proximalen Jejunum.

2001 konnte FAN anhand des Enzymnachweis der AP bei 14- und 18-Tage alten Ferkeln entlang der longitudinalen Achse des Schweinedarms zeigen, dass die Lebensdauer der Enterozyten von proximal nach distal im Dünndarm zunimmt.

Nach der Geburt und im Verlauf der ersten Lebenswochen von Schweinen scheint die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in den Bürstensaumzellen des Darms sich stark zu verändern.

In einer Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Aktivität bei erwachsenen Tieren (70 Tage) im Dünndarm von Schweinen am niedrigsten und um den Zeitpunkt des Absetzens (28-

35Tage) am höchsten ist. Die Aktivität der AP bei Saugferkeln (7 Tage) liegt in etwa zwischen diesen beiden Werten (FAN et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnten ähnliche Beobachtungen bei den Kontrollferkeln im Duodenum gemacht werden. Im proximalen Jejunum waren allerdings die ermittelten Werte bei den 14 Tage alten Ferkeln immer am höchsten und bei den 56 Tage alten Tieren am niedrigsten. Dies kann allerdings auf die spätere Untersuchung der Saugferkel (14 Tage) im Vergleich zu den Untersuchungen von FAN et al. (2002) (8 Tage) zurückzuführen sein.

Vergleicht man diese beiden Ergebnisse und ihre unterschiedlichen Untersuchungszeiträume, so lässt sich vermuten, dass der Anstieg der AP in den Enterozyten des Jejunum bis zum Zeitpunkt des Absetzens zwischen dem achten und vierzehnten Tag maximal sein muss.

Untersuchungen bei anderen Tierspezies brachten vergleichbare Ergebnisse. MIAO (1988) konnte bei der Seidenraupe zeigen, dass der Verlauf der Enzymaktivität in den verschiedenen Entwicklungsphasen der Raupe stark differiert. Er konnte die niedrigste Aktivität im voll entwickelten Larvenstadium und die höchste Aktivität in dem Stadium der schnellsten Entwicklung der Larve messen.

Im Darm scheinen verschiedene Faktoren zu einem Anstieg oder Abfall des Gehaltes an Intestinaler Alkalischer Phosphatase zu führen.

Neuere Untersuchungen (BABINSKA et al. 2005; MIAO 2002) an unterschiedlichen Spezies zeigen, dass sowohl pathogene Faktoren als auch veränderte Nährstoffkonzentrationen im Darmlumen eine Modulation der Aktivität der Intestinalen Alkalischen Phosphatase zur Folge haben.

So führt eine Infektion des Darmes mit dem Cytoplasmic polyhedrosis Virus oder eine Besiedlung mit *Bacillus thuringiensis* bei der Seidenraupe zu einer Verminderung der Aktivität der AP (MIAO 2002). Beim Hasen (CHOPRA et al. 2006) konnte im Ileum nach einer Intoxikation mit einem Shiga-Toxin eine Verringerung der Aktivität der Bürstensaumenzyme Lactase, Sucrase und Alkalischer Phosphatase um bis zu 50% gemessen werden.

Auch bei Ratten ist ein Abfall der Aktivität der AP und Aminopeptidase-N nach Fütterung einer Proteinfreien Diät um bis zu 38% möglich (MONTROYA 2006).

Eine Erhöhung der Aktivität der Bürstensaumenzyme AP, Lactase und α -Glycosidase konnte beim Menschen nach einer dreiwöchigen Einnahme von *Saccharomyces boulardii* im Duodenum gemessen werden (JAHN et al. 1996).

Bei Ferkeln führt eine unterschiedliche diätische Fütterung mit Roh-Proteinen ebenfalls zu einer Veränderung der AP im Dünndarm (GU et al. 2004). Nach Zufütterung von Kupfer konnte bei 14 Tage alten Ferkeln ein Abfall der Aktivität der AP im Duodenum und Jejunum im Vergleich zu Kontrolltieren beobachtet werden (RADECKI 1992).

Auch pathogene Faktoren, die zu einer Modulation der Bürstensaumenzyme führen sind beim Schwein untersucht worden.

JUNG et al. (2006) konnten zeigen, dass es nach einer Infektion mit dem porcinen-epidemischen-Diarrhö-Virus (PEDV) bei Ferkeln zu einer deutlichen Reduzierung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Jejunum kommt. Diese massiven Aktivitätsverluste sind aber eher sekundär auf eine Zerstörung des Schleimhautepithels und einer damit einhergehenden Reduzierung der Resorptiv-aktiven Oberfläche zurückzuführen, als auf eine primäre Beeinflussung der Bürstensaumenzyme.

In der vorliegenden Arbeit ergab die Auswertung der verschiedenen Fütterungsversuche uneinheitliche Ergebnisse für die Beeinflussung der Intestinalen Alkalischen Phosphatase.

Bei den im ersten Versuch mit dem Probiotikum *Enterococcus faecium* gefütterten Tieren ließ sich die Tendenz erkennen, dass die mit dem Probiotikum gefütterten Tiere allgemein eine höhere Aktivität an AP als die Kontroll-Tiere aufwiesen.

Nach BOUDRY (2002) geht das Absetzen der Ferkel von der Muttermilch der Sauen und die damit verbundene morphologische Veränderung der Schleimhaut im Schweinedarm auch mit einer Veränderung der Bürstensaumenzyme einher.

Aufgrund der vorliegen Ergebnisse ist davon auszugehen, dass diese Veränderungen nur vor dem Absetzen durch Supplementierung des Futters mit Probiotika zu beeinflussen ist.

Erhielten nämlich ausschließlich die Ferkel nach dem Absetzen, und nicht die Sauen gemeinsam mit den Ferkeln ab dem 15.Lebenstag den *Enterococcus*-Stamm, wirkt sich diese Supplementierung scheinbar eher negativ auf die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in der Darmschleimhaut aus.

Auch scheint der Zeitpunkt des Absetzens Konsequenzen für die Entwicklung des Bürstensaumenzym AP zu haben (TANG et al. 1999). Er konnte zeigen, dass bei früh abgesetzten Ferkeln (12.Lebenstag) auch nach längerer Zeit noch höhere Aktivitätswerte der Alkalischen Phosphatase messbar waren als bei den normal im Alter von 28Tagen abgesetzten Ferkeln.

Die orale Verabreichung von *Bacillus cereus* im zweiten Fütterungsversuch führte bei den Probiotika-Tieren zu einer tendenziell niedrigeren Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Signifikante Veränderungen wurden jedoch für keinen der drei Versuchsdurchgänge für die Alkalische Phosphatase ermittelt.

Im Darm-Trakt von Säugetieren sind unterschiedliche Subtypen der Alkalischen Phosphatase beschrieben (SHIDOJI und KIM 2004). In weitergehenden Versuchen wäre daher zu untersuchen, welche Subtypen durch welche probiotischen Keime positiv beeinflusst werden könnten.

Bei Broilern konnte ein Zusammenhang zwischen täglicher Gewichtszunahme und der Aktivität der Intestinalen AP gefunden werden (LENHARDT und MOZES 2003). Sie konnten zeigen, dass bei Tieren mit einem verzögerten Wachstum auch eine geringere Aktivität an AP im Darm vorlag, als bei den normal wachsenden Tieren.

Träfe dieser Zusammenhang auch bei Schweinen zu, und würde sich dieses Ungleichgewicht mithilfe eines geeigneten probiotischen Keims regulieren lassen, wäre dies eine weitere mögliche Erklärung für die leistungsfördernden Wirkungen einiger Probiotika.

5.3. Saure Phosphatase

Die Saure Phosphatase ist ein Enzym aus der Gruppe der Hydrolasen, die im sauren Milieu bei pH 5,0 ihr Wirkungsmaximum hat (BARRETT 1969).

In der vorliegenden Arbeit wurde die katalytisch aktive Saure Phosphatase als lysosomales Markerenzym untersucht.

Die SP ist in allen kernhaltigen Zellen in einer löslichen und einer membrangebundenen Form nachweisbar. Die lösliche Form ist ein Dimer aus zwei identischen Untereinheiten. Die membrangebundene, katalytisch aktive Form kann in den Lysosomen vorkommen aber auch Bestandteil der Plasmamembran sein (GOTTSCHALK et al. 1989).

Außerdem kann sie im endosomalen Kompartimenten lokalisiert werden (BRAUN et al. 1989).

Lysosomen sind Zell-Organellen die in den meisten eukaryontischen Zellen vorkommen, und für den Abbau von zelleigenen und zellfremden Makromolekülen zuständig sind.

Eine Reihe saurer Hydrolasen katalysieren den Abbau der Makromoleküle in den Lysosomen. Über Protonenpumpen der lysosomalen Membran wird der saure pH-Wert im Lysosomenlumen

aufrecht gehalten. Die durch die Hydrolasen gespaltenen Abbauprodukte verlassen die Lysosomen durch spezifische Transportkanäle (GREEN 1987, BRAUN et al. 1989).

Das Vorkommen von Saurer Phosphatase in kernhaltigen Zellen weist also auf degenerative Prozesse im Zellinnern und somit auf den physiologischen Zelltod hin (WILLE 2001).

Im vorliegenden Material konnten SP-positive Zellen bei allen untersuchten Proben im Epithel und in der Propria mucosae gefunden werden.

Bei den SP-positiven Zellen in der Propria mucosae handelt es sich um Mastzellen, die aufgrund normaler Abwehrvorgänge, und den damit verbundenen gehäuften Vorkommen intrazellulärer Lysosomen, ebenfalls über Saure Phosphatase verfügen.

GU et al. (2004) konnte durch die diätetischen Fütterung von Roh-Protein bei Schweinen signifikante Erhöhung des Gehaltes an Sauren Phosphatase nachweisen. In den Vorliegenden Untersuchungen blieb dieser Effekt durch die Fütterung der beiden unterschiedlichen Probiotika *Bacillus cereus* var. *toyoi* und *Enterococcus faecium* aus.

Es konnten lediglich geringe Abweichungen bei der Auswertung der unterschiedlichen Bewertungsparameter ermittelt werden.

Die Verteilung der Reaktionsprodukte der Sauren Phosphatase in der Darmschleimhaut sind bei der Spezies Ratte am genauesten untersucht (VOLLRATH 1969; SCHÄFER u. HÖHN 1975).

Zum Zeitpunkt der Geburt konnten hier schon im Epithel supranukleäre, feingranuläre, positiv-reagierende Partikel lichtmikroskopisch gefunden werden (GROSSRAU 1975; SCHÄFER u. HÖHN 1975). In der Embryonalphase finden sich diese positiven Granula zunächst basal in den Enterozyten (HAYWARD 1967). In der vorliegenden Arbeit konnten diese basalen Granula mit zunehmenden Alter nur noch im Bereich der Lieberkühnschen Krypten, und hier im speziellen in den vorderen Darmabschnitten gefunden werden.

Supranukleäre positive Granula in den Epithelzellen, wie sie schon HELANDER (1975) und ONO u. SATOH (1975) im Caecum und Colon der Ratte bis 30 Tage nach der Geburt nachwies, wurden in allen untersuchten Proben und somit auch in allen Darmabschnitten nachgewiesen.

Die hinteren Darmschnitte Caecum und Colon wiesen eine niedrigere Aktivität auf als die vorderen Dünndarmabschnitte. Bei den Fütterungsversuchen I und II wurde beobachtet, dass die mit dem jeweiligen Probiotikum gefütterten Tiere tendenziell stärker supranukleär in den Darmabschnitten Duodenum und Jejunum reagierten, als die entsprechenden Kontrolltiere.

Signifikante Unterschiede zwischen Kontrolltieren und den mit den Probiotika gefütterten Tieren wurden für keine der Bewertungsparameter ermittelt. Anhand von Doppel-Blind-Auswertungen und dem von anderen Autoren benutzten Bewertungsverfahren ist ein eventuell vorhandener aber nicht erfasster signifikanter Unterschied sehr unwahrscheinlich.

Es ist also davon auszugehen, dass die unterschiedliche Supplementierung von *Enterococcus faecium* oder *Bacillus cereus* var.toyoi keine Auswirkung auf den Gehalt des Darmes an Saurer Phosphatase hat. Somit scheint ein direkter Zusammenhang zwischen dem Einsatz von Probiotika und dem vermehrten Auftreten von diesem Enzym in den Enterozyten und den Zellen der Propria mucosae nicht zu bestehen.

5.4. Endokrine Zellen

Eine weitere Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Vorkommens und des Verteilungsmusters von Endokrinen Zellen im Darmtrakt von Ferkeln, die probiotische Futterzusatzstoffe erhielten.

Mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern gegen Gastrin, Somatostatin und Serotonin lassen sich die Enzym-produzierenden Zellen für die lichtmikroskopischen Untersuchungen immunhistochemisch nachweisen (WEYRAUCH et al. 1987; WEYRAUCH et al. 1989).

Das endokrine System des Darmtraktes, und hier im speziellen die Anzahl und Verteilung der endokrinen Zellen, lässt sich nach der Darstellung von verschiedenen Autoren durch eine Veränderung des intestinalen Milieus beeinflussen. Neben der Veränderung des Milieus scheint auch die Etablierung einer fremden Flora auf die unterschiedlichen endokrinen Zellen des Darms zu wirken (SHARMA et al. 1995; SHARMA u. SCHUMACHER 1996; RICHTER-DAHLFORS et al.1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden die gefundenen positiven Endokrinozyten in Bezug zu der untersuchten Anschnittfläche des histologischen Schnittes gesetzt. Alternativ wäre auch ein Bezug zur Schleimhautoberfläche, also der Längenmessung des Epithelium, denkbar gewesen, allerdings gestaltet sich diese Messung aufgrund der Anschnitte der Krypten als sehr schwierig und ungenau.

5.4.1. Gastrin

Gastrin besitzt eine trophische Wirkung auf das Gewebe des Magen-Darmtraktes (VAGNE 1970; DEMLING 1976) und bildet somit einen wichtigen Angriffspunkt für eine mögliche positive Wirkung der Probiotika auf die Verdauungsvorgänge.

Gastrin-produzierende Zellen wurden in den Darmabschnitten Duodenum, proximales und distales Jejunum, Ileum und im Colon descendens gefunden. Zur Ermittlung der Häufigkeit des Auftretens der Gastrin-Zellen wurde, ebenso wie für die folgenden untersuchten Enterohormone, die Anzahl der Hormon-positiven Zellen pro Flächeneinheit ermittelt.

Sowohl bei den Kontroll- als auch bei den Versuchstieren fällt die Anzahl der positiven Zellen in den Epithelien der proximalen zu den distalen Darmabschnitten stetig ab.

Es scheint einen Einfluss des Darminhaltes auf die Differenzierung der Endokrinen Zellen zu geben. Einfluss können nach DEZFLUI et al. (2003) sowohl eine fremde Flora, als auch pathogene Agentien nehmen. So konnte bei Forellen eine Abnahme der endokrinen Zellen durch eine Infektion mit Helminthen provoziert werden. Betroffen waren Gastrin-, Cholecystokin-8- und Sekretin-produzierende Zellen.

5.4.2. Somatostatin

Außerhalb des Nervensystems findet man Somatostatin in vielen Säugetieren hauptsächlich in den D-Zellen des GEP (Gastro-Entero-Pankreatischen) endokrinen Zellsystems (ORCI et al. 1975; POLAK et al. 1975).

Somatostatin wirkt im Magen-Darm-System als eine Art Gegenspieler des Gastrin (GROSSMANN 1972) und stellt für die Analyse der eventuellen Wirkungen von Probiotika somit eine sinnvolle Ergänzung zur Untersuchung der Gastrinzellen dar.

Somatostatin-positive Zellen wurden, wie auch schon in der Literatur für Schweine beschrieben (FUJITA 1988; AGUNGPRIYONO 2000), im vorliegenden Fall in den Darmabschnitte Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum und Colon gefunden.

Neuere Untersuchungen (BOSI et al. 2006) zeigen, dass durch die Zufütterung von Kalzium bei Absetzferkeln eine Erhöhung der Anzahl Somatostatin-positiver Zellen induziert werden kann.

Ähnlich wie bei den Untersuchungen an Gastrin und Serotonin, wurde auch beim Somatostatin ein Abfall der Anzahl an Hormon-positiven Zellen pro Flächeneinheit vom Duodenum zum Colon descendens beobachtet.

Eine Beeinflussung dieser Zellen durch das Probiotikum konnte jedoch nicht festgestellt werden.

5.4.3. Serotonin

Das Enterohormon Serotonin wird in den EC-Zellen der Darmschleimhaut gebildet und spielt eine wichtige Rolle in der Kontrolle und Regulation der Darmperistaltik.

Es kommt in vielen Lokalisationen des Magen-Darm-Traktes von Schweinen vor (CAPELLA u. SOLCIA 1972; AGUNGPRIYONO et al. 2000).

Bei der Ratte führt die Applikation einer menschlichen Darmflora, sowohl im Jejunum als auch im Colon, zu einer Anhebung der Serotonin-Zellen im Vergleich zu den Kontrolltieren mit der für Ratten physiologischen Keimflora (SHARMA et al. 1995).

Zur Untersuchung kamen in der vorliegenden Arbeit Proben aus dem Duodenum und dem proximalen und distalen Jejunum.

Im Duodenum war die Konzentration an Serotonin-Zellen am größten, wohingegen im Jejunum deutlich weniger positive Zellen zu finden waren.

Es wurde kein Unterschied in der Konzentration der Serotonin-Zellen in den verschiedenen Altersgruppen gefunden. Auch ließen sich keine Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den mit dem Probiotikum gefütterten Versuchstieren erkennen.

Grundsätzlich konnte nach Verfütterung von *E. faecium* an der Darmschleimhaut der Ferkel keine Veränderung der Anzahl der Gastrin-, Somatostatin- und Serotonin-produzierenden Zellen beobachtet werden.

Es ist allerdings aufgrund der vorliegenden Beeinflussungsmöglichkeiten des GEP-Systems durch andere Agentien nicht auszuschließen, dass ein anderes, eventuell potenteres, Probiotikum die Fähigkeit zur Modulierung der GEP-Zellen besitzt.

So konnte BABINSKA et al. (2005) feststellen, dass einige Bifidobakterien-Spezies sowie *Lactobacillus acidophilus* bei Schweinen diese Veränderungen induzieren. Nach Applikation von *Bifidobacterium breves*, *B. animalis*, und *Lactobacillus acidophilus* konnten bei 3 bis 35Tage alten Ferkeln ein Anstieg der Konzentration an endokrinen Zellen im Magen und Dünndarm gemessen werden.

Die erwähnten Autoren konnten übrigens auch einen Anstieg der Aktivität der Enzyme Alkalische und Saure Phosphatase der Enterozyten bei den mit dem Probiotikum gefütterten Schweinen im Vergleich zu den Kontrolltieren ermitteln.

Ein eventueller Einfluss von *E. faecium* auf die anderen Enterohormon wie Sekretin, Cholecystokinin, GIP usw. ist nicht auszuschließen.