

Untersuchungen zur Schleimschicht im Dünn- und Dickdarm des Haushuhns

von Sybille Theresia Buxbaum

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Untersuchungen zur Schleimschicht im Dünn- und Dickdarm des Haushuhns

von Sybille Theresia Buxbaum
aus Rosenheim

München 2026

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. Sonja Härtle

Tag der Promotion: 7. Februar 2026

Meinen Kindern

in Liebe gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Der Darm-Trakt des Haushuhns	3
1.1.	Anatomie	3
1.2.	Mikroskopische Anatomie	5
1.2.1.	Darmwand im Allgemeinen	5
1.2.2.	Zelltypen des Schleimhautepithels	7
1.3.	Enterale Immunabwehr	11
1.4.	Intestinales Mikrobiom beim Huhn	13
2.	Intestinale Schleimschicht	17
2.1.	Zusammensetzung	17
2.2.	Funktion	17
2.3.	Morphologie	19
2.3.1.	Methoden zur Darstellung der Schleimschicht	19
2.3.2.	Chronologische Aufstellung bedeutsamer Studien	21
2.3.3.	Physiologische Hintergründe	31
2.3.4.	Bisherige Erkenntnisse beim Huhn	34
2.4.	Chemische Grundlagen	36
2.4.1.	Einteilung und Genfamilie der Muzine	36
2.4.2.	Proteingrundgerüst der gelbildenden Muzine	38
2.4.3.	O-Gykane der gelbildenden Muzine	39
2.4.4.	Synthese, Sekretion Degradation des Schleims	43
2.4.5.	Erkenntnisse zur Schleimproduktion beim Huhn	46
2.5.	Alterationen bei gnotobiotischen Tieren	48
2.6.	Veränderungen bei pathologischen Zuständen	51
III.	MATERIAL UND METHODEN	55
1.	Material	55
1.1.	Verwendete Tiere	55
1.2.	Verwendete Materialien und Substanzen	56
2.	Methoden	60
2.1.	Präparation des Gewebes mit Erhaltung der Schleimschicht	60

2.1.1.	Organentnahme und Fixierung	60
2.1.2.	Dehydratation und Paraffineinbettung.....	60
2.1.3.	Anfertigung der Paraffinschnitte	61
2.2.	Histochemische Färbungen	61
2.2.1.	Periodsäure-Schiff-Reaktion	61
2.2.2.	Alcianblau pH 2,5.....	62
2.2.3.	Alcianblau pH 1,0.....	63
2.2.4.	PAS nach Diastase-Vorbehandlung.....	64
2.2.5.	Kombinierte AB 2.5 - mit Gram-Färbung.....	65
2.2.6.	PAS-AB 2.5-Gram-Färbung nach Diastase-Vorverdauung	66
2.3.	Morphologische und morphometrische Beurteilungen	68
2.4.	Statistische Methoden.....	69
IV.	ERGEBNISSE	70
1.	Konventionelle Haltung	70
1.1.	Schleim zwischen den Zotten	70
1.2.	Luminale Schleimschicht.....	74
1.2.1.	Dicke der Schleimschicht.....	74
1.2.2.	Ablösung der Schleimschicht vom Epithel	82
1.2.3.	Kontinuität der lumenseitigen Schleimschicht	85
1.3.	Lage der Bakterien.....	87
1.3.1.	Jejunum	87
1.3.2.	Kolon.....	89
2.	Einfluss der Haltungsformen	95
2.1.	Schleim zwischen den Zotten	95
2.2.	Luminale Schleimschicht.....	99
2.2.1.	Dicke der Schleimschicht.....	99
2.2.2.	Anhaftung der Schleimschicht am Epithel.....	108
2.2.3.	Kontinuität der lumenseitigen Schleimschicht	108
2.3.	Lage der Bakterien.....	109
V.	DISKUSSION.....	114
1.	Ziel der vorliegenden Arbeit.....	114
2.	Diskussion der Ergebnisse	114

3.	Kritische Betrachtung der verwendeten Methodik.....	126
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	129
VII.	SUMMARY	130
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	131
IX.	ANHANG	160
1.	Abbildungsverzeichnis	160
2.	Tabellenverzeichnis	164
X.	DANKSAGUNG	166

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AB	Alcianblau-Färbung
AB 2.5	Alcianblau-Färbung bei einem pH-Wert von 2,5
AB 1.0	Alcianblau-Färbung bei einem pH-Wert von 1,0
AB 2.5-Gram	Kombinierte AB 2,5- mit Gram-Färbung
AMPs	antimikrobielle Peptide
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GALT	darmassoziiertes lymphatisches Gewebe (englisch: Gut-associated lymphoid tissues)
GF	Keimfrei (englisch: germ free)
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
konv.	konventionell
MUC 2	Mucin 2-Protein
MW	arithmetischer Mittelwert
PAS	Periodsäure-Schiff-Färbung (englisch: periodic acid–Schiff)
PAS-AB-Gram	Kombinierte PAS-, AB 2,5-, Gram-Färbung
PAS-Diastase	PAS-Färbung nach Diastase Vorbehandlung
PTS-Domäne	Prolin-, Threonin- und Serin- reiche Domäne
SPF	spezifisch pathogenfrei
TMM	Transmembranmucin

I. EINLEITUNG

Das Schleimhautepithel des gesamten Magen-Darm-Trakts ist auf der apikalen Seite von einer Schicht aus Schleim bedeckt. Bereits bei verschiedenen Tierarten konnte gezeigt werden, dass diese Schleimschicht in den unterschiedlichen Darmabschnitten unterschiedliche Eigenschaften aufweist (ATUMA et al., 2001; ERMUND et al., 2013a).

Sie wird vor allem von den Becherzellen, spezialisierten Darmschleimhautzellen, gebildet (YANG und YU, 2021). Sie schützt „die Schleimhaut vor Dehydratation, physikalischen sowie chemischen Schäden und macht die Ingesta gleitbarer zum Weitertransport. Sie ist die erste anatomische Barriere für Infektionserreger“ (PEREZ-VILAR und HILL, 1999). Des Weiteren interagiert sie auf verschiedene Weise mit den Darmbakterien (ZHAO und MAYNARD, 2022; RABA und LUIS, 2023).

Wie wichtig die intestinale Schleimschicht für die Gesundheit ist, wird durch aktuelle Forschungsergebnisse immer deutlicher. Das zeigte sich beispielsweise bei genveränderten MUC2-Knockout-Mäusen, denen die intestinale Schleimschicht fehlt: Sie waren deutlich anfälliger für bestimmte Infektionserreger (BERGSTROM et al., 2010; BIRCHENOUGH et al., 2023). Auch die Ernährung hat einen großen Einfluss auf die protektiven Eigenschaften der Schleimschicht. So konnten bei Mäusen negative Auswirkungen einer modernen westlichen Ernährung auf die intestinale Schleimschicht nachgewiesen werden (BIRCHENOUGH et al., 2023).

Nutzgeflügel wird – sowohl bei Legehennen als auch bei Masthühnern – oft in großen Beständen unter engen Haltungsbedingungen gehalten. Das macht die Bestände anfällig für eine schnelle Erregerausbreitung und anschließende Erkrankungsausbrüche (PERALTA et al., 2016). Beim Nutzgeflügel spielen dabei Erkrankungen des Verdauungstraktes eine ökonomisch bedeutsame Rolle. Es sind vor allem infektiöse Ursachen, wie Parasiten, Viren oder Bakterien von Bedeutung (SMITH et al., 2014). Die Verwendung von Antibiotika in der Nutztierhaltung wurde in den letzten Jahren immer strengeren Vorschriften unterzogen, um der Entwicklung weiterer bakterieller Resistenzen entgegenzuwirken. Um alternative Präventionsmaßnahmen gegen infektiöse

Darmerkrankungen entwickeln zu können, ist ein besseres Verständnis der gesamten Physiologie des Magen-Darm-Trakts des Huhns von zentraler Bedeutung (ZHU et al., 2021).

Die Darmschleimschicht des Haushuhns ist bislang morphologisch kaum erforscht worden (DUANGNUMSAWANG et al., 2021). Daher sollen in der vorliegenden Arbeit die Eigenschaften und die Beschaffenheit der Schleimschicht im Jejunum, Zäkum und Kolon des Haushuhns durch lichtmikroskopische Untersuchungen dargestellt werden. Untersucht und miteinander verglichen wurden Proben von Hühnern, die unter keimfreien (GF), spezifisch pathogenfreien (SPF) bzw. konventionellen (konv.) Bedingungen gehalten wurden. Die konv. Gruppe umfasst zudem unterschiedliche Altersstufen von drei bis 55 Tagen nach dem Schlupf und diente der Untersuchung der altersabhängigen Entwicklung der Schleimschicht im Jejunum und Kolon.

Ziel der Arbeit ist zu klären, ob sich die intestinale Schleimschicht des Huhns in ihrem Aufbau mit derjenigen beim Menschen und bei Nagetieren vergleichen lässt. Zudem sollen Unterschiede zwischen den Darmabschnitten, Altersgruppen und Haltungsformen herausgearbeitet werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

In der Literaturübersicht wird der aktuelle Stand des Wissens und der Forschung dargelegt. Der erste Teil behandelt die relevanten Grundlagen des Darm-Trakt beim Huhn. Im zweiten Teil wird die intestinale Schleimschicht betrachtet.

1. Der Darm-Trakt des Haushuhns

1.1. Anatomie

Der Darm des Haushuhns fängt nach dem Magenpförtner (Pars pylorica des Muskelmagens (Ventriculus gastris)) an und reicht bis zur Kloake (Cloaca) (TIEDEMANN, 1810; MCLELLAND, 1993). Er hat beim ausgewachsenen Huhn eine Länge von 170 bis 260 cm (KRÜGER, 1926) (vgl. 165 bis 230 cm (PILZ, 1937)). Diese ist von verschiedenen Faktoren abhängig, darunter dem Alter und der Rasse des Tieres, der Menge und des Nährwertes des Futters, der Häufigkeit der Nahrungsaufnahme (KRÜGER, 1926) oder des Körpergewichts (YANG et al., 2013a). Einen verhältnismäßig kurzen Darm besitzen generell alle Vögel im Vergleich zu den Säugetieren (OWEN, 1866; PILZ, 1937), was sich aufgrund der Gewichtsersparnis zur besseren Flugfähigkeit erklären lässt (CAVIEDES-VIDAL et al., 2007). Die Darmweite ist im gesamten Verdauungstrakt weitgehend konstant und nimmt bis zur Kloake insgesamt geringgradig ab (CLOETTA, 1893; PILZ, 1937).

Der Intestinal-Trakt ist auf seiner gesamten Länge an dem Gekröse (Mesenterium und Mesorektum) befestigt. Dadurch werden die Darmschlingen an der Wirbelsäule befestigt und auch miteinander in unterschiedlicher Weise verbunden (GADOW, 1889; BITTNER, 1925).

Der Darm ist in zwei Hauptteile gegliedert: Dünn- und Dickdarm (Intestinum tenue und Intestinum crassum) (OWEN, 1866). Der Dünndarm gliedert sich in den Zwölffingerdarm (Duodenum), Leerdarm (Jejunum) und Hüft darm (Ileum) (PILZ, 1937; GRAU, 1943). Das Jejunum und das Ileum des Huhns lassen keine klare morphologische Abgrenzung erkennen (PILZ, 1937). Der Trennungspunkt wird in neuerer Zeit deskriptiv am Meckelschen Divertikel (auch Dottersack-

Divertikel, Diverticulum vitellinum) (Abbildung 1 (PILZ, 1937)), einem Rudiment des embryonalen Dottersackstiels, festgesetzt da es immer an derselben Stelle im Darm aufzufinden ist (BRANTON et al., 1988; MCLELLAND, 1993).

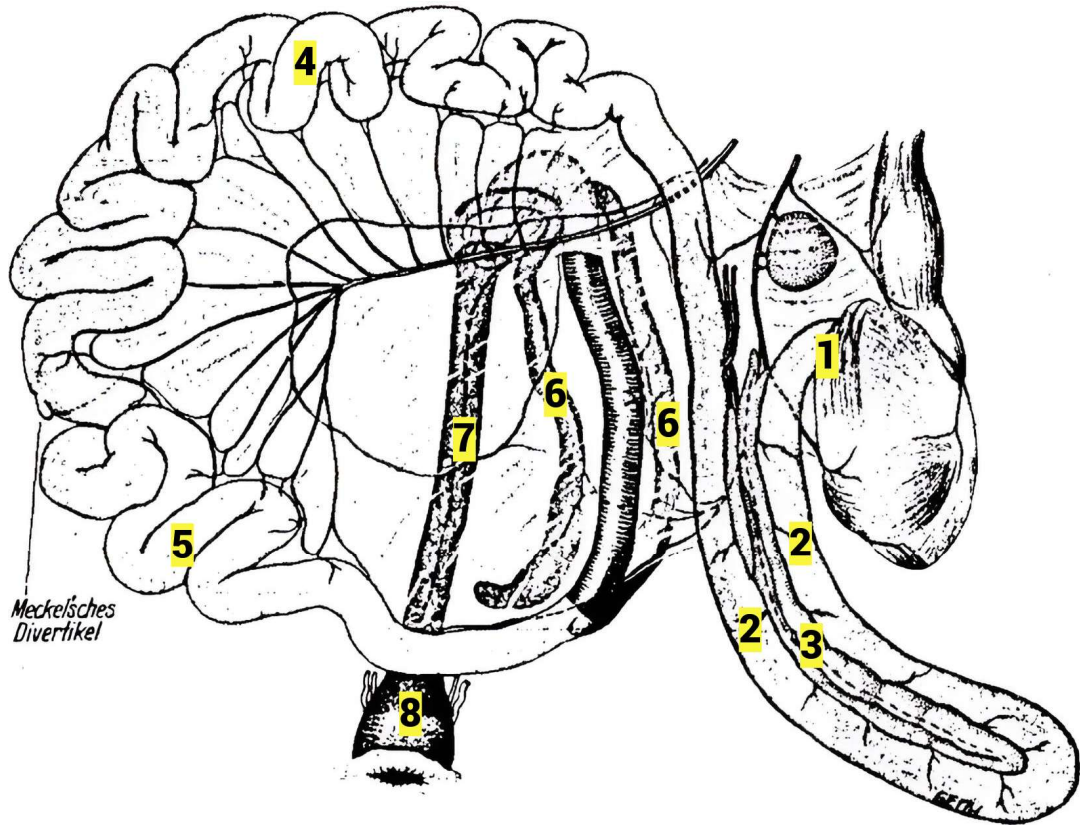


Abbildung 1: Schematische Zeichnung des ausgebreiteten Magen-Darm-Trakts des Haushuhns aus PILZ (1937), von links nach rechts (1) Pylorus, (2) Duodenum, dazwischen (3) Pankreas, (4) Jejunum, nach dem Meckelschen Divertikel (5) Ileum, (6) zwei Zäka, (7) Rektum, (8) Kloake

Der Dickdarm besteht aus den beiden Blinddärmen (Caeca, Zäka) und dem kurzen Kolorektum. Das Rektum und Kolon können nicht unterschieden werden und werden folglich teils als Kolon oder Kolorektum angesprochen (TURK, 1982; UDOUMOH et al., 2024). Am Ende des Ileums befindet sich eine Schleimhautfalte, die das Lumen an dieser Stelle von innen einengt. Sie stellt die Grenze zwischen Dickdarm- und Dünndarm dar. Außerdem befinden sich dort die Einmündungen der Blinddärme (Ostium ileocaecale) (TURK, 1982), die noch zum Dünndarm gezählt werden, die Blinddärme selbst allerdings zum Dickdarm (MCLELLAND, 1993). Blinddärme sind beim Huhn wie bei fast allen Vögeln paarig angelegt (TIEDEMANN, 1810; KOÇAK und ÖZAYDIN, 2023). Die Zäka werden in einen engen kurzen Halsteil (Basis caeci), ein weiteres

Mittelstück (Corpus caeci) und ein blasig erweitertes Endteil (Apex caeci) unterteilt. Am proximalen Teil der Basis befindet sich ein unvollständiger Schließmuskel (Musculus sphincter caeci) (MCLELLAND, 1993). Dieser verhindert, zusammen mit den prominenten Zotten des Halsteils, dass unverdauliche Partikel in die Blinddärme gelangen (TURK, 1982; FERRANDO et al., 1987; FERRER et al., 1991).

1.2. Mikroskopische Anatomie

1.2.1. Darmwand im Allgemeinen

Die Wand des Darms kann grob von innen nach außen in 4 Schichten unterteilt werden (TIEDEMANN, 1810). Die Schleimhaut (Tunica mucosa), die undeutlich ausgeprägte und lange Zeit beim Haushuhn umstrittene Unterschleimhaut (Tela submucosa), die Muskelschicht (Tunica muscularis), die eine longitudinale und eine querverlaufende Muskelschicht beinhaltet und die serösen Außenschicht (Tunica serosa) (CALHOUN, 1954; MICHEL und GUTTE, 1971; TURK, 1982).

Die Tunica mucosa wird in drei Schichten unterteilt: ein einschichtiges hochprismatisches Epithel (Epithelium mucosae), einer darunterliegenden bindegewebigen Schicht (Lamina propria mucosae) und eine äußere Muskelschicht (Lamina muscularis mucosae), die je nach Darmabschnitt mehr oder weniger deutlich ausgebildet ist (CALHOUN, 1954; KOÇAK und ÖZAYDIN, 2023).

Die Schleimhaut ist zur Oberflächenvergrößerung und damit zur besseren Resorption über die Schleimhautepithelzellen in Zotten (Villi intestinales) und teilweise zusätzlich in Falten (Plicae intestinales villosae) gelegt. Zotten stellen charakteristische, finger- oder blätterförmige Ausstülpungen dar. Sie sind vor allem im Dickdarm, zusätzlich in Falten gelegt. Im mikroskopischen Bild sind sie leicht zu unterscheiden. Bei wahren Falten erhebt sich die gesamte Mukosa mitsamt der Muskelschicht bis in den Scheitel der Falte hinein. An der Bildung der Zotten hingegen, ist die gesamte Mukosa beteiligt, mit der Einschränkung, dass die Tunica muscularis mucosae in ihrem Verlauf gestreckt bleibt und nur feine Ausläufer in das Stroma der Zotte aussendet (KRÜGER, 1926).

Als Besonderheit bei den Hühnern ist zu nennen, dass Darmzotten im gesamten Magen-Darm-Trakt von dem Magen bis zur Kloake (CLOETTA, 1893;

ZIETZSCHMANN, 1911), mit Ausnahme der Zäkumspitzen (GADOW und SELENKA, 1891; KRÜGER, 1926; MICHEL und GUTTE, 1971), zu finden sind. Sie sind bei den Hühnervögeln von besonderer Länge (TIEDEMANN, 1810; MICHEL und GUTTE, 1971).

Ihre Gestalt ändert sich im Verlauf des Darms. Im Duodenum haben die Villi eine rundere Spitze, sind länger/schlanker und enger aufgereiht als im vorderen Abschnitt des Jejunums und verlieren anschließend an Länge und werden breiter. Im Ileum und Kolon bleibt ihre Länge danach annähernd gleich und wird allerdings weiter in kaudaler Richtung immer breiter, während sie im Kolon am dicksten und kürzesten von allen sind (CLOETTA, 1893; MICHEL und GUTTE, 1971; TURK, 1982). In den Blinddärmen ist die Ausbildung der Zotten unterschiedlich. Im Halsteil sind prominente Zotten vorhanden, die allerdings kürzer als im Jejunum sind. Im Mittelstück und im Endteil sind sie wesentlich kürzer (FERRER et al., 1991). Im Endstück können sie auch teilweise fehlen. Im Dickdarm der Säugetiere dagegen finden sich keine Zotten intestinales. Dadurch können im gesamten Darmkanal der Vögel Verdauungs- und Resorptionsvorgänge stattfinden, was die geringe Darmlänge als Attribut zur Flugfähigkeit kompensiert (MICHEL und GUTTE, 1971).

Als Unterschied zum Säugetier ist zu nennen, dass den Vögeln ein zentrales Lymphgefäß in den Darmzotten fehlt (GRANEY, 1967; TURK, 1982).

An der Basis der Darmzotten beginnen die Krypten (Glandulae intestinales, Lieberkühnsche Krypten) als schlauchförmige Ausstülpungen des Schleimhautepithels. In ihrem Epithel erfolgt die Regeneration des Darmepithels. Verglichen mit anderen Vogelspezies sind diese beim Huhn besonders gut entwickelt (CLOETTA, 1893; ZIETZSCHMANN, 1911; MICHEL und GUTTE, 1971).

Auf das Epithelium mucosae mit seinen Zelltypen wird unter „1.2.2. Zelltypen des Schleimhautepithels“ näher eingegangen.

Im diffusen lymphoretikulären Bindegewebe der Lamina propria mucosae finden sich neben Zellen des Immunsystems, Blut- und Lymphgefäßen sowie Nerven- und glatte Muskelfasern (CLOETTA, 1893; MICHEL und GUTTE, 1971).

Eine Lamina muscularis mucosae ist nicht deutlich ausgebildet. In kaudaler Richtung nimmt ihre Dicke zu (MICHEL und GUTTE, 1971). Sie sendet feine Muskelfasern in das Stroma der Zotten (CALHOUN, 1954).

Die Tela submucosa ist eine dünne Schicht (CALHOUN, 1954; MICHEL und GUTTE, 1971) und ihre Existenz wurde anfangs bezweifelt (CLOETTA, 1893). Sie besitzt beim Haushuhn keine Brunner-Drüsen (Duodenaldrüsen) (AITKEN, 1958; MALEWITZ und CALHOUN, 1958). In ihr liegt der Meissner Plexus (Plexus submucosus), ein Gefäß- und Nervenplexus (MICHEL und GUTTE, 1971).

Die Tunica muscularis besteht aus einer äußeren Ringmuskelschicht (Stratum circulare) und einer inneren, weiter Richtung Lumen gelegenen Längsmuskelschicht (Stratum longitudinale). Die Ringmuskelschicht ist dabei deutlicher ausgebildet als die Längsmuskelschicht (CLOETTA, 1893). Zwischen diesen beiden Muskelschichten findet sich ein weiterer Nervenplexus, der Auerbach' Plexus (Plexus myentericus) und Gefäße (MICHEL und GUTTE, 1971).

Die Tunica serosa mit der Tela subserosa bedeckt den Darm in seinem kompletten Verlauf von außen (CALHOUN, 1954).

1.2.2. Zelltypen des Schleimhautepithels

Eine herausragende Funktion des Schleimhautepithels ist die Trennung des luminalen Materials vom Subepithel. Seine apikalen semipermeablen Zellmembranen sowie die engen Kontakte zwischen den Zellen, die durch tight junctions, adherens junctions und Desmosomen den Interzellularspalt selektiv abdichten, ermöglichen dies (GARCIA et al., 2018; NASH et al., 2021; ORR et al., 2021). Gap junctions zwischen den Zellen ermöglichen außerdem einen interzellulären Austausch (LIEVIN-LE MOAL und SERVIN, 2006).

Die Epithelzellschicht des Huhns besteht einerseits aus absorptiven Enterozyten und andererseits aus sekretierenden Becherzellen, Panethzellen und enteroendokrine Zellen (ZHANG et al., 2019; ORR et al., 2021). Daneben befinden sich außerdem intraepitheliale Lymphozyten in der einschichtigen Epithelzellschicht (NASH et al., 2021; ORR et al., 2021; KOÇAK und ÖZAYDIN, 2023).

Es wurden bei Mäusen und dem Menschen außerdem zwei weitere Epithelzellarten der Darmschleimhaut beschrieben, sog. Tuft-Zellen und sog. Cup-Zellen (GERBE et al., 2012). Die Tuftzellen sind selten und spielen eine Rolle für die immunologische Abwehr (HENDEL et al., 2022). Die Expression der klassischen Marker der Tuftzellen wurden auch beim Huhn gefunden (NASH et al., 2021). Über die Cup-Zellen konnte keine Literatur für das Haushuhn gefunden werden.

In der Kryptregion befinden sich die pluripotenten Stammzellen, die kontinuierlich neue Zellen der unterschiedlichen Epithelzelltypen hervorbringen. Von dieser Region aus erfolgt auch beim Huhn die ständige Zellerneuerung, was zahlreiche Mitosen in dieser Region belegen (MICHEL und GUTTE, 1971). Die Struktur der Krypten des Huhns ist derer der Säugetiere ähnlich. In der Kryptbasis lässt sich eine hohe Zellteilungsrate vorfinden. Dadurch werden die Zellen nach oben in die Mitte der Krypten gedrückt, wo das Zellwachstum und die Zellentwicklung stattfinden. Weiter oben im Zottenepithel sind die Zellen ausgereift und teilen sich nicht mehr (HODGES und MICHAEL, 1975). Dort werden sie circa 2 bis 4 Tage nach Bildung, durch Apoptose, an den Zottenspitzen abgeschilfert (IMONDI und BIRD, 1966; TURK, 1982; GEYRA et al., 2001; UNI et al., 2003; SMITH et al., 2014; DUANGNUMSAWANG et al., 2021).

Die am häufigsten anzutreffenden Zellen sind die Enterozyten. Sie sind hochzylindrisch und ihr Kern ist längsoval, locker strukturiert und befindet sich in der basalen Hälfte der Zelle (CHODNIK, 1947). Sie besitzen an ihrer apikalen Oberfläche einen Saum fingerförmiger Mikrovilli, den sog. Bürstensaum (FERRER et al., 1995; KARCHER und APPELEGATE, 2008). Auf jedem Enterozyten befinden sich circa 1000 dieser Mikrovilli auf der Zelloberfläche (PELASEYED und HANSSON, 2020). Beim Huhn hat der Bürstensaum vor dem Schlupf auf ganzer Darmlänge sowohl in der Kryptregion als auch an den Villusspitzen eine Länge von circa 1 μm . Nach dem Schlupf aber bleibt die Mikrovillilänge in der Kryptregion konstant bei circa 1 μm , während die Länge an den Villusspitzen zunimmt, im Duodenum wurden kurz nach dem Schlupf Durchschnittslängen von 2,2 μm , im Jejunum von 2,8 μm und im Ileum von 4,4 μm erreicht (KARCHER und APPELEGATE, 2008). Dabei findet nach dem Schlupf das Wachstum der Mikrovilli nicht linear zum Wachstum der Zotten statt

(REICHER und UNI, 2021). An der Oberfläche der Mikrovilli wiederum ragt eine Schicht Glykokalix in das Lumen, die wiederum hauptsächlich aus transmembranen Muzinen (TMM) besteht (PELASEYED und HANSSON, 2020). Die Hauptaufgabe der Enterozyten besteht in der finalen Digestion und Absorption der aufgenommenen Nahrung. Die Aufnahme von Nährstoffen wird über Transporter der Bürstensaum- und basolateralen Membran ermöglicht (ZHANG et al., 2019). Die feinen Kapillaren des Zottenbindegewebes reichen bis an die basale Seite der Enterozyten heran, damit trennt eine einschichtige Zelllage den Blutfluss vom Darmlumen (TURK, 1982). Ein früher Beginn der Fütterung der Küken nach dem Schlupf begünstigt die Entwicklung und Reifung der Enterozyten (FRIEDMAN et al., 2003).

Becherzellen finden sich neben den Enterozyten häufig im Epithel. Sie sind gekennzeichnet durch eine typische Kelchform mit einem dünnen basalen Anteil und weiter werdenden apikalen Anteil. In reifen Zellen befinden sich der Kern und die anderen Zellorganellen am basalen Ende der Zelle. Den größten Teil der Zelle nehmen Schleim-Vesikel ein, die sich apikal befinden (CHODNIK, 1947; HERATH et al., 2020). Das Sekret der Becherzellen enthält vor allem Muzine und bildet somit den strukturegebenden Anteil der Schleimschicht des Darms (FORSTNER et al., 1973; PEREZ-VILAR und HILL, 1999).

Neben ihrer Hauptaufgabe der Schleimproduktion spielen Becherzellen zudem eine Rolle im Immunsystem, die zunehmend besser verstanden wird. Es konnte gezeigt werden, dass Becherzellen dazu in der Lage sind, luminale Antigene aufzunehmen, um sie Immunzellen der darunterliegenden Lamina propria zu präsentieren, was entsprechende Immunkaskaden auslösen kann (MCDOLE et al., 2012; GUSTAFSSON et al., 2021; YANG und YU, 2021). Außerdem wurde beim Huhn auch in den Becherzellen die Produktion antimikrobieller Peptide (AMPs), die im Dünndarm zumindest beim Menschen primär von den Panethzellen gebildet werden, nachgewiesen (NAZEER et al., 2021).

Es wurde ursprünglich davon ausgegangen, dass die Becherzellen eine homogene Zellart darstellen mit einheitlicher Produktion ihrer Sekretionsprodukte. Verschiedene Untersuchungen an Mäusen konnten aufzeigen, dass sie allerdings auch in unterschiedliche Gruppen aufgeteilt werden können. 2016 wurde bei einer Untersuchung eine bestimmte Untergruppe der Becherzellen identifiziert, die sich im Eingang zu den Krypten

im Kolon befinden. Diese wurden als sogenannte „Wächter-Becherzellen“ (englisch: „sentinel goblet cells“) benannt, da sie bei Kontakt mit Bakterien dazu befähigt sind, durch verschiedene Kaskaden, erstens selbst vermehrt Schleim zu bilden und zweitens auch benachbarte Becherzellen zur Schleimproduktion anregen können. Der dadurch vermehrt produzierte Schleim schwemmt die Bakterien von den Krypten nach oben (BIRCHENOUGH et al., 2016). In einer weiteren Untersuchung von NYSTRÖM et al. (2021) wurden die Becherzellen entsprechend ihrer Lokalisation auf Höhe der Villus-Krypt-Axe im Kolon grob in 3 Hauptgruppen einteilen. Proliferative Stammzellen am Grund der Krypten, sowie sog „kryptale“ und „interkryptale“ Becherzellen. Die „interkryptalen“ Becherzellen im Lumen-zugewandten Bereich bilden Schleim mit einem anderen Proteinprofil als die „kryptalen“ Becherzellen im unteren Bereich der Krypten und zwischen den Zotten. Letztere bilden den Schleim, der zwischen den Zotten nach oben gedrückt wird und im Zottenspitzen-Bereich eine Vorwölbung aus Schleim nach oben drückt (englisch: „crypt mucus plume“). Dieser Schleim ist für Bakterien besonders schwer zu durchdringen. Der gebildete Schleim der „interkryptalen“ Becherzellen ist dagegen leichter durchdringbar, bildet aber zusammen mit den „kryptalen“ Schleimvorwölbungen die physiologische luminale Schleimschicht. Vor allem die Intaktheit der „interkryptalen“ Becherzellen spielt eine große Rolle bei der Verhinderung von Infektionen (NYSTRÖM et al., 2021).

Panethzellen und enteroendokrine Zellen sekretieren auch beim Huhn ihre Sekretionsprodukte in Richtung Darmlumen. Panethzellen befinden sich beim Huhn ausschließlich im Dünndarm in den Lieberkühnschen Krypten und sind mit Granula gefüllt. Diese Granula enthalten auch beim Huhn antibakterielle Substanzen wie Lysozyme c und g (WANG et al., 2016). Die Zellen finden sich im unteren Bereich der Krypten (WANG et al., 2016; YU et al., 2021). Enteroendokrine Zellen stellen eine weitere Gruppe von weniger häufigen Epithelzellen dar. Ihre Anzahl und Art verändert sich in den verschiedenen Darmabschnitten (ANDREW, 1976). Enteroendokrine Zellen können „pyramiden-, spindel- oder oval- förmig“ sein und sind als Einzelzellen im Epithel verstreut zu finden (NASH et al., 2021; KOÇAK und ÖZAYDIN, 2023). Sie sind zur Sekretion verschiedener Hormone befähigt, die wiederum verschiedene Systeme beeinflussen können (ZHANG et al., 2019). Es wurden bis dato schon

mehr als 10 Untergruppen an enteroendokrinen Zellen gefunden und mindestens 20 Peptidhormone dieser Zellen identifiziert (GUO et al., 2022). Enteroendokrine Zellen agieren hauptsächlich indirekt über ihre gebildeten Hormone. Es scheint aber auch ein direkter Kontakt zu den darunter liegenden Nervenfasern zu bestehen (BOHORQUEZ et al., 2014; BOHÓRQUEZ und LIDDLE, 2015; BOHORQUEZ et al., 2015). M-Zellen beispielsweise sind ein Vertreter der enteroendokrinen Zellen und finden sich auch beim Huhn ausschließlich im follikel-assoziierten Epithel (KITAGAWA et al., 2000). Sie können aktiv Partikel aufnehmen (BEFUS et al., 1980) und darunterliegenden Immunzellen präsentieren (CORR et al., 2008).

Daneben besiedelt eine hoch spezialisierte Gruppe von verschiedenen Lymphozyten-Arten das Epithel der Zotten, die gemeinsam als intraepitheliale Lymphozyten bezeichnet werden (SMITH et al., 2014).

1.3. Enterale Immunabwehr

Die Schleimhautoberfläche des Darms ist die größte Grenzfläche zur äußeren Welt und Haupteintrittsort von potenziell gefährlichen Antigenen. Zum Schutz dagegen hat sich ein komplexer Schutzmechanismus der Schleimhaut entwickelt. Der Gastrointestinaltrakt enthält hierfür einen Großteil der Immunzellen des Körpers (FRIEDMAN et al., 2003; SURIANO et al., 2022).

Zu den ersten mechanischen und chemischen Abwehrmechanismen des Darms gehört die Epithelzellschicht mit der ihr aufgelagerten Schleimschicht als Teil des unspezifischen Immunsystems (LIEVIN-LE MOAL und SERVIN, 2006; ZHAO und MAYNARD, 2022).

Die intestinale Schleimschicht bildet, neben der physikalischen Barriere, vor allem im Dünndarm ein „Reservoir“ für unspezifisch wirkende AMPs und spezifisch wirkende Immunglobuline (Ig) und erzeugen somit einen antimikrobiellen Gradienten, der die Barrierefunktion der Schleimschicht aufrechterhält (MCGUCKIN et al., 2011; ANTONI et al., 2013; BERGSTROM und XIA, 2022).

AMPs lassen sich auch beim Huhn nachweisen. Sie werden im Darm vor allem von heterophilen Granulozyten und sekretorischen epithelialen Zellen gebildet. Heterophile Granulozyten bilden AMPs wie β -Defensin, Cathelicidine, Lysozym,

kationische Proteine oder Polypeptide, die über die Epithelzellen in das Lumen gelangen (EVANS et al., 1994; ZHANG und SUNKARA, 2014; NAZEER et al., 2021). Bei der Speicherung und Abgabe der AMPs haben Becherzellen eine zentrale Rolle. Die Abgabe der AMPs ist dabei an die Anwesenheit von Mikrobiota gekoppelt, was die kommensalen Erreger fördert und bestimmte pathogene Erreger begrenzt (BAR SHIRA und FRIEDMAN, 2018; NAZEER et al., 2021).

Im Gegensatz zu den AMPs wirken Immunglobuline spezifisch gegen Erreger. Sie befinden sich direkt in der Schleimschicht und dem Darminhalt (MCGUCKIN et al., 2011). Die Genexpression des Polymeren Ig-Rezeptors und von IgA beginnt beim Huhn nach dem Schlupf anzusteigen und wird nach circa 21 Tagen auf konstantem Niveau exprimiert. Dies korreliert mit der Expression von MUC2 (ZHANG et al., 2015). GF gehaltene Tiere und Neugeborene zeigen stark reduzierte intestinale IgA-Werte (HONDA und TAKEDA, 2009; PIETRZAK et al., 2020). In den intestinalen Becherzellen wird vor dem Schlupf aus dem Eigelb maternales IgA aufgenommen, um einen ersten immunologischen Schutz sicherzustellen. Anschließend wird beim älter werdenden Huhn endogen gebildetes IgA in den Becherzellen gespeichert und abgegeben (BAR-SHIRA et al., 2014; BAR SHIRA und FRIEDMAN, 2018).

Sollte diese erste Barriere scheitern und Antigene die epitheliale Schicht durchdringen, kommt das darmassoziierte lymphatische Gewebe (GALT), ein Anteil des lymphoepithelialen Systems, ins Spiel. Das GALT entwickelt sich in den ersten Tagen nach dem Schlupf und wird, wie beim Menschen auch, hauptsächlich durch die frühe Exposition mit den intestinalen Mikrobiota beeinflusst (FRIEDMAN et al., 2003; WENG und WALKER, 2013). Das Huhn ist dabei nach dem Schlupf, im Gegensatz zum Menschen, voll auf die Keime der Umgebung angewiesen (ZENNER et al., 2021).

Das Huhn besitzt keine wie bei den Säugetieren üblichen Lymphknoten, aber das aviäre GALT ist gut ausgebildet (MATSUMOTO und HASHIMOTO, 2000; PERALTA et al., 2016). Das GALT hat beim Huhn dabei innerhalb des Schleimhaut-assoziierten Immunsystems eine Schlüsselrolle und koordiniert auch humorale Immunreaktionen (PERALTA et al., 2017).

Das GALT besteht einerseits aus vereinzelt oder locker strukturierten

lymphatischen Zellen verstreut im Epithel und der darunter liegenden Lamina propria und Tela submucosa und andererseits aus lymphatischen Verbänden, die an bestimmten strategisch günstigen Stellen im Verlauf des Darms, hauptsächlich in der Lamina propria und Tela submucosa, zu finden sind (CASTELEYN et al., 2010).

Das Verhältnis der Immunzellen zueinander variiert stark, je nach Lokalisation im Darm, dem Alter oder der Genetik des Tieres, der Zusammensetzung der Keimflora, Fütterung und Exposition zu pathogenen Erregern (SMITH et al., 2014).

Die lymphatischen Ansammlungen des GALT befinden sich vor allem in der Lamina propria und der Submukosa. Sie beinhalten im Darm bis zu 6 Peyersche Platten im Jejunum und Ileum, die derer der Säugetiere ähneln, das Meckel Divertikel, zwei Zäkaltonsillen, diffuses lymphatisches Gewebe im Rektum, die Bursa cloacalis (Synonym Bursa fabricii) und diffuses lymphatisches Gewebe im Proktodeum (MCLELLAND, 1993; CASTELEYN et al., 2010; PERALTA et al., 2016). Die Zäkaltonsillen (Tonsilla caecalis) befinden sich in der medialen Wand des Basisteils der Zäka, einige Millimeter unterhalb des Ostium ileocaecale (CASTELEYN et al., 2010; NAZEER et al., 2021).

All diese lymphatischen Ansammlungen besitzen eine spezielle epitheliale Schicht, das Follikel-assoziierte Epithel. Es beinhaltet auch beim Huhn M-Zellen, eine Untergruppe der enteroendokrinen Zellen (KITAGAWA et al., 2000).

1.4. Intestinales Mikrobiom beim Huhn

Die Zusammensetzung der Mikrobiota variiert stark zwischen unterschiedlichen Tierarten. Ein Grund für die spezies-spezifische Mikrobiota-Selektion ist die Glykan-Struktur des MUC2. Diese ist tierartspezifisch, weshalb potenzielle Epitope für die Adhäsion spezieller Bakterien bestehen können (JOHANSSON et al., 2013). So wurde beispielsweise bei Vergleichen des Mikrobioms beim Huhn und der Pute lediglich circa 16% Ähnlichkeit angenommen (WEI et al., 2013; AMER et al., 2023).

Bezogen auf die Verhältnisse beim Huhn, beginnt die eigentliche mikrobielle Besiedlung mit dem Schlupf. Es kann zwar schon vorher zu einem mikrobiellen

Kontakt vertikal über den Ovidukt der Mutterhenne oder über Poren in der Eischale kommen, doch die Mikroorganismen der Eischale beim Schlupf sind die eigentliche Grundlage für die Besiedlung des Darms (AMER et al., 2023). Die Eischale ist unter natürlichen Bedingungen von intestinalen Mikroorganismen des Muttertiers und der Umgebung besiedelt, so dass sich schon innerhalb der ersten Stunde enorme Mengen an Bakterien im Darm nachweisen lassen. Die maximale bakterielle Dichte wird schon weniger als einer Woche nach dem Schlupf erreicht. Sie ist stark von den Managementfaktoren der Geflügelaufzucht abhängig, beispielsweise ob das Ei in steriler Umgebung gebrütet und geschlüpft ist oder in dreckiger Einstreu (APAJALAHTI et al., 2004; RINTTILÄ und APAJALAHTI, 2013; BINDARI und GERBER, 2022).

Mit Hilfe moderner 16S rRNA-Gensequenzierung kommen verschiedene Arbeiten auf recht unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Hauptkomponenten der Bakterienspezies und deren Zusammensetzung in den verschiedenen Darmabschnitten des Huhns (WEI et al., 2013; AL-MARZOOQI et al., 2020; STAMILLA et al., 2021; ZENNER et al., 2021). Denn zahlreiche Faktoren beeinflussen die Zusammensetzung der intestinalen Bakterienspezies. Darunter ist das eben erwähnte Inokulum beim Schlupf, das Alter des Tieres, die Haltungsbedingungen, die Fütterung, eventuell vorhandene pathologische Zustände oder Antibiotikagaben oder die Hühnerrasse zu nennen (CISEK und BINEK, 2014; SCHOKKER et al., 2015; CLAVIJO und FLÓREZ, 2018; AL-MARZOOQI et al., 2020; BINDARI und GERBER, 2022). Aber auch die geografische Lage spielt eine große Rolle für die Zusammensetzung und die Hauptkomponenten der Mikrobiota (AL-MARZOOQI et al., 2020). So konnte gezeigt werden, dass die bakterielle Vielfalt mit dem Alter der Tiere größer wird, allerdings hat der Darmabschnitt noch größeren Einfluss auf die bakterielle Zusammensetzung als das Alter (STAMILLA et al., 2021).

Das korreliert mit der Veränderung des chemischen und physikalischen Milieus in den verschiedenen Darmbereichen. Die Milieuänderung bedingt andere Wachstumsbedingungen für die Bakterien. So konnten auch beim Huhn Unterschiede des Mikrobioms in den verschiedenen Darmbereichen aufgezeigt werden. STAMILLA et al. (2021) stellte mit genannten Methoden fest, dass die

bakterielle Zusammensetzung in den oberen Darmabschnitten, das heißt dem Duodenum und Jejunum, ähnliche Beschaffenheit besitzen, die sich von Ileum und den Zäka unterscheiden.

Im Verlauf des Dünndarms steigt die bakterielle Belastung vom Duodenum nach kaudal immer weiter an, was mit dem ansteigenden pH-Wert und der verlängerten Retentionszeit in den hinteren Dünndarmbereichen im Vergleich zum Duodenum erklärt wird (RINTTILÄ und APAJALAHTI, 2013; SVIHUS und ITANI, 2019; AL-MARZOOQI et al., 2020; DUANGNUMSAWANG et al., 2021; AMER et al., 2023).

Die Blinddärme zeigten im Vergleich zu den anderen Darmabschnitten eine besonders komplexe und vielfältige bakterielle Flora. Dies lässt sich durch die erhebliche Rolle des Zäkums beim Vogel als Verdauungsorgan erklären. Auf Grund der fermentativen Aufgaben befinden sich hier große Mengen an Bakterien. Im Zäkum der Vögel werden durch die verschiedenen Bakterien Zellulose, Stärke oder Polysaccharide aufgespalten (RINTTILÄ und APAJALAHTI, 2013; STANLEY et al., 2014; STAMILLA et al., 2021; BINDARI und GERBER, 2022). Aber auch andere Nahrungsbestandteile können hier von den Bakterien metabolisiert werden, wie zum Beispiel Proteine (ELLINGSTAATS et al., 2022). Im Zäkum findet außerdem Flüssigkeitsabsorption und Immunreaktionen statt (KOÇAK und ÖZAYDIN, 2023). Es konnte gezeigt werden, dass die Mikrobiota im Zäkum von extensiv gehaltenen Hühnern eine größere phylogenetische Vielfalt aufweisen im Vergleich zu intensiver Hühnerhaltung (MARCOLLA et al., 2023).

Ein Großteil des bakteriellen Kontakts geschieht im distalen Darm. Die retrograde Peristaltik im Hühnerdarm hat, neben der Wiederaufnahme von Wasser und Nährstoffen, auch eine Rolle im immunologischen Geschehen. Es wird von einer aktiven Beförderung von externen Antigenen von der Kloake in einen weiter vorne liegenden Darmabschnitt ausgegangen. Dies ermöglicht die Antigenaufnahme und -verarbeitung in den immunologischen Zentren zum Beispiel der Bursa cloacalis oder der Zäka (FRIEDMAN et al., 2003; SACRANIE et al., 2007).

BINDARI und GERBER (2022) fasst in einem Review-Artikel mehrere 16S rRNA-Gensequenzierungs-Untersuchungen zusammen und illustriert die

unterschiedlichen bakteriellen Phyla und die unterschiedlichen pH-Werte in den Darmbereichen beim Huhn. Im Dünndarm steigt der pH-Wert des Duodenums mit saurem 5 bis 6 nach kaudal immer weiter an, um dann im Ileum neutral oder ins leicht alkalische 7,5 zu steigen. In den Zäka und dem Kolon ist der pH-Wert mit circa 8 weiter alkalisch, um dann in der Kloake wieder neutrale pH-Werte zu erreichen. Im Dünndarm finden sich, laut ihren Recherchen, am häufigsten Bakterien der Stamms Firmicutes und unter diesen vor allem Laktobazillen und weniger häufig Clostridien, Ruminokokken, Streptokokken und Candidatus Arthromitus. Im Ileum wurden außerdem Bakterien des Stamms der Proteobakterien und unter diesen Escherichia und Enterococcus nachgewiesen. Im Zäkum findet sich die höchste bakterielle Dichte und auch hier finden sich am häufigsten Bakterien des Stamms Firmicutes und unter diesen Lactobacillus, Ruminococcus, Faecalibacterium, and Clostridium. Weniger häufig finden sich hier Bakterien des Stamms Proteobacteria and Archaea. In den Kloaken wandelt sich die bakterielle Zusammensetzung stetig, da sich die verschiedenen Ausscheidungsorgane hier entleeren. Hauptsächlich handelt es sich hier um Lactobacillus, Clostridium, Faecalibacterium, Ruminococcus, Bacillus, und Eubacterium (zitiert nach YEOMAN et al., 2012; BINDARI und GERBER, 2022).

In einer Untersuchung von 2020 wurden im Darm von Hühnern außerdem verschiedene Stämme und Gattungen von Pilzen nachgewiesen. Es zeigte sich, dass die sog. „Mycobiota“ in den vorderen Darmabschnitten vielfältiger und zahlreicher im Vergleich zu den hinteren Darmabschnitten vorzufinden sind. Dies steht eindruckswise im Gegensatz zur Besiedlungstendenz der Bakterien. 90% bis 99% der nachgewiesenen Pilze gehört zu den Stämmen Ascomycota und Basidiomycota, wovon zu 80% die Gattungen Microascus, Trichosporon und Aspergillus vorherrschten. Von diesen waren die Arten *Scopulariopsis brevicaulis*, *Trichosporon asahii* und zwei Aspergillus Arten am häufigsten. Beim Menschen wurde die Relevanz der Mycobiota durch neue Studien im Zusammenhang mit Adipositas und Krankheiten dargestellt (ROBINSON et al., 2020).

2. Intestinale Schleimschicht

2.1. Zusammensetzung

Die intestinale Schleimschicht besteht hauptsächlich aus Wasser (CREETH, 1978), wobei ein Anteil von bis zu 95% gemessen werden konnte (BARMPATSALOU et al., 2021; DUBBELBOER et al., 2022). Das Wasser ist in einem Netzwerk aus hoch-glykosylierten gelbildenden Muzinen gebunden, die mit anderen nicht strukturgebenden Bestandteilen vermischt oder verbunden sind (SONG et al., 2023).

Zu den nicht-strukturgebenden Bestandteilen zählen vor allem unspezifisch wirkende AMPs, sowie spezifisch gegen bestimmte Erreger gerichtete Immunglobuline (SURIANO et al., 2022), je nach Darmabschnitt mehr oder weniger große Mengen an Bakterien und Nahrungsbestandteilen (ERMUND et al., 2013a) und vor allem im Dünndarm und Magen Enzyminhibitoren (SURIANO et al., 2022). In den vergangenen Jahren wurden in der Schleimschicht zunehmend mehr Proteine identifiziert, darunter das IgG-Fc-bindende Protein (JOHANSSON et al., 2009), der Intestinal Trefoil Factor sowie der Calcium-aktivierte Chloridkanalregulator 1. Diese Proteine sind ebenfalls essenziell für den Aufbau und die Aufrechterhaltung der physiologischen Schleimschicht und können chemische Verbindungen mit dem Mucin-Glykoprotein MUC2 eingehen (SONG et al., 2023).

2.2. Funktion

Eine schützende Funktion wird der gastrointestinalen Schleimschicht schon lange Zeit zugesprochen (FLOREY, 1962; CREETH, 1978; ATUMA et al., 2001).

Im Verdauungsbrei befinden sich neben kommensale Mikroorganismen, auch pathogene virale und bakterielle Erreger oder auch ein- oder mehrzellige Parasiten und andere schädigende Noxen. Die Schleimschicht bietet eine erste anatomische Barriere in Form eines Biofilms auf der Epithelzellschicht. Trotz der immensen Menge an Bakterien im Darm, bleibt das Blut beim gesunden Tier steril, was auf die Barriere- oder auch Habitat-Funktion der intestinalen Mukusschicht, in Zusammenspiel mit der epithelialen Schicht und des darunter

liegenden Immunsystems beruht (VANCAMELBEKE und VERMEIRE, 2017; SURIANO et al., 2022; BIRCHENOUGH et al., 2023).

Die langen Zuckerseitenketten der Muzine bilden Adhäsionsstellen für Bakterien, sodass diese nicht bis zum Epithel gelangen können (CALVIGIONI et al., 2023; HE et al., 2023). Diese Glykane dienen als Nährstoffquelle für Bakterien und schützen das MUC2-Protein vor bakterieller Proteolyse (MARTENS et al., 2009; BERGSTROM et al., 2017; SURIANO et al., 2022).

Die Schleimschicht schützt daher nicht nur vor pathogenen Keimen, sondern ermöglicht auch die Besiedlung mit kommensalen Bakterien. Das ist eine bedeutsame Funktion der Schleimschicht, da diese kommensale Mikrobiota in komplexer Wechselwirkung mit dem Immunsystem stehen und auch selbst vor pathogenen Keimen schützen können (ZHAO und MAYNARD, 2022).

Es wurde gezeigt, dass diese Barriere- und Habitat-Funktionen in den unterschiedlichen Abschnitten des Magen-Darm-Trakts durch unterschiedliche Mechanismen erreicht werden. Dies beruht auf den unterschiedlichen physiologischen Aufgaben und unterschiedlichen bakteriellen Belastungen in den entsprechenden Darmbereichen (JOHANSSON et al., 2008; ERMUND et al., 2013a; BIRCHENOUGH et al., 2023).

Vor allem in den vorderen Magen- und Darmabschnitten bietet die Schleimschicht zudem einen Schutz vor endogenen Verdauungsenzymen. Es konnte gezeigt werden, dass die Epithelschicht nach dem Zusammenbruch der Schleimschicht von den Verdauungsenzymen beschädigt wird (CHANG et al., 2012).

Im Enddarm schützt die intestinale Schleimschicht die Schleimhaut vor mechanischen Schäden, indem es die Kotballen bei Mäusen mit einer Schleimschicht ummantelt und gleitbarer für den Transport im Darmkanal macht (BERGSTROM und XIA, 2022).

2.3. Morphologie

2.3.1. Methoden zur Darstellung der Schleimschicht

Um die intestinale Schleimschicht sichtbar zu machen, muss zunächst die schleimerhaltende Herstellung der histologischen Präparate gewährleistet sein. Die Verwendung eines nicht austrocknenden Fixierungsmittels, wie Carnoy oder Poloxamer 407, ist hierfür von besonderer Bedeutung. Formalin (wässrige Lösung von Formaldehyd) kann nicht verwendet werden (MACEDONIA et al., 2020).

Verschiedene histochemische Schleimfärbungen können zur Färbung der intestinalen Schleimschicht verwendet werden. Zur Muzin-Beurteilung wurden unter anderem die Periodsäure-Schiff-Färbung (PAS) sowie die Alcianblau-Färbung (AB) eingesetzt. Alcianblau kann bei zwei unterschiedlichen pH-Werten verwendet werden (pH 1,0 und pH 2,5). Häufig werden PAS- und AB-Färbungen in Kombination angewendet (OTA und KATSUYAMA, 1992; GARCÍA-DÍAZ et al., 2022; MEZHIBOVSKY et al., 2022; NABI et al., 2022; BIRCHENOUGH et al., 2023; KOÇAK und ÖZAYDIN, 2023; YU et al., 2023). Die Mucicarmin-Färbung stellt eine weitere klassische histochemische Schleimfärbung dar (NABI et al., 2022).

Außerdem werden bei neueren Untersuchungen Immunfluoreszenzfärbungen mit spezifischen Anti-Muzin-Antikörpern genutzt, um die intestinale Schleimschicht unter verschiedensten Bedingungen zu untersuchen (JOHANSSON et al., 2008; JOHANSSON et al., 2010; GUSTAFSSON et al., 2012; ERMUND et al., 2015; NYSTRÖM et al., 2021; MEZHIBOVSKY et al., 2022).

Auch Lektine wurden zur Färbung der Schleimschicht verwendet. Oft wird diese Färbung mit MUC2-Immunfluoreszenzfärbungen und gegebenenfalls DNA-Farbstoffen kombiniert. Die Lektine binden an Glykan-Epitope der Muzine (BERGSTROM und XIA, 2022).

Um Bakterien in der Schleimschicht darzustellen, wurden verschiedene Ansätze verwendet:

Unter den histochemischen Färbungen eignet sich die Gram-Färbung besonders zur Darstellung der Bakterien in der Schleimschicht bei Carnoy-

fixierten Proben (RIEDELSHEIMER und BÜCHL-ZIMMERMANN, 2015). Diese Methode wurde bereits in mehreren Arbeiten erfolgreich verwendet. HENDRICK ANTONI et al. (2015) nutzt die Gram-Färbung an, in Carnoy'scher Lösung fixierten Präparaten, bei Mäusen (HENDRICKX ANTONI et al., 2015). SAKATA et al. (2022) verwendet ebenfalls die Gram-Färbung an Carnoy-fixierten Präparaten bei Ratten. Sie nutzten diese Methode erstens allein und zweitens auch in Kombination mit einer AB 2,5. Dazu wurde zuerst die AB 2,5-Färbung durchgeführt und anschließend die Gram-Färbung (SAKATA et al., 2022). Eine weitere Studie des Forschungsteams verwendete ebenfalls die Gram-Färbung, um über die Peyer-Plaques gramnegative und grampositive Bakterien zu identifizieren (MANTANI et al., 2023).

Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung der Bakterien ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), bei der eine DNA-Sonde, die an bestimmte bakterielle DNA-Sequenzen bindet – zum Beispiel an die 16S-rRNA-Gensequenz – an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt wird. Oft wird die sogenannte EUB388-Sonde verwendet. Nach entsprechender Paarung sind die entstandenen Hybride in einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Die Bakterien werden dann als leuchtende Punkte dargestellt. Im Kolon ist dies beispielsweise in der äußeren Schleimschicht und im proximalen Kolon, in geringem Umfang auch im äußersten Teil der inneren Schleimschicht der Fall (AMANN et al., 1990; SWIDSINSKI et al., 2005; JOHANSSON et al., 2009; JOHANSSON et al., 2010; JOHANSSON et al., 2014; JAKOBSSON et al., 2015; BERGSTROM et al., 2020; MACEDONIA et al., 2020; NYSTRÖM et al., 2021; ZHAO und MAYNARD, 2022; BIRCHENOUGH et al., 2023).

DNA-Fluoreszenzfarbstoffe werden häufig mit der Anti-MUC2-Immunfluoreszenz oder anderen Schleimfärbungen kombiniert, um Zellkerne der Epithelzellen und gegebenenfalls auch bakterielles Erbgut darzustellen. Unter den DNA-Färbungen wurde DAPI (JOHANSSON et al., 2008; JOHANSSON et al., 2010; GROOTJANS et al., 2013; JOHANSSON et al., 2014; BERGSTROM et al., 2020), Syntox Green (JOHANSSON et al., 2008; JOHANSSON et al., 2010; BIRCHENOUGH et al., 2023), TO-PRO 3 Iodide oder TOTO-3 Iodide (HENNEBERGER et al., 2011; ERMUND et al., 2013a) und eine der Hoechst-Färbungen (JAKOBSSON et al., 2015; YILDIZ et al., 2015; NYSTRÖM et al., 2021; BIRCHENOUGH et al., 2023) verwendet.

Die Durchdringbarkeit der Schleimschicht für kleine Partikel wurde in den verschiedenen Darmabschnitten untersucht. Dazu wurden fluoreszierende Partikel mit einer Größe von Bakterien (circa 1 μm) bzw. etwas kleineren oder größeren Partikeln auf die Schleimschicht aufgebracht und über eine definierte Zeit sedimentieren gelassen, um zu beobachten, ob und wie weit sie eindringen (GUSTAFSSON et al., 2012; ERMUND et al., 2013a; VOLK et al., 2019; BIRCHENOUGH et al., 2023).

2.3.2. Chronologische Aufstellung bedeutsamer Studien

Schon 1810 erkannte Tiedemann bei anatomischen Untersuchungen, dass die Schleimhaut des Magen-Darm-Trakts der Vögel von einem „weißlichen gelben Schleim überzogen“ ist (TIEDEMANN, 1810).

Eine histologische Untersuchung der Schleimschicht stellte sich allerdings bei allen Tierarten lange Zeit als schwierig heraus, da routinemäßige Fixierungen, wie z.B. eine Formalin-Fixierung, das Gewebe zu stark austrocknen. Der hohe Wasseranteil der intestinalen Mukusschicht macht sie empfindlich für austrocknende Fixierungsmethoden, so dass sie zusammenfällt, nicht mehr anfärbbar und folglich nicht mehr sichtbar ist (OTA und KATSUYAMA, 1992; ERMUND et al., 2013a; MACEDONIA et al., 2020; AN et al., 2022). Aus diesem Grund war die Kontinuität der gastrointestinalen Schleimschicht lange Zeit umstritten (MORRIS et al., 1984; SELLERS et al., 1987; JORDAN et al., 1998).

Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Ansätze versucht, um die Eigenschaften und Dicke der Schleimschicht zu ergründen. Die größten Erfolge erzielten lange Zeit in vitro Untersuchungen, die Anfang der 1980er Jahren an nicht fixierten Darmpräparaten durchgeführt wurden (BICKEL und KAUFFMAN, 1981; KERSS et al., 1982; MCQUEEN et al., 1983; TAKEUCHI et al., 1983). BICKEL und KAUFFMAN (1981) untersuchten die Schleimschicht mit einem inversen Mikroskop, einer Spaltlampe und einem Pachymeter. Dabei wurden im Magen der Ratte durchschnittlich 166 μm , bei Meerschweinchen 234 μm , bei Hunden 425 μm und beim Menschen 576 μm für die Schleimdicke berechnet (BICKEL und KAUFFMAN, 1981). Weitere Dickenmessungen wurden von KERSS et al. (1982) am Magen von Ratte, Frosch und Mensch durchgeführt. Die Proben wurden mit zwei parallelen Rasierklingen in dicke Präparate (1,6 mm) geschnitten und mittels eines inversen Mikroskops, unter Einsatz von

Hell-, Dunkel- oder Phasenkontrast, untersucht und mithilfe einer Okularstrichplatte vermessen. Die Kontinuität der Schleimschicht des Magens bestätigte sich mit dieser Methode bei allen untersuchten Tierarten. Die Ergebnisse der Dickenmessung ergaben durchschnittlich weniger als 100 µm bei der Ratte und dem Frosch und circa 200 µm beim Menschen (KERSS et al., 1982). Mit denselben Methoden wurde im Duodenum von Ratten 1983 eine durchschnittliche Dicke von 82 µm gemessen (MCQUEEN et al., 1983). TAKEUCHI et al. (1983) konnte mit Mikroelektroden, einer Spaltlampe und einem Mikroskop im Magenfundus von Fröschen maximale Dicken von circa 441 bis 636 µm messen (TAKEUCHI et al., 1983).

Diese in vitro Untersuchungen von nicht fixierten Proben sind vor allem zur Dickenbestimmung geeignet, scheitern allerdings, die genaue Beschaffenheit der Schleimschicht darzustellen. Außerdem ist die Gefahr groß bei dem Durchschneiden des Gewebes mit den parallelen Rasierklingen die Schleimschicht mechanisch zu zerstören (OTA und KATSUYAMA, 1992).

Daher verglichen OTA und KATSUYAMA (1992) verschiedene Aufbereitungsarten zur Darstellung und Messung der Schleimschicht. Die operativ entfernten Proben des menschlichen Magens wurden mit Vorsicht behandelt und nicht gespült, um die Schleimschicht zu erhalten. Da Gefrierschnitte einen deutlichen Verlust der Schleimschicht aufwiesen, wodurch sie schwer zu beurteilen waren, wurden verschiedene Fixierungsarten getestet, um die Schleimschicht in Paraffineinbettungen besser erhalten zu können. Unter den untersuchten Fixierungen erbrachte die wasserfreie Carnoy'sche Lösung, auch Methanol-Carnoy oder Methacarn genannt (vgl. PUCHTLER et al., 1970), die besten Ergebnisse (OTA und KATSUYAMA, 1992). Nach der Anwendung der verschiedenen Fixierungen, wurden die Proben in Paraffinblöcke gegossen und mit Hämatoxylin-Eosin (HE), einer Kombination von AB und PAS oder dem Lektin, *Griffonia simplicifolia agglutinin-II* gefärbt und ausgewertet. Durch diese 3 µm dick geschnittenen Präparate kamen sie, nicht nur zum Ergebnis einer kontinuierlichen Schleimschicht, sondern zeigten außerdem mit der AB-PAS-Färbung, dass die Schleimschicht des Magens selbst eine parallel zur Epithelzellschicht verlaufenden Streifung aufweist. Die Dickenmessung im Magenfundus erbrachte Durchschnittswerte von circa 55,4 µm und im Pylorus circa 21,8 µm (OTA und KATSUYAMA, 1992).

Unter Verwendung der Carnoy'schen Fixierung wurde des Weiteren die Schleimschicht des menschlichen Dickdarms untersucht. Dadurch konnten sie, wie in Abbildung 2 mit HE-Färbung und in Abbildung 3 mit AB-PAS-Färbung zu erkennen, zwei Schleimschichten aufzeigen. Ausschließlich in der äußeren Schicht zwischen den streifenförmigen Verdichtungen fanden sie Debrít, Futterreste und Bakterien. Die Barrierefunktion der inneren bakterienfreien Schleimschicht wurde daher angenommen. Die Schleimschichtdicken-Messungen ergaben im Rektum die höchsten Werte mit durchschnittlich 88,8 µm und im Zäkum mit durchschnittlich 31,1 µm die geringsten Ergebnisse. Eine Schrumpfung der Schleimschicht durch die Carnoy-Fixierung, obgleich diese geringer ist als mit anderen klassischen Fixierungen, wurde als Erklärung für die geringen Werte herangezogen (MATSUO et al., 1997).

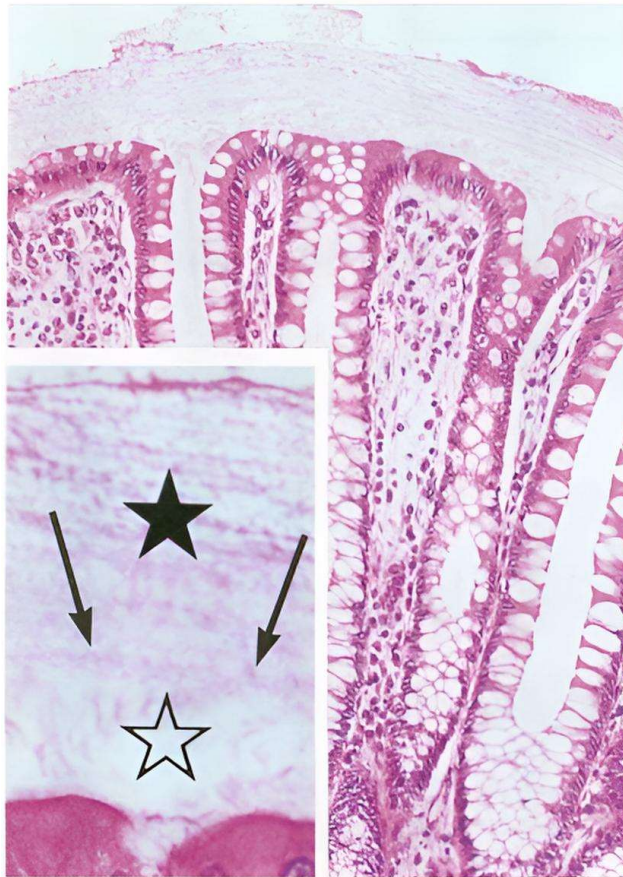


Abbildung 2: Schleimhaut mit aufgelagerten Schleimschicht, mit zwei parallel verlaufenden Schichten unterschiedlicher Musterung im menschlichen Kolon transversum links unten Vergrößerung: zweischichtige Schleimschicht aus MATSUO et al. (1997), Carnoy'sche Fixierung, HE-Färbung, offener Stern: innere Schleimschicht mit schräger Streifung, schwarzer Stern: äußere Schleimschicht, Pfeile zeigen Grenzlinie



Abbildung 3: Normale Schleimschicht des menschlichen Kolon ascendens mit deutlich zu unterscheidender innerer und äußerer Schleimschicht oberhalb der Epithelzellschicht aus MATSUO et al. (1997), Carnoy'sche Fixierung, AB-PAS-Färbung, zwei deutlich zu unterscheidenden Schleimschichten

Mit Hilfe von besonders vorsichtig und kurz nachfixierten Gefrierschnitten des Magens bei Ratte und Mensch und der speziellen AB/PAS-Schleimfärbung versuchte JORDAN et al. (1998) die kontinuierliche Schleimschicht besonders unverändert darstellen zu können. Die Ergebnisse der Dickenmessung ergaben damit höhere Werte als bei zuletzt genannter. Bei der Ratte je nach Magenabschnitt durchschnittlich 166 μm , 179 μm und 184 μm . In der menschlichen Magenschleimschicht durchschnittlich 144 μm (JORDAN et al., 1998).

ATUMA et al. (2001) machten die intestinale Schleimschicht bei lebenden anästhesierten Ratten sichtbar, indem sie Kohlepartikel auf die luminal Schleimschicht aufbrachten. Mit Hilfe einer speziellen Mikropipettentechnik (s. auch SABABI et al. (1995)) konnten sie die Dicke einer inneren stark anhaftenden und einer äußeren locker darauf befindlichen Schleimschicht im gesamten Magen-Darm-Trakt ermitteln. Die Verhältnisse der beiden Schichten zueinander sowie die Gesamtdicke zeigt, wie Abbildung 4 verdeutlicht, deutliche Unterschiede in den verschiedenen Darmbereichen. Die innere Schicht ist nur im Magen und im Dickdarm gut ausgebildet, im Dünndarm dagegen praktisch komplett fehlend. Diese in vivo Messergebnisse der Schleimdicke erreichten wesentlich höhere Werte als bei vorherigen in vitro Messungen. Die durchschnittliche Gesamtdicke der Schleimschicht bei Ratten betrug in dieser Studie circa 189 μm im Corpus und 274 μm im Antrum des Magens, 170 μm im Duodenum, 123 μm im Jejunum, 480 μm im Ileum und 830 μm im Kolon. (ATUMA et al., 2001). Auch andere Forschungsgruppen nutzten diese neue Mikropipettentechnik zur Schleimschichtdickenmessung (BROWNLEE et al., 2003; HENRIKSNAS et al., 2006; MALMBERG et al., 2006).

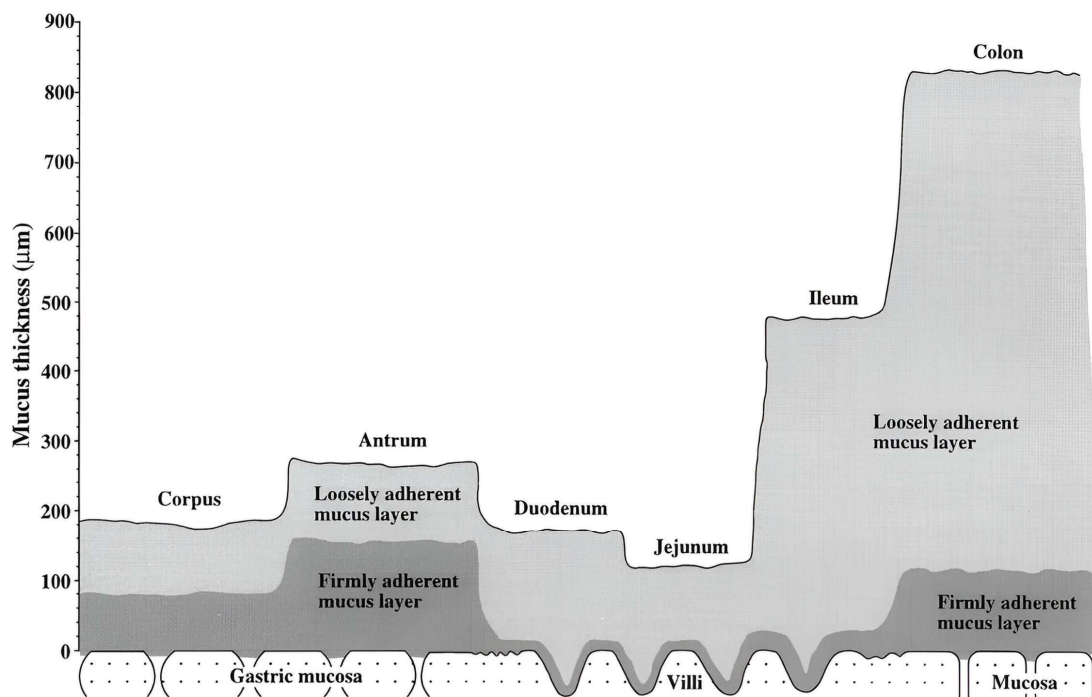


Abbildung 4: Schematische Darstellung der in vivo gemessenen Dicke und Anhaftung der inneren und äußeren Schleimschicht im Verlauf des Darms, aus ATUMA et al. (2001)

Die „Mucin Biology Group“ der Universität Göteborg in Schweden unternahm 2008 detailliertere Studien am Dickdarm von Mäusen. Für die Messung der Dicke der Schleimschicht, machten sie sich ebenfalls die eben beschriebene in vivo Mikropipettentechnik zu nutze. Sie bestimmten hiermit eine Schleimschichtdicke von circa 150 μm , wobei die innere fest anhaftende Schicht circa 50 μm und die äußere lockere Schicht circa 100 μm betrug. Des Weiteren wurde für die mikroskopische Untersuchung, nach der Tötung der Tiere, nicht gewaschene Proben des distalen Kolons in Carnoy'scher Lösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Zur anschließenden Färbung der transparenten Schleimschicht verwendeten sie neben der traditionellen histochemischen Schleimfärbung mit AB-PAS, eine immunhistochemische Färbung mit speziellen, an die Maus angepassten, MUC2-Antikörpern und einem fluoreszierenden sekundären Antikörper (JOHANSSON et al., 2008).

2013 untersuchte die „Mucin Biology Group“ der Universität Gothenburg diesmal vergleichend den kompletten Magen-Darm-Trakt einschließlich der Peyerschen Platten bei Mäusen (ERMUND et al., 2013a). Sie verwendeten zur Dickenmessung der Schleimschicht eine etwas veränderte Mikropipetten-Technik (siehe auch (JOHANSSON et al., 2010)). Mithilfe spezieller Pipetten bestimmten sie außerdem die Anhaftungseigenschaften der Schleimschicht und ihre Zweischichtigkeit. Auch hier wurde eine Immunhistochemische Färbung mit MUC2-Antikörpern und DNA-Färbungen mit DAPI oder TO-Pro 3 Iodit verwendet. Zusätzlich wurden bei in vivo Untersuchungen fluoreszenzmarkierte Mikrosphären auf die Schleimschicht aufgetragen und eine vorgegebene Zeit sedimentieren gelassen. Diese mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Partikel, wurden in einer Größe von 0,5 μm , 1 μm und 2 μm gewählt, um die Durchdringbarkeit der Schleimschicht für Mikroorganismen zu evaluieren.

Durch ihre Untersuchungen konnten sie im Magen und Kolon eine innere, fest am Epithel anhaftende, sowie eine äußere leicht abzupipettierende Schleimschicht darstellen. Im Gegensatz dazu findet sich im Dünndarm, sowie über den Peyerschen Platten keine innere fest anhaftende Schicht. Die Schleimschicht des gesamten Dünndarms besteht nur aus einer leicht abzupipettierenden Schicht. Im Magen und Dünndarm, wo die Verdauung und Absorptionsvorgänge stattfinden und die bakterielle Belastung wesentlich

geringer ist als im Kolon, konnte eine leicht durchdringbare Mukusschicht dargestellt werden. Die innere Schleimschicht im Kolon ist, vor allem im distalen Bereich, nicht für die verwendeten Mikrosphären durchdringbar und daher trotz der hohen bakteriellen Belastung in diesem Darmbereich, komplett bakterienfrei. Die äußere Schleimschicht dagegen ist besonders gut für Partikel der Größe von Bakterien durchdringbar und somit mit einer großen Menge an Bakterien durchsetzt (ERMUND et al., 2013a).

Die folgenden drei Abbildungen entstammen der genannten Studie. Wie Abbildung 5 im Duodenum dargestellt, befindet sich im Dünndarm eine strangartige dünne Mukusschicht zwischen den Zotten, die den Zwischenraum nicht ausfüllt. Dies wird als Artefakt aufgrund der Schrumpfung der Schleimschicht durch die Fixierung interpretiert. In Abbildung 6 wird die Zweischichtigkeit der Schleimschicht im Dickdarm durch Carnoy'sche Fixierung, MUC2-Immunfluoreszenz und DAPI-DNA-Farbstoff, mit einer inneren bakterienfreien Schleimschicht, den Untersuchungen von 2008 entsprechend, bestätigt. Durch den blauen DNA-Farbstoff DAPI konnten Bakterien in der Dünndarm-Schleimschicht angefärbt werden. Sie befinden sich bei gesunden Tieren nur im Schleim an Spitzennähe und lumennah zwischen den Zotten, jedoch nicht in der Tiefe, in der Nähe der Krypten (ERMUND et al., 2013a).

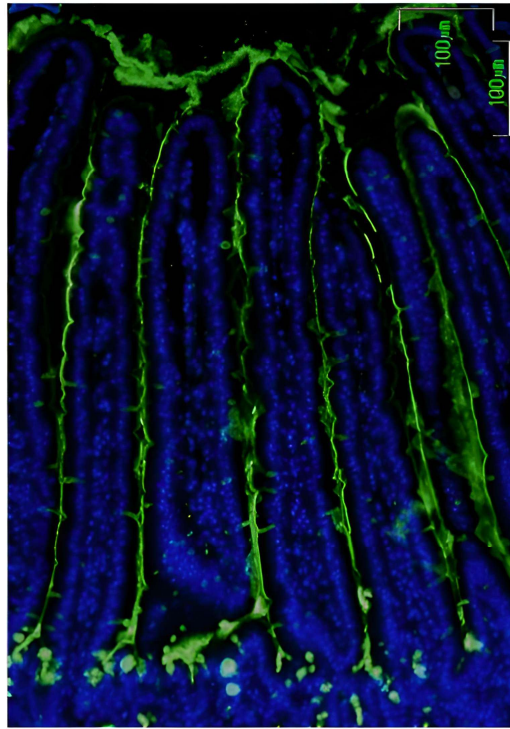


Abbildung 5: Dünner strangartiger Schleim im Duodenum Maus aus ERMUND et al. (2013a), Carnoy'sche Fixierung, Immunhistochemie: MUC2 (grün), DAPI (blau)

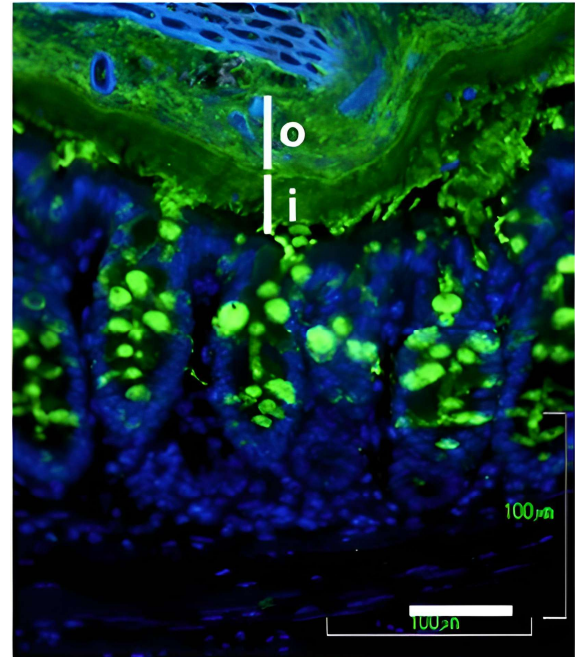


Abbildung 6: Zweischichtige Schleimschicht im Kolon, wobei die innere Schleimschicht bakterienfrei ist, Maus aus ERMUND et al. (2013a): distales Kolon, Carnoy'sche Fixierung, Immunhistochemie: MUC2 (grün), DAPI (blau), i: innere bakterienfrei, o: äußere mit Bakterien (blau)

Auch über den Peyerschen Platten konnte eine kontinuierliche Schleimschicht, die leicht abzapipettieren ist und von Mikrosphären der gleichen Größe durchdrungen werden kann wie im Ileum, nachgewiesen werden (ERMUND et al., 2013b; ERMUND et al., 2013a).

MACEDONIA et al. (2020) verglich verschiedene Fixierungsarten, um einerseits die Mukusschicht gut zu erhalten und andererseits gute Ergebnisse bei der Immunfluoreszenz und FISH zu erzielen. Dabei untersuchten sie auch eine neue Fixierung mit Poloxamer 407, die die Schleimschicht gut erhält. Die mit Polaxamer 407 erzielten Ergebnisse bei der Darstellung von Bakterien in der Schleimschicht waren im Vergleich zu Carnoyscher Fixierung zufriedenstellender. Auch in dieser Studie wurde gefolgert, dass eine Formalin-Fixierung die Schleimschicht durch Dehydratation nicht erhalten kann und dadurch unsichtbar wird (MACEDONIA et al., 2020).

BERGSTROM et al. (2020) nutzte das Lektin Maackia Amurensis lectin II (MAL 2), Anti-MUC2-Antikörper und die FISH-Sonde EUB338, die bakterielle RNA anfärbt. Das Lektin MAL 2 bindet α 2,3-verknüpfte sialylierte and sulfatierte Glykane (GEISLER und JARVIS, 2011; zitiert in BERGSTROM et al., 2020). Es zeigte sich, dass Mal 2 den Schleim des distalen, nicht aber des proximalen Kolons färbt. Die Forschenden konnten anhand dieser Färbekombination sowie ergänzender biochemischer Untersuchungen nachweisen, dass im aufsteigenden proximalen Kolon eine Schleimschicht gebildet wird, die sich um die Kotballen legt. Anschließend wird der mit Schleim-ummantelte Kotballen in den transversalen und deszendierenden Teil des Kolons weitertransportiert. Dort gebildeter Schleim legt sich als weitere dünne Schicht zwischen Kotballen und Epithel. Es konnte in dieser Studie außerdem gezeigt werden, dass die Mikrobiota selbst die MUC2-Expression und -Sekretion im proximalen Kolon induzieren können, was zur Umhüllung der Kotballen führt. Im distalen Kolon jedoch ist diese Induktion nicht möglich (BERGSTROM et al., 2020; BERGSTROM und XIA, 2022).

NYSTRÖM et al. (2021) erkannten durch verschiedene Lektin- und Immunhistochemische Färbungen, sowie biochemische Untersuchungsmethoden, dass vor allem im Kolon verschiedene Untergruppen der Becherzellen beschrieben werden können. Wie schon im Kapitel 1.2.2.

Zelltypen des Schleimhautepithels erwähnt, sezernieren diese unterschiedlichen Schleim und färben sich auch unterschiedlich. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Maus das Lektin WGA die „kryptalen“ Becherzellen des unteren Kryptepithels in Weiß anfärbt, wohingegen UEA1 die „interkryptalen“ Becherzellen des Lumen zugewandten Epithels in Rot anfärbt. Außerdem wurden vor allem die „interkryptalen“ Becherzellen durch eine Immunfluoreszenz gegen nicht-glykosylierte MUC2 (ApoMuc2), das sich noch im endoplasmatischen Retikulum befinden, in grün angefärbt. Es wurde vermutet, dass dies auf die rasche Sekretion und Neubildung des Schleims in den Lumen zugewandten Becherzellen zurückzuführen sein kann. Beide Untergruppen der Becherzellen zusammen bilden die funktionierende Schleimschicht des Kolons, die als Barriere dient (NYSTRÖM et al., 2021).

BIRCHENOUGH et al. (2023) folgerte nach Untersuchungen der bakteriellen Besiedlung im Dünndarm von Mäusen, dass die jejunale Schleimschicht

vielmehr ein „mikrobielles Habitat“ darstellt, im Gegensatz zur Barrierefunktion für Bakterien der inneren Schleimschicht im Kolon. Wie Abbildung 7 des mittleren Jejunums verdeutlicht, wurde mit Hilfe von FISH bakterielle 16S rRNA in Rot dargestellt, DNA mit HOECHST in Blau, die Schleimschicht mit UEA1 in Grün und der Epithelschichttrand wurde nachträglich zur Verdeutlichung als gelbe gestrichelte Linie dargestellt. Die Bakterien befinden sich an den Zottenspitzen und zwischen den Zotten, allerdings nicht oder kaum mit dem Epithel in direkten Kontakt. In der Untersuchung wurden ebenfalls Proben des distalen Ileums untersucht, wo sich diese Verhältnisse nicht wiederholten. Im Ileum befinden sich generell wenige Bakterien zwischen den Zotten. Sie befinden sich hauptsächlich oberhalb der Zottenspitzen. Die vermehrte Produktion AMPs im Ileum könnte hierfür verantwortlich sein (BIRCHENOUGH et al., 2023).

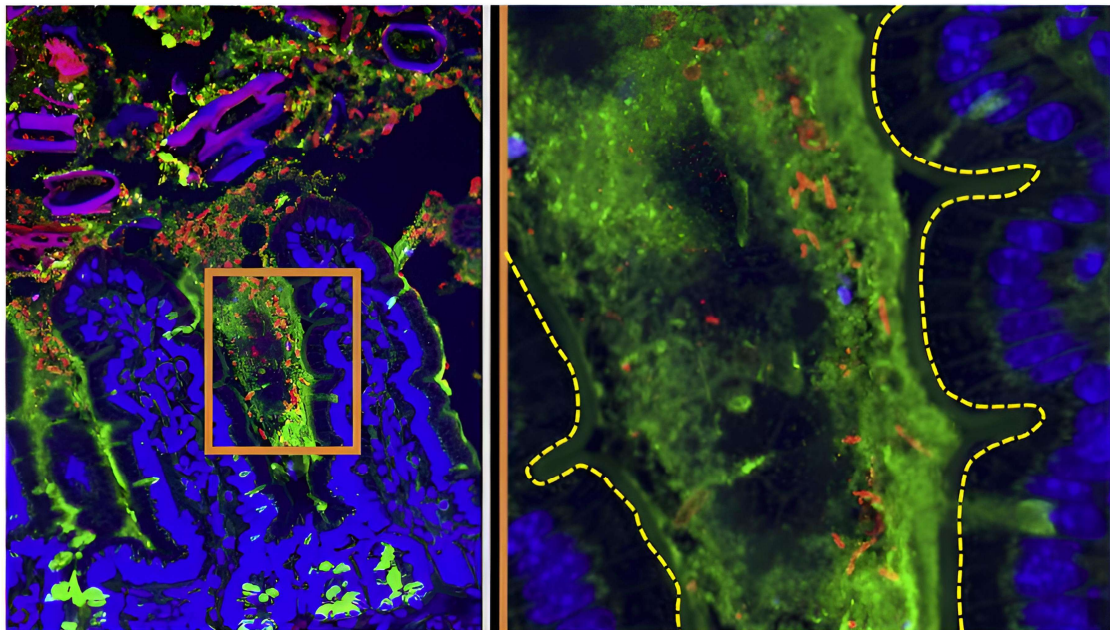


Abbildung 7: Darstellung der Schleimschicht im Jejunum als bakterielles Habitat, Jejunum Maus, aus BIRCHENOUGH et al. (2023), rechts in Vergrößerung, Immunhistochemie: Hoechst DNA-Färbung (blau), Schleim mit UEA1 (grün), und Bakterien (16S FISH; rot)

Bei Untersuchungen an neonatalen Ratten, einen Tag nach der Geburt bis ins Erwachsenenalter, konnte die Mucin Biology Group im Verlauf der Entwicklung Veränderungen an der Schleimschicht im Kolon feststellen. Eine am Epithel anhaftende Schleimschicht konnte bei allen Altersgruppen bestätigt werden. Allerdings wurde eine stetige Dickenzunahme von Tag 1 nach der Geburt mit

50 µm bis zum Tag 15 mit 100 µm beobachtet, die dann bis ins Erwachsenenalter konstant blieb. In der Immunfluoreszenzmikroskopie konnten sie die typische geschichtete innere Schleimschicht, die sich außerdem um die Kotballen legt, erst ab Tag 3 bestätigen vorher noch nicht. Und auch die Barrierefunktion entwickelte sich plötzlich. An den ersten beiden Tagen war die Schleimschicht noch durchlässig für Partikel der Größe von Bakterien und ab Tag 3 dann nicht mehr. Es waren auch an den ersten Tagen trotzdem keine Bakterien an der Schleimhaut zu finden. Die bakterielle Besiedlung findet erst nach circa 2 Tagen nach der Geburt statt, weshalb sie auf die Korrelation der Schleimschichtveränderungen mit dem bakteriellen Kontakt schlossen (JOHANSSON et al., 2024).

2.3.3. Physiologische Hintergründe

Mithilfe der eben beschriebenen Methoden konnte ein klassisches Modell für das Verständnis der Schleimschichten des Magen-Darm-Trakts erstellt werden. Es zeigt sich in den verschiedenen Abschnitten des Magen-Darm-Trakts ein klares Verteilungsmuster der Bakterien in der Schleimschicht sowie definierte Charakteristika der Schleimschicht selbst, wie ihre Anhaftung am Epithel, ihre Durchdringbarkeit für Bakterien und ihre ein- oder zweischichtige Struktur (JOHANSSON et al., 2013). Das Modell wurde durch Untersuchungen an Mäusen, Ratten und teilweise auch dem Menschen erstellt (BERGSTROM und XIA, 2022).

Im Magen finden sich, wie auch im Dickdarm zwei übereinander liegende Schleimschichten. Die Schleimschicht des Dünndarms ist, im Vergleich mit den anderen Abschnitten des Magen-Darm-Trakts, viel dünner, einschichtig, durchlässiger und nicht am Epithel anhaftend. Der Schleim des Dünndarms und des Magens ist für kleinere Partikel der Größe von Bakterien durchdringbar, wohingegen im Dickdarm eine innere wenig bis undurchdringbare Mukusschicht und eine äußere leichter zu durchdringende Schicht aufzufinden sind. Die innere Schleimschicht ist, wie die des Magens, fest an der Epithelzellschicht anhaftend. Dies steht im Unterschied zur Dünndarm-Schleimschicht, die locker aufliegt (ERMUND et al., 2013a).

Durch die leichte Durchdringbarkeit können im Magen und im Dünndarm absorptionsfähige Nahrungsbestandteile das Epithel erreichen und die

Verdauungs- und Absorptionsvorgänge stattfinden. Der ständig neu gebildete Schleim bildet eine Diffusionsbarriere, sodass sehr wenige Bakterien das Schleimhautepithel erreichen und die unteren Kryptregionen nicht erreichen. Die Bakterien werden in diesen vorderen Darmabschnitt durch große Mengen an AMPs und Immunglobulinen, die in die Schleimschicht eingemischt sind, kontrolliert. AMPs der Enterozyten werden im Jejunum allerdings im Vergleich zum Ileum vermindert gebildet. Vor allem im Jejunum finden sich Bakterien in der Schleimschicht. Sie finden dort als kommensale Flora ein Habitat. Diese kommensalen Mikrobiota schützen im Jejunum vor pathogenen Keimen (VAISHNAVA et al., 2011; ERMUND et al., 2013a; BIRCHENOUGH et al., 2023).

Abbildung 8 verdeutlicht die unterschiedlichen Verhältnisse der bakteriellen Besiedlung im Jejunum, Ileum und distalen Kolon. Im Jejunum befinden sich die Mikrobiota in der Schleimschicht auch zwischen den Zotten und finden dort ein „Habitat“. Sie befinden sich trotzdem meist im Abstand zum Epithel. Im Ileum werden die Mikrobiota, durch vermehrte Abgabe von AMPs in diesem Darmabschnitt, hauptsächlich oberhalb der Zottenspitzen, nicht jedoch zwischen den Zotten, gefunden. Im distalen Kolon ist die innere Schleimschicht als bakterienfreie Barriere zu verstehen (BIRCHENOUGH et al., 2023).

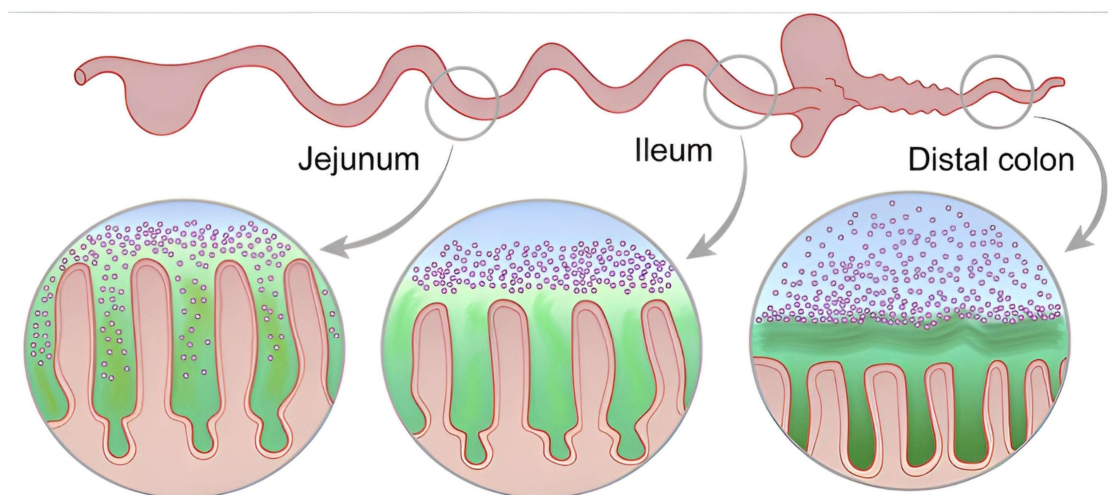


Abbildung 8: Lokalisation der Bakterien in der Schleimschicht im Jejunum, Ileum und distales Kolon, aus BIRCHENOUGH et al. (2023)

Jejunum (links): Bakterien zwischen den Zotten ohne Epithelkontakt in Schleimschicht als „Habitat“, Ileum (mittig): Bakterien oberhalb der Zotten, distales Kolon (rechts): strikte Trennung durch Barrierefunktion der inneren Schleimschicht

Im Dickdarm-Lumen befinden sich, im Gegensatz zum Dünndarm, große Mengen an Bakterien und andere Mikroorganismen. Die Verdauung ist dort, zumindest beim Säugetier, bereits abgeschlossen. Die hohe bakterielle Belastung, sowie die längere Passagezeit in diesem hinteren Darmbereich erfordert einen anderen Schutzmechanismus. Die innere sterile Schicht ist scharf abgegrenzt und bildet dabei eine Art Filter, durch die Bakterien nicht penetrieren können. Die äußere Dickdarmschleimschicht ist dagegen leicht durchdringbar und daher nutzen Bakterien die Oligosaccharide der Muzine als Energielieferanten und finden in dem hier groben Netzwerk aus Muzinen neben einem Habitat auch Nahrung. Die Schleimproduktion im proximalen Kolon kann durch bakterielle Stimulation, im Gegensatz zum distalen Kolon, angeregt werden. Im distalen Kolon findet sich außerdem ein noch dichter undurchdringbarer innerer Schleim im Vergleich zum proximalen Kolon (JOHANSSON et al., 2008; JOHANSSON et al., 2011; JOHANSSON et al., 2014; JAKOBSSON et al., 2015; BERGSTROM und XIA, 2022).

In Abbildung 9 wird das eben beschriebene Modell grafisch dargestellt. Links im Bild ist eine Abbildung des Dünndarms zu sehen, in dem eine dünne Schleimschicht locker Bakterien enthält, die oberflächlich zu finden sind. In der Tiefe der Krypten werden in den Panethzellen, in der Stammzellregion, antibakterielle Substanzen gebildet und im Epithel der Zotten finden sich Becherzellen, die neuen Schleim bilden. Im Dickdarm hingegen, gemäß Darstellung rechts, besteht eine äußere Schleimschicht mit einer Vielzahl von Bakterien. Im Lumen sind Bakterien dargestellt, die Ballaststoffe metabolisieren. Die innere Schleimschicht am Epithel dagegen ist bakterienfrei dargestellt. Zwischen den Zotten wird Schleim gebildet, der einen andersartigen Schleim produziert als die „interkryptalen“ Becherzellen an den Zottenspitzen. Die sogenannten „sentinel GC“ erkennen eine Erhöhung der bakteriellen Belastung und können Becherzellen zu vermehrter Schleimproduktion veranlassen. Dies ist wie schon erwähnt nur im proximalen Kolon der Fall (LUIS und HANSSON, 2023).

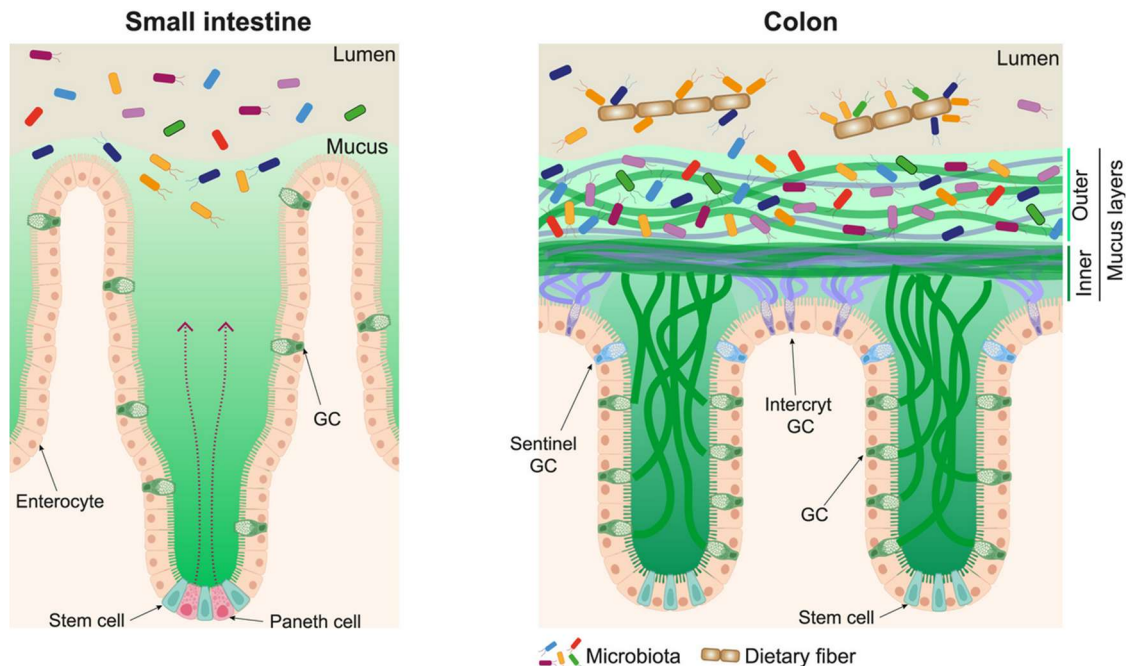


Abbildung 9: Grafische Darstellung des Modells der Schleimschicht im Dünndarm und Dickdarm, aus LUIS und HANSSON (2023)

links: Dünndarm mit Panethzellen, Stammzellen, GC=Becherzellen, Enterozyten, Schleim und Lumen, rechts: Kolon mit Stammzellen, GC:Becherzellen, „Interkryptalen“ Becherzellen, Sentinel (=Wächter-) Becherzellen, innere bakterienfreie und äußere besiedelte Schleimschicht, Lumen mit Mikrobiota und Ballaststoffen

2.3.4. Bisherige Erkenntnisse beim Huhn

Die Schleimschicht wurde bisher, wie schon erwähnt, vor allem an Nagern untersucht und wenig an Menschen (BERGSTROM und XIA, 2022). Beim Huhn existieren bislang noch keine genaueren morphologischen Untersuchungen der Schleimschicht.

Vor allem wurden die Becherzellen selbst sowie der in ihnen enthaltene Schleim dargestellt und untersucht:

So konnten im Rahmen einer Doktorarbeit beim Huhn, mit Formalin-fixierten Präparaten des Darms lektinhistochemisch Mucin-Granula in Becherzellen angefärbt werden. Die Schleimschicht selbst wurde nicht untersucht. Die Zottenspitzen konnten meist deutlicher als das Kryptepithel gefärbt werden (POHLMAYER, 2002).

TSIRTSIKOS et al. (2012a und); TSIRTSIKOS et al. (2012b) untersuchten die

Schleimschicht-Dicke beim Huhn an gefrorenen Darmabschnitten und der AB-PAS-Färbung. Dadurch konnten Dickenmessungen durchgeführt werden. Im Durchschnitt aller Versuchsgruppen wurde bei 14 Tage alten Hühnern im Duodenum 20,48 μm und im Ileum 14,54 μm Die PAS-Färbung färbt allgemein Kohlenhydrate wie Polysaccharide und Glykoproteine. Beispiele sind neutrale Muzine, Zellulose der Pflanzenzellen, Glykogen, Glykolipide, Basalmembranen oder Pilzhypen. Der chemische Hintergrund besteht darin, dass die Periodsäure eine Oxidation der 1,2-Glykol-Gruppen zu Aldehyden bewirkt, an die im Anschluss Sulfit des Schiffschens Reagens (fuchsin-schweflige Säure) binden kann. Dadurch wird Fuchsin freigesetzt und erzeugt eine leuchtend rote bis magentafarbene Farbe und bei den 42 Tage alten Hühnern im Duodenum 20,4 μm , im Ileum 21,5 μm und im Zäkum 15,94 μm gemessen. Die Forschenden vermuten, dass die Schleimdicke stärker von der Lokalisation auf der Zotte als vom Alter oder dem Darmabschnitt abhängt, da diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede gemessen wurden (TSIRTSIKOS et al., 2012a). Eine ähnlich aufgebaute Studie erbrachte bei den 14 Tage alten Hühnern im Duodenum 16,98 μm und im Ileum 20,62 μm und bei 42 Tage alten Hühnern im Durchschnitt im Duodenum 17,24 μm , im Ileum 20,42 μm und im Zäkum 17,64 μm (TSIRTSIKOS et al., 2012b).

REYNOLDS et al. (2020) erforscht die Becherzell-Dichte im Dünndarm beim Huhn vor dem Schlupf und einigen Tage nach dem Schlupf mit Formalin-fixierten Präparaten. Diese Proben wurden mit einer kombinierten PAS-AB-Färbung behandelt. Des Weiteren erfolgte eine Immunfluoreszenz mit MUC2-Antikörpern und eine Gegenfärbung mit DAPI. Dadurch wurden die Becherzellen sichtbar. Die Schleimschicht wurde nicht dargestellt. In dieser Studie erfolgte die Becherzell-Zählung mithilfe von ImageJ (REYNOLDS et al., 2020).

Beim Huhn konnte, in einer Untersuchung 2021 durch Immunfluoreszenz- mit Anti-Mucin-5ac-Antikörpern in Formalin-fixierten Zellkulturen von Enteroiden (Enterozyten) eine Anfärbung der Becherzellen erreicht werden. Die Untersuchung dient der genauen Untersuchung der Schleimhautzellen. Die Schleimschicht selbst konnte nicht dargestellt werden (NASH et al., 2021). Eine weitere Veröffentlichung von 2021, die wie die zuvor erwähnte der School of Veterinary Studies, University of Edinburgh entstammt, nutzte ebenfalls das

Enteroid-Modell. Auch sie nutzten einen Anti-MUC5ac-Antikörper Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung der Becherzellen (ORR et al., 2021).

2022 untersuchte eine Forschungsgruppe die Morphologie der Schleimhaut. Auch hier wurde die Schleimschicht auf Grund einer Formalin-Fixierung nicht mit untersucht. Die Proben wurden mit den Schleimfärbungen Muzikarmin und PAS-AB behandelt. Außerdem wurden Immunfärbungen mit Anti-MUC2 und MUC13-Antikörpern benutzten (NABI et al., 2022)

2.4. Chemische Grundlagen

2.4.1. Einteilung und Genfamilie der Muzine

Muzine sind eine heterogene Gruppe von Glykoproteinen mit einer hohen Molekülmasse. Diese Makromoleküle bestehen aus einem zentralen Protein mit hunderten daran gebundenen Oligosaccharid-Seitenketten. Der Kohlenhydratanteil hat mit circa 80% seiner Trockenmasse, den Hauptanteil (LAMBLIN et al., 1992; HERRMANN et al., 1999; STRUWE et al., 2015; HANSSON, 2020; HE et al., 2023).

Die Gruppe der Muzine wird heute chemisch in zwei funktionell unterschiedliche Hauptgruppen unterteilt: in sekretierte und membrangebundene Muzine. Die sekretierten Muzine werden wiederum in gelbildende und lösliche Muzine unterteilt. Im Detail wurden Muzine, die keine transmembranen Sequenzen im Genom aufweisen, als sekretierte definiert. Unter den sekretierten Muzinen jene, die ihre Proteinketten zu Polymeren verbinden als Gelbildende und jene, die Monomere bleiben als Lösliche definiert (HANSSON, 2020; YAMAGUCHI und YAMAMOTO, 2023). Die genaue Aufgabe der löslichen Muzine ist noch weitgehend unklar (THORNTON et al., 2008; JANICKA-KŁOS et al., 2020; COX et al., 2023). Im Genom des Huhns konnten sie bisher nicht identifiziert werden (LANG et al., 2006).

Es existieren viele verschiedene Epithelzelltypen, die in der Lage sind, gelbildende Muzine zu sekretieren. Somit sind unter anderem die Epithelzelloberflächen der Schleimhäute des Verdauungs-, Atmungs- und Urogenitaltrakts von einer Schleimschicht bedeckt. Aber auch sekretorische epitheliale Zellen der Speicheldrüsen, der Tränendrüsen (HE et al., 2023) des Pankreas, der Gallenblase oder der Nieren sind dazu befähigt gelbildende

Muzine zu bilden (LEROY et al., 2002; WANG et al., 2020; KUMAR et al., 2022).

Die transmembranen (auch: membrangebundenen) Muzine (TMM) werden generell nicht sekretiert, bleiben stattdessen mit der Zellmembran verbunden und bilden mit ihren extrazellulären Anteilen die Glykokalix dieser Zellen. Somit sind sie nicht an der Bildung des Schleims beteiligt, liegen mit ihm, als Teil der Glykokalix der Enterozyten des Darms, allerdings in direktem Kontakt (LANG und PELASEYED, 2022).

Die Mitglieder der Muzin-Genfamilie werden, unabhängig von ihrer funktionellen Einteilung, anhand der Bezeichnung MUC und einer nachfolgenden Zahl benannt. Einzelne Muzine wurden danach noch mit A, B oder AC versehen (LANG und PELASEYED, 2022; COX et al., 2023).

Viele der menschlichen Muzine besitzen homologe Gene bei anderen Tierarten. Genetische Vergleiche verschiedener Tierarten zeigten, dass gelbildende Muzine evolutionär frühe Ursprünge besitzen. Sie wurden bereits bei niedrigen Tierarten wie der Seeanemone, Schwämmen oder Rippenquallen nachgewiesen. Anders bei den TMM, die nur beim Menschen in hoher Anzahl zu finden sind. Es scheint sie ausschließlich bei höheren Wirbeltieren und manche auch nur beim Säugetier zu geben (LANG et al., 2004; LANG et al., 2006, 2007; LANG et al., 2016).

Im Genom des Huhns wurden bisher 4 gelbildenden Muzine, MUC2, MUC5ac, MUC5b und MUC6 und 3 TMM, MUC4, MUC13 und MUC16 identifiziert (LANG et al., 2006).

Die vier gelbildenden Muzine MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 finden sich beim Menschen und bei der Maus auf einem Gencluster auf Chromosom 11 bzw. Chromosom 7 (PIGNY et al., 1996; ESCANDE et al., 2004). Auch beim Huhn konnten sie auf einem Cluster, auf Chromosom 5, gefunden werden. Die Reihenfolge und Ableserichtung der einzelnen Gene im Gencluster ist beim Huhn und dem Menschen identisch. Allerdings befindet sich speziell beim Huhn ein zusätzliches Gen zwischen MUC2 und MUC5AC, dass die α -Untereinheit des Ovomucins kodiert. Dieses Gen existiert bei Säugetieren nicht. Ovomucin stellt einen bedeutsamen Inhaltsstoff des Eiweißes dar, der dessen gelartige Struktur bedingt. Die β -Untereinheit des Ovomucins ist das homologe Gen des menschlichen MUC6 (LANG et al., 2006).

Die Expressionsmuster der verschiedenen gelbildenden Muzine sind im Verdauungstrakt bei verschiedenen Tierarten generell ähnlich (LANG et al., 2016). Im Dün- und Dickdarm ist MUC2 auch beim Huhn das bedeutsamste gelbildende Mucin (YU et al., 2014; ZHANG et al., 2015). MUC2 wird im Proventrikulus, Jejunum, Ileum, Kolon und den Zäkaltonsillen in großen Mengen exprimiert und in niedrigen Mengen auch im Kropf und dem Ventrikulus (JIANG et al., 2013). MUC5ac-Glykoproteine konnten in hohen Mengen im Proventrikulus und in geringeren im Dünndarm von Hühnern nachgewiesen werden (SMIRNOV et al., 2004). Auch die Genexpression von MUC5ac wurde im Jejunum von Hühnern nachgewiesen. In der gleichen Untersuchung konnte auch MUC2, nicht jedoch MUC5b, nachgewiesen werden (FORDER et al., 2012).

Beim Huhn wurden bisher, wie schon erwähnt, die TMM MUC4, MUC13 und MUC16 entdeckt (LANG et al., 2006). An Jejunum-Proben bei Hühnern wurde die Genexpression des TMM MUC13 nachgewiesen, nicht jedoch MUC1, MUC4 oder MUC16 (FORDER et al., 2012).

2.4.2. Proteingrundgerüst der gelbildenden Muzine

Laut Definition enthält die Peptidkette aller Muzine, die von Mucin-Genen codiert werden, mindestens einen langen Abschnitt im Protein, der gehäuft die 3 Aminosäuren Prolin, Threonin und Serin enthält und spezifische Sequenzwiederholungen aufweist, die sog. Tandem repeats. Dieser Bereich im Protein wird auch PTS-Domäne, Mucin-Domäne oder „variable number of tandem repeat“ (VNTR) Region genannt. Dort findet die o-glykosidische Bindung der Kohlenhydratseitenketten statt (LAN et al., 1990; LANG et al., 2007). Die spezifische Aminosäuresequenz und die Anzahl der tandem repeats in der PTS-Domäne ist äußerst variabel zwischen den einzelnen Mucin-Genen und zwischen homologen Mucinen verschiedener Tierarten. Im selben Mucin variiert in der Regel lediglich die Aminosäuresequenz der tandem repeats (HOLLINGSWORTH und SWANSON, 2004; LANG und PELASEYED, 2022).

Das Proteingrundgerüst des gelbildenden Mucins MUC2 ist beim Huhn mit 3.697 Aminosäuren von besonderer Länge (JIANG et al., 2013). Die gelbildenden Muzine besitzen auch beim Huhn neben einer oder mehrerer zentraler PTS-Domänen außerdem von Willebrand D-Domänen (VWD), eine

Cystein reiche-Domäne (CysD) und eine Cysteine-knot-Domäne (CK) am C-terminalen Ende. Das beim Huhn einzigartige Ovomuzin besitzt als Besonderheit keine PTS-Domänen (LANG et al., 2006). Studien bei verschiedenen Tierarten konnten starke Sequenzhomologien der gelbildenden Muzine an den c- und n-terminalen Enden des Proteins auffinden, wobei die PTS-Domänen spezifisch für jedes Muzin und auch für jede Tierart sind (ESCANDE et al., 2004). Auch beim Huhn ist dies der Fall, so unterscheidet sich MUC2 gerade in der PTS-Domäne, an der die o-glykosidische Bindung der Kohlenhydratseitenketten stattfindet, enorm von homologen Genen des Menschen oder der Maus (JIANG et al., 2013).

2.4.3. O-Gykane der gelbildenden Muzine

In den Muzin-Glykoproteinen überwiegt der Kohlenhydratanteil bezogen auf das Gewicht. Das MUC2-Molekül zum Beispiel besteht zu über 80% aus Glykanen (BERGSTROM und XIA, 2022).

Diese Kohlenhydratseitenketten sind dabei von grundlegender Bedeutung für die Struktur und die Eigenschaften der Muzine. Sie unterstützen die korrekte Faltung und Stabilität der Proteine und schützen diese gegen Abbau durch Proteasen und anderen schädliche Substanzen. Außerdem bedingen sie die hohe Wasserbindungskapazität der Moleküle, was den gelartigen Charakter des Schleims bedingt. Sie sind, vor allem im Dickdarm, Ziele bakterieller Adhäsion und Chemotaxis und stellen für die ansässige Mikroflora eine potenzielle Kohlenhydratquelle dar (LIS und SHARON, 1993; VAN KLINKEN et al., 1995; HANSSON, 2020; SURIANO et al., 2022).

Die Bandbreite der chemischen Zusammensetzung und Strukturen, die durch die o-glykosidisch verbundenen Oligosaccharid-Ketten entstehen können, sind immens. Das erklärt die große Heterogenität der Muzine. Somit kann auch die Tatsache erklärt werden, dass das gleiche Muzin-Gen, in unterschiedlichen Lokalisationen des Körpers, ein Glykoprotein mit unterschiedlichen Eigenschaften erzeugen kann (HOLLINGSWORTH und SWANSON, 2004).

Ein hoher Anteil an den terminalen Gliedern der Oligosaccharide ist mit Sialinsäure- und Sulfatgruppen-Resten versehen. Diese sind hauptverantwortlich für die negative Ladungsdichte der Muzine. Dies bedingt

die Wasserbindungskapazität der Glykoproteine (MONCADA et al., 2003). Deshalb werden Muzine aufgrund des Ladungszustandes ihrer Kohlenhydratseitenketten traditionell in neutrale und saure Subtypen unterteilt. Die sauren Muzine beinhalten die eben genannten negativ geladenen Sulfomuzine und Sialomuzine, sowie Mischtypen aus beiden. Neutrale Muzine enthalten andere terminale Endglieder, wie Fucose, Mannose oder Galaktose (DUANGNUMSAWANG et al., 2021).

Die Sialylierungs- und Sulfatierungsmuster sind jeweils spezifisch für die individuelle Becherzelle, den jeweiligen Darmabschnitt oder die Tierart (MCGUCKIN et al., 2011). Die physiologische Bedeutung der Unterteilung in neutrale und saure Muzine ist nicht sicher geklärt, wobei angenommen wurde, dass die negativ geladenen Gruppen einen zusätzlichen Schutz vor enzymatischem Abbau durch Bakterien bilden (MONCADA et al., 2003; UNI et al., 2003). Dabei ist allerdings festzuhalten, dass viele Bakterien starke Sialidase und Sulfatase Aktivitäten besitzen und somit auch diese Glykane aufspalten können (DUANGNUMSAWANG et al., 2021).

Die Gruppen können mithilfe von molekularbiologischen Methoden bestimmt werden (STRUWE et al., 2015).

Beim Huhn wurde 2015 die O-Glykanstruktur der Muzine an verschiedenen Darmabschnitten durch massenspektrometrische Verfahren untersucht. Im Vergleich zum Menschen konnten, wie in Abbildung 10 aufgelistet, deutliche Unterschiede in der Art der Glykane gefunden werden. Ein auffallendes Charakteristikum ist die vermehrte Muzin-Sulfatierung im gesamten Verdauungstrakt beim Huhn. Neutrale Glykane vertreten beim Huhn insgesamt einen geringen Anteil und dies ganz besonders im Zäkum und unterschreiten die relativen Werte beim Menschen deutlich. In den Blinddärmen finden sich wesentlich mehr sulfatierte und weniger sialylierte Glykane im Vergleich zu Dünn- und Dickdarm. Im Dickdarm des Huhns wurde in der Untersuchung die größte Heterogenität der identifizierten O-Glykane mit der größten strukturellen Vielfalt gefunden, gefolgt von Dünndarm und den Blinddärmen (STRUWE et al., 2015). Anders als bei den menschlichen Proben, die im Zäkum und Ileum die größte Heterogenität und im Dickdarm die niedrigste zeigten. Einige Glykane des Huhns wurden beim Menschen zuvor noch nie identifiziert (LARSSON et al., 2009; STRUWE et al., 2015).

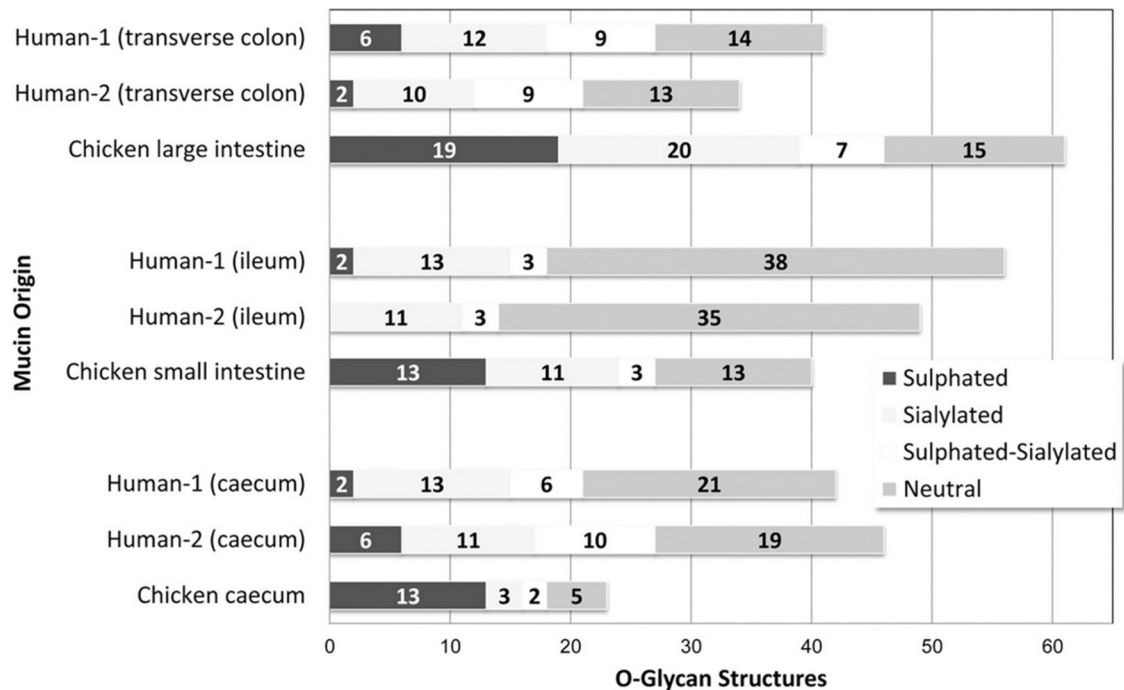


Abbildung 10: Verhältnis neutraler, sulfatierter, sialylierter und gemischt sulfatierter/sialylierter Muzine beim Huhn und dem Menschen in verschiedenen Darmbereichen aus STRUWE et al. (2015)

Diese Einordnung der Muzin-Glykane erfolgte zudem mithilfe spezieller histochemischer Färbemethoden. PAS-Färbung ist besonders geeignet für neutrale Muzine und ergibt eine magenta- bis rosa Farbe. Alcianblau (AB) dient zur Unterscheidung von sauren Muzinen; bei zwei pH-Werten (pH 1,0 und pH 2,5) lassen sich Sulfo- und Sialomuzine unterscheiden, jeweils mit blauer Farbgebung in unterschiedlicher Intensität. Mucicarmin kann ebenfalls zur Färbung saurer Muzine verwendet werden und erzeugt eine rote Färbung (RIEDELSEIMER und BÜCHL-ZIMMERMANN, 2015; OSHO et al., 2017). Eine weitere Färbekombination die oft zur Differenzierung der Sulfo- und Sialomuzine verwendet wird ist High-Iron-Diamine mit AB 2.5 (CHELED-SHOVAL et al., 2014).

Traditionell wurden die Becherzellen mit den genannten Färbungen teils in Kombination oder auch einzeln untersucht, um die prozentualen Verhältnisse zwischen den neutralen und negativ geladenen Muzinen zu bestimmen. Allerdings ist zu beachten, dass auch innerhalb einer Becherzelle unterschiedlich geladene Muzine existieren und daher die Färbung lediglich die Tendenz zur neutralen oder sauren Richtung anzeigt (DERRIEN et al., 2010;

DUANGNUMSAWANG et al., 2021).

Die oben genannten histochemischen Schleimfärbungen zur Differenzierung der Becherzellen in neutrale oder saure und von letzteren in sulfatierte, sialylierte und gemischt sulfatiert-sialylierte Becherzellen wurden in verschiedenen Untersuchungen bei Hühnern bestimmt.

UNI et al. (2003) fanden in der späten Embryogenese bis 7 Tage nach dem Schlupf im Duodenum, Jejunum und Ileum fast ausschließlich AB-positive saure Becherzellen und keine bis nur maximal 1% PAS-positive neutrale Becherzellen (UNI et al., 2003).

YU et al. (2014) untersuchte Darmproben des Duodenums, Jejunum und Ileum von Hühnerembryonen noch vor dem Schlüpfen am Tag 15, 18 und 21 der Inkubation. Am Tag 15 der Inkubation wurden ausschließlich wenige AB-positive, saure Becherzellen gefunden, die vor allem den sulfatierten Typ enthielten. Am Tag 18 nach Inkubation wurden auch PAS-positive Becherzellen, neben AB- und AB- /PAS- positiven Becherzellen detektiert. Die PAS-positiven Zellen schienen zu diesem Zeitpunkt zu prädominieren. Die meisten der sauren Becherzellen waren dabei sulfatiert mit wenigen sialylierten oder Mischtypen. Am Tag 21 der Inkubation waren wieder weniger PAS positive Becherzellen zu finden. Die AB- und PAS-positiven Zellen waren nun am meisten zu finden. Zu diesem Zeitpunkt waren wiederum weniger sulfatierte Becherzellen nachweisbar. Sie erschienen allerdings gegenüber den sialylierten oder Mischtypen immer noch überrepräsentiert zu sein (YU et al., 2014).

FORDER et al. (2007) untersuchten Proben des Jejunums und Ileums, 1, 4 und 7 Tage nach dem Schlupf bei normal gehaltenen und unter niedriger bakterieller Belastung gehaltenen Hühnern. Die Anzahl der neutralen und sauren Becherzellen war ohne signifikante Unterschiede bei den verschiedenen Gruppen und waren in circa gleichen Mengen vorhanden. In beiden Gruppen konnte im Jejunum von Tag 1 bis 4 nach dem Schlupf ein leichter Abfall der sauren Becherzellen dargestellt werden, wonach diese bis Tag 7 wieder auf das Ausgangsniveau anstiegen. Im Ileum konnte bei den konv. gehaltenen Hühnern derselbe Trend beobachtet werden. Im Ileum war zudem insgesamt eine größere Anzahl an sauren Muzinen im Vergleich zum Jejunum nachweisbar. Am Tag 1 nach dem Schlupf waren alle Becherzellen vom sulfatierten Untertyp,

wonach von diesen am Tag 4 auch sialylierte nachweisbar waren und dies vor allem vermehrt in der konv. Gruppe. Am Tag 7 war dies noch offensichtlicher, die Anzahl der sulfatierten Muzine war vor allem in der konv. Gruppe im Vergleich zu den sialylierten noch geringer. Die konv. Gruppe schien insgesamt mehr sialylierte und weniger sulfatierte Becherzellen zu haben. Die Mischtypen nahmen in beiden Gruppen von Tag 1 bis Tag 4 an Anzahl zu. Wobei an Tag 7 deren Anzahl bei der konv. Gruppe erhöht war (FORDER et al., 2007).

Auch CHELED-SHOVAL et al. (2014) verglichen Proben von konv. gehaltenen Hühnern mit Hühnern, die unter geringer bakterieller Belastung standen, sowie solchen, die GF gehalten wurden. Bei diesen wurden im Alter von 7 Tagen nach dem Schlupf Ileum- und Zäkum-Proben untersucht. Im Ileum zeigte sich bei den Hühnern unter niedriger bakterieller Belastung insgesamt eine geringere Anzahl und Dichte von neutralen und sauren Becherzellen. Unter den sauren Becherzellen waren bei ihnen die sulfatierten Becherzellen überrepräsentiert, was auf eine unreife Schleimhaut hindeutet, im Vergleich zur konventionell gehaltenen Gruppe. Nur bei den konventionell gehaltenen Hühnern wurden sialylierte Becherzellen gefunden, die eine reife Schleimhaut anzeigen. Die Mischtypen sialyliert und sulfatierte Becherzellen traten bei den bakteriell weniger belasteten Hühnern seltener auf. Im Zäkum wurden andere Ergebnisse beobachtet: Dort fanden sich bei den Gruppen mit geringerer bakterieller Belastung im Vergleich zur konventionell gehaltenen Gruppe mehr neutrale und saure Becherzellen. Die sulfatierten Becherzellen waren bei den unter niedriger bakterieller Belastung gehaltenen Hühnern vermehrt vorhanden; bei den GF-Hühnern war die Sulfatierung geringer als bei den konventionell gehaltenen Hühnern (CHELED-SHOVAL et al., 2014).

2.4.4. Synthese, Sekretion Degradation des Schleims

Gel-bildende Muzine besitzen die Fähigkeit Schleim zu bilden, indem sich die einzelnen Muzin-Peptidketten miteinander verknüpften und somit ein dreidimensionales Grundgerüst bilden, das zusammen mit einem hohen Grad an Glykosylierung den viskösen gelartigen Charakter des Schleims ergibt (GALLEGO et al., 2023). Transmembrane und Lösliche Muzine sind im Gegensatz dazu nicht zur Polymerisation ihrer Proteinmonomere befähigt (HANSSON, 2020). Daher enthält der Herstellungsprozess der gelbildenden

Muzine zwei Oligomerisationsschritte (AXELSSON et al., 1998; GODL et al., 2002). Die o-glykosidische Bindungsstelle der Kohlenhydratseitenketten findet sich wie bei allen Muzinen in der zentralen PTS-Domäne (HOLLINGSWORTH und SWANSON, 2004), während die Polymerisation der einzelnen Muzin-Monomeren an Cystein-reichen Bereichen des Proteins an dessen C- und N-Terminus, durch Disulfidbrückenbindungen ermöglicht wird (MCGUCKIN et al., 2011).

Die Synthese der gelbildenden Muzine geschieht in den Zellorganellen der Becherzellen (AXELSSON et al., 1998; GERKEN et al., 2002; GODL et al., 2002; MCGUCKIN et al., 2011; BENNETT et al., 2012; HE et al., 2023; LUIS und HANSSON, 2023; SONG et al., 2023).

Die reifen Muzin-Multimere werden in dicht komprimierte membranumgrenzte Muzin-Vesikel gepackt und in das Zytoplasma der Becherzellen abgegeben (CORFIELD, 2015).

Die Abgabe der Muzine an das Darmlumen geschieht durch Exozytose. Dabei werden die membranumgrenzten Vesikel mithilfe des Zytoskeletts an die apikale Zellmembran gezogen, um dort mit dieser zu verschmelzen und ihren Inhalt an das Lumen des Darms zu entleeren. Dies ist immer ein Kalziumionen-abhängiger Prozess. Parallel dazu wird Hydrogenkarbonat durch einen cAMP-abhängigen Prozess ebenfalls in das Darmlumen abgegeben. Dies ist für die korrekte Ausbildung der Viskosität des Schleims im Darmlumen wichtig (YANG et al., 2013b; SONG et al., 2023).

Unter normalen Bedingungen ist eine stetige basale Sekretion einzelnen peripher gelegener Schleim-Tröpfchen zu beobachten. Dabei handelt es sich um eine kontinuierliche Freisetzung der Vesikel (NEUTRA et al., 1977). Diese sogenannten Baseline-Sekretion wird durch eine konstante, langsame Kalziumionen-Ausschüttung aus dem endoplasmatischen Retikulum in der Becherzelle selbst induziert. Sie sichert die ständige Erneuerung der Mukusschicht und ist fundamental für die Integrität der Schleimschicht als Barriere (SONG et al., 2023).

Des Weiteren gibt es noch eine durch exogene Stimuli induzierte Sekretion (SPECIAN und NEUTRA, 1980). Ausgelöst wird diese Form der Exozytose

durch einen „massiven Kalziumionen-Influx“. Je nach Stimulus kann hierbei noch zwischen der konstitutiven und impulsiven Sekretion unterschieden werden. Die konstitutive Exozytose wird hauptsächlich durch mechanische Stimuli, wie durch die Peristaltik und Darminhalt ausgelöst, die impulsive Exozytose durch starke Entzündungsprozesse, wie einer bakteriellen Besiedlung der Epithelzellschicht. Letztere ist auch als „compound exocytosis“ bekannt und charakterisiert durch eine massive und schnelle Freisetzung aller Schleim-Vesikel in den Becherzellen (SONG et al., 2023).

Speziell im Dünndarm wird außerdem noch ein spezielles Enzym, Meprin β , benötigt, um MUC2 vor der Abgabe in das Darmlumen von den Becherzellen zu lösen. Dies konnte an Meprin β defizienten Mäusen gezeigt werden, bei denen die Schleimschicht an der Schleimhaut angehaftet bleibt. Durch bakteriellen Kontakt wird Meprin β von der Membranverankerung gelöst und in das Darmlumen abgegeben, um MUC2 wiederum von den Becherzellen zu lösen (SCHÜTTE et al., 2014). Auch im Kolon werden Meprine gebildet. Meprin α und Meprin β bilden dort Heterodimere, die mit dem Substrat Galactin-3 das Gleichgewicht des Mikrobioms maßgeblich beeinflussen können (BÜLCK et al., 2023).

Nach Sekretion und Hydratation der stark gefalteten Muzine der Vesikel, bilden sie im Darmlumen nach massiver Volumenexpansion planare Netzwerke und formen die Schleimschicht (CORFIELD, 2015).

Reguliert wird die Stärke der Schleimproduktion durch und im komplizierten Zusammenspiel mit dem Immunsystem, dem enteralen, autonomen und zentralen Nervensystem, dem enteroendokrinen System, der Fütterung oder Ernährung und des individuellen Mikrobioms (BOHORQUEZ et al., 2015; CARABOTTI et al., 2015; HE et al., 2023).

Die intestinale Mukusschicht besteht im ständigen dynamischen Wandel zwischen Sekretion und Degradation. Sie wird kontinuierlich mechanisch zum Beispiel durch peristaltische Wellen oder Ingesta sowie enzymatisch vor allem durch Bakterien abgetragen (CARRINGTON et al., 2012).

Es existieren zahlreiche intestinale Bakterien, die durch konstitutiv oder kohlenhydrataktiven Enzymen in der Lage sind, Muzin-Glykane vollständig oder partiell abzubauen. Die freigesetzten Oligosaccharide können von den

Bakterien anschließend als Energiequelle genutzt werden (LUIS et al., 2023; RABA und LUIS, 2023; YAMAGUCHI und YAMAMOTO, 2023).

2.4.5. Erkenntnisse zur Schleimproduktion beim Huhn

Beim Huhn beginnt die Genexpression von MUC2, wie Abbildung 11 zeigt, in der späten Embryogenese und steigt kontinuierlich bis kurz vor dem Schlupf massiv an, um danach weiter auf konstantem niedrigerem Niveau anzusteigen. Im Jejunum sinkt die MUC2-Genexpression nach dem Schlupf kurzzeitig sogar ab (JIANG et al., 2013). Diese Ergebnisse stimmen mit einer anderen Untersuchung zur MUC2-Genexpression überein, wie Abbildung 12 illustriert. Die Forschenden dieser Veröffentlichung betonen, dass kurz vor dem Schlupf eine deutliche Zunahme der MUC2-Expression beobachtet wird, die danach wieder weniger stark ansteigt (ZHANG et al., 2015). Generell zeigt dabei die Genexpression von MUC2 einen Anstieg erstens mit dem Alter und zweitens von vorne nach hinten im Dünndarm. Im Duodenum war sie am wenigsten, gefolgt vom Jejunum und dem Ileum, das, ausschließlich auf den Dünndarm bezogen, die stärkste Expression aufweisen konnte (JIANG et al., 2013; YU et al., 2014).

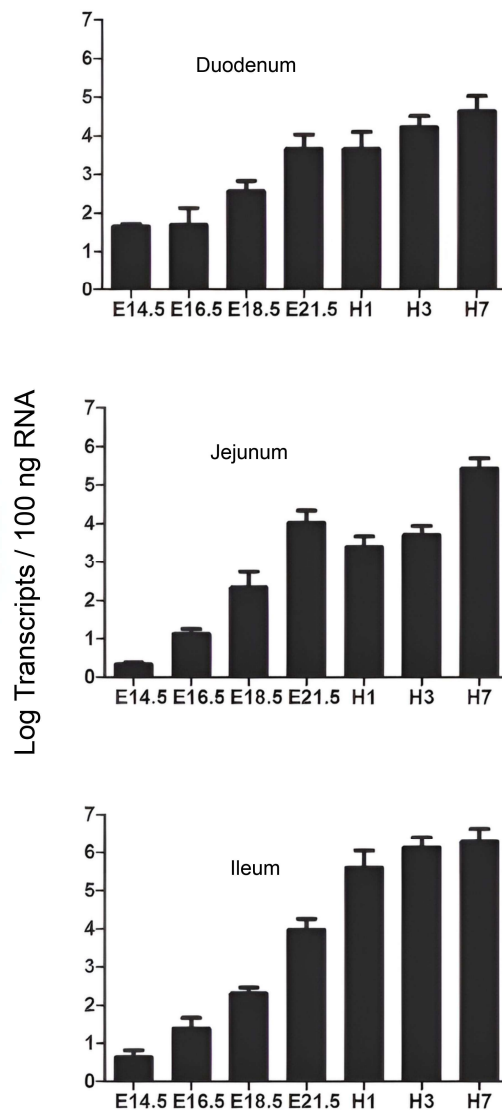


Abbildung 11: Menge der Expression von MUC2-Transkripten beim Huhn, in der Embryonalphase (E) und nach dem Schlupf (H), im Duodenum (oben), im Jejunum (Mitte) und im Ileum (unten) aus JIANG et al. (2013)

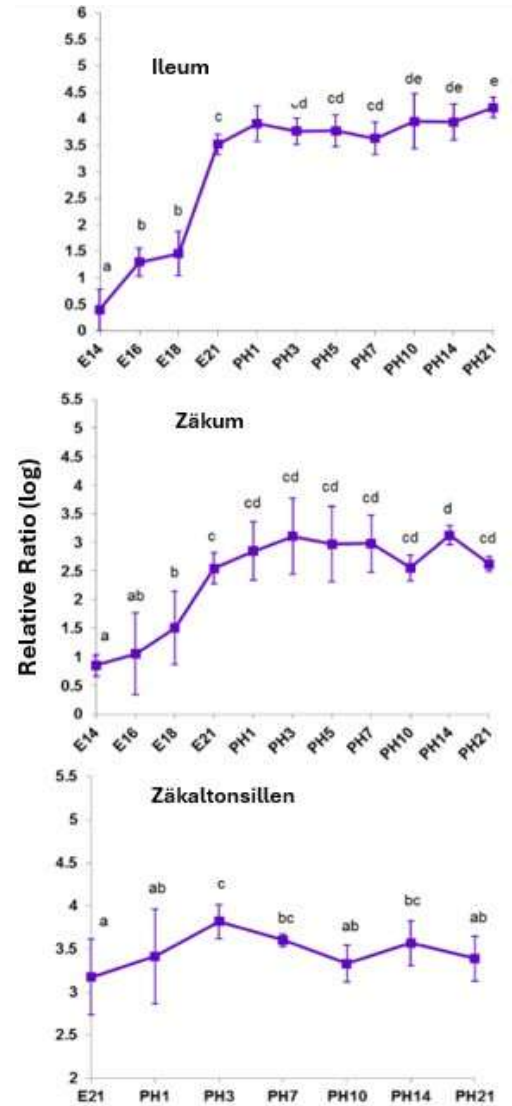


Abbildung 12: Relative MUC2-mRNA-Expressionsniveaus beim Huhn Embryonaltag (E), nach dem Schlupf (PH), im Ileum (oben), Zäkum (Mitte) und Zäkaltonsillen (unten) aus ZHANG et al. (2015)

Diese Ergebnisse korrelieren gut mit Untersuchungen, die die Anzahl der Becherzellen in bestimmten Altersstufen und Darmabschnitten beim Huhn untersuchten. Auch hier konnte beobachtet werden, dass die Becherzellichte im Dünndarm der Hühner weiter kaudal immer höher wird. Auch hier im Duodenum die Niedrigste, gefolgt vom Jejunum und die Höchste im Ileum. Und auch bei der Becherzell-Zählung konnte ein starker Anstieg kurz vor dem Schlupf beobachtet werden (UNI et al., 2003).

Auch REYNOLDS et al. (2020) konnte zeigen, dass die Anzahl der Becherzellen

pro Fläche Darmschleimhaut ein dem Alter des Tieres und der Lokalisation im Darmtrakt entsprechendes Muster aufweist. Im Duodenum ist, laut ihren Untersuchungen, die Becherzell-Dichte nach dem Schlupf konstant. Im Jejunum und Ileum steigt diese nach dem Schlupf noch an (REYNOLDS et al., 2020). Auch ALIK und ERGÜN (2015) kamen zu dem Ergebnis, dass die Anzahl der Becherzellen im Jejunum und Ileum ab Tag 7 bis Tag 21 und Tag 42 nach dem Schlupf kontinuierlich weiter ansteigt (CALIK und ERGÜN, 2015).

Für den Anstieg der Becherzelldichte, vor allem im Jejunum und Ileum nach dem Schlupf, wurde die bakterielle Belastung und der Kontakt mit Ingesta nach dem Schlupf in Zusammenhang gebracht (FORDER et al., 2007; PROSZKOWIEC-WEGLARZ et al., 2020). Im proximalen Teil des Dünndarms, dem Duodenum, ist die Absorption am wichtigsten und genau hier ist die Passage der Ingesta besonders schnell. In den hinteren Dünndarmabschnitten dagegen ist die Passagezeit der Ingesta viel langsamer und die bakterielle Belastung daher höher. Es wurde angenommen, dass aus den eben genannten Gründen, im Duodenum eine geringere Becherzelldichte im Vergleich zum Jejunum und Ileum vorhanden ist (SVIHUS und ITANI, 2019; DUANGNUMSAWANG et al., 2021).

Des Weiteren wurden in einer Untersuchung Becherzellen im Zäkum gezählt. Dort konnten im proximalen, mittleren und distalen Abschnitt schon am 18. Tag der Embryonalentwicklung einzelne Becherzellen nachgewiesen werden, die nach dem Schlupf stark in ihrer Zahl zunehmen (KOÇAK und ÖZAYDIN, 2023).

2.5. Alterationen bei gnotobiotischen Tieren

Vor allem bei GF gehaltenen Mäusen wurde über die veränderten intestinalen Schleimeigenschaften geforscht. Im Ileum wurde bei GF Mäusen ein fest am Epithel verankerter Schleim gefunden. Dies steht im Gegensatz zu den normal gehaltenen Tieren, bei denen er locker aufsitzend und leicht zu aspirieren war (JOHANSSON et al., 2015). Als Grund dafür wird die Notwendigkeit der bakteriellen Aktivierung eines Enzyms Meprin β , das für die Anhaftung und Lockerung des Schleims von dem Dünndarm-Epithel zuständig ist, verantwortlich gemacht. Dies führt dazu, dass MUC2 an den Becherzellen verankert bleibt und die Schleimschicht nicht mehr so viskös und mehr anhaftend an der Schleimhaut ist (SCHÜTTE et al., 2014).

Außerdem zeigte sich bei GF Mäusen eine dünnere innere Schleimschicht des Kolons, die stärker permeabel gegenüber Bakterien war; die MUC2-Menge war vermindert, und das Glykosylierungsprofil wies Abweichungen im Vergleich zu konventionell gehaltenen Artgenossen auf (JOHANSSON et al., 2015). Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Darmbakterien an der Expression bestimmter Glycosyltransferasen beteiligt sind, die die MUC2 O-Glykosylierung katalysieren. Daher sind die MUC2 O-Glykane des Kolons von konv. Mäusen vermehrt sialyliert, fucosyliert und länger im Vergleich zu GF Mäusen (ARIKE et al., 2017). Nach Besiedlung mit Bakterien dauerte es circa fünf bis sechs Wochen bis sich die physiologischen Schleimeigenschaften im Ileum und Kolon einstellten (JOHANSSON et al., 2015).

Neuere Untersuchungen befassen sich mit Veränderungen der Schleimschicht bei Mäusen, die unter „Bauernhof-ähnlichen Bedingungen“ gehalten wurden. Die Mäuse wurden in einer mikrobiell erhöht belasteten Umgebung aufgezogen, unter anderem mit natürlicher Einstreu aus Erde und Kot von Nutztieren. Im Vergleich zu Mäusen, die in normalen sauberen Laborkäfigen gehalten wurden, zeigten sich morphologisch keine Unterschiede der Schleimschicht im Kolon und Ileum zwischen den Gruppen. Das bedeutet, dass Dicke der Schleimschicht, Durchlässigkeit für kleinste Partikel in der Größe von Bakterien sowie Wachstumsraten der Schleimschicht keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. Allerdings wurden verschiedene Gene und Proteine identifiziert, die an der Schleimschichtbildung sowie an antimikrobiellen oder entzündlichen Prozessen beteiligt sind. Auch die Zusammensetzung der Mikrobiota unterschied sich, insbesondere im Blinddarm. Folglich schlussfolgern die Wissenschaftler, dass die Schleimschicht bei den unter „Bauernhof-ähnlichen Bedingungen“ gehaltenen Tieren eine robuste Barrierefunktion aufweist (ARNESEN et al., 2023). Bereits frühere Untersuchungen zeigten zudem, dass Mäuse unter „Bauernhof-ähnlichen Bedingungen“ eine geringere Anfälligkeit für kolorektale Adenokarzinome aufweisen im Vergleich zu Artgenossen unter Laborbedingungen (ARNESEN et al., 2021).

Im Dickdarm bei Mäusen wurden, wie auch schon im Dünndarm beschrieben, Meprine gefunden. Dabei bildet Meprin α und Meprin β ein Heterodimer, das Galctin-3 spaltet und damit eine Rolle für das bakterielle Gleichgewicht im Dickdarm hat. Es wurde außerdem herausgefunden, dass bei GF Mäusen, im

Gegensatz zu bakteriell normal besiedelten Mäusen, Meprin β an der Zellmembran verankert bleibt, was die Tiere im Folgenden empfindlicher für Infektionen macht (BÜLCK et al., 2023).

Auch bei Hühnern wurde mit GF und mit bestimmten Keimen bebrüteten und aufgezogenen Hühnern geforscht (THOMAS et al., 2019).

Bei der Morphologie und der Anzahl der neutralen sowie sauren Becherzellen konnte zwischen konv. gehaltenen und keimreduziert gehaltenen Hühnern kein Unterschied festgestellt werden. Das Verhältnis von sulfatierter zu sialylierter Becherzellbildung unterschied sich in bestimmten Entwicklungsstufen des Kükens geringfügig voneinander (FORDER et al., 2007).

Hühnern, die beim Schlupf mit maternalen Mikrobiota in Kontakt kamen, hatten eine deutlich vielfältigere bakterielle Besiedlung des Zäkums im Vergleich zu Hühnern unter streng hygienischen Bedingungen (ZENNER et al., 2021). Beim GF oder SPF konnte gezeigt werden, dass ihr Immunsystem gegenüber konv. gehaltenen Hühnern deutlich unterentwickelt ist (LETTMANN, 2015; ZENNER et al., 2021) und insgesamt viele Proteine und Immunglobuline vermindert produziert werden (VOLF et al., 2016).

Im Jahr 2024 untersuchte die Mucin Biology Group die Entwicklung der Schleimschicht bei neonatalen Ratten. Die Forschenden stellten fest, dass die bakterielle Besiedlung maßgeblich für die Entwicklung der funktionalen intestinalen Schleimschicht im Kolon verantwortlich ist. Erst nach etwa zwei Tagen setzt die Besiedlung durch Bakterien ein, wodurch gleichzeitig die Barrierefunktion der Schleimschicht entsteht. Dieser Befund lässt sich durch die Darstellbarkeit einer zweischichtigen Schleimschicht sowie durch die Bildung einer Schleimschicht um die Kotballen herum nachweisen. Darüber hinaus wird die innere Schleimschicht erst dann für Partikel in der Größenordnung von Bakterien undurchlässig. Bei gleichaltrigen GF-Mäusen konnten diese Schleimschichtveränderungen nicht beobachtet werden, was als weiterer Hinweis für eine rasche Entwicklung der Barrierefunktion der inneren Schleimschicht des Kolons durch bakterielle Besiedlung interpretiert wird. Die Becherzellanzahl war bei den GF-Tieren ab Tag 3 sogar erhöht im Vergleich zu konventionell gehaltenen Tieren. Zuvor lagen sie in der Becherzellanzahl noch auf dem gleichen Niveau, was ebenfalls auf einen Einfluss der Bakterien

schließen lässt (JOHANSSON et al., 2024).

2.6. Veränderungen bei pathologischen Zuständen

Wie beim Menschen wird auch beim Huhn der Fütterung eine maßgebliche Rolle für die physiologische Schleimschicht postuliert. Es wird vermutet, dass sich verschiedene Fütterungsstrategien wie die Anpassung der Protein- und/oder Kohlenhydrat-Art beziehungsweise -Menge oder verschiedene Fütterungsarten auf die Schleimschicht-Beschaffenheit auswirken. Auch beim Huhn sind lösliche oder unlösliche Ballaststoffe und daraus gebildete kurzkettige Fettsäuren bedeutend. Auch die Art des verwendeten Getreides wirkt sich wahrscheinlich aus (DUANGNUMSAWANG et al., 2021). In der industriellen Geflügelzucht werden die Küken nach dem Schlupf teilweise nicht sofort gefüttert. Einige Studien beschäftigten sich mit den Auswirkungen auf den Darm. In zwei Studien wurde die MUC2-Expression bei frisch geschlüpften Küken, die erst 48 oder 36 Stunden nach dem Schlupf Futter erhalten hatten, im Dünndarm gemessen. Diese war in beiden Studien, im Vergleich zu Küken die sofort Futter zur Verfügung hatten, in den ersten Tagen verringert. Im weiteren Verlauf näherte sich die Expression der beiden Gruppen dann aber wieder aneinander an (LIU et al., 2020; PROSZKOWIEC-WEGLARZ et al., 2020). Eine andere Studie kam im Zäkum zu anderen Ergebnissen. Die 48 Stunden nicht gefütterten Küken hatten hier 48 und 72 Stunden nach dem Schlupf eine signifikant höhere MUC2-Expression im Vergleich zu den gefütterten Küken (QU et al., 2021).

In der Hühnerzucht sind vor allem infektiöse Ursachen für Darmerkrankungen relevant. Diese können viralen, bakteriellen und parasitären Ursprungs sein (SMITH et al., 2014). Die Erreger müssen zuerst die schützende Schleimschicht überwinden. Viele Mikroorganismen haben Eigenschaften entwickelt, die ihnen das ermöglichen (MCGUCKIN et al., 2011; QUINTANA-HAYASHI et al., 2018).

Im Folgenden werden einige infektiöse Darmerkrankungen der Hühner mit bekanntem Zusammenhang zur Schleimschicht näher beschrieben.

Campylobacter jejuni ist ein an das Huhn angepasstes gram-negatives Bakterium, das vor allem durch Kontamination des Fleisches bei der

Schlachtung und Verarbeitung, zu Gastroenteritiden beim Menschen führt (YOUNG et al., 2007). Für das Huhn ist *Campylobacter jejuni* jedoch ein kommensales Bakterium, das die Epithelzellschicht nicht durchdringt (ALEMKA et al., 2010; ALEMKA et al., 2012). Es besitzt Flagellen, was es mobil macht (GUERRY, 2007; CULLEN und TRENT, 2010). Durch Chemotaxis erreicht es seinen Lebensraum in den Krypten der Blinddärme der Hühner (HERMANS et al., 2011). Beim Huhn finden sich die Bakterien innerhalb der Schleimschicht, replizieren sich dort und bleiben dort auch. Beim Menschen sind sie jedoch dazu befähigt, in die Epithelzellen einzudringen und dort tiefer liegende Schichten zu erreichen, Immunreaktionen auszulösen und Enteritiden zu verursachen (ALEMKA et al., 2010; ALEMKA et al., 2012; AL HAKEEM et al., 2022). Etliche der molekularen Hintergründe, Enzyme und Rezeptoren dieser komplizierten Pathogenese innerhalb der Schleimhaut wurden bereits entdeckt siehe hierfür KEMPER und HENSEL (2023). Das Bakterium ist innerhalb der Schleimschicht des Huhns geschützt. Eine orale Supplementierung mit mittelkettigen Fettsäuren konnte die in der Schleimschicht befindlichen Bakterien daher nicht schädigen, was die bakterielle Population in vitro schnell zu reduzieren vermag (HERMANS et al., 2010). Andererseits schützt der Schleim des Huhns vor einer Invasion der Bakterien in die Schleimhaut. Aufbereitete Mukus-Glykoproteine des Hühnerdarms konnten bei in vitro-Untersuchungen von menschlichen intestinalen Zelllinien eine Adhäsion und Invasion von *Campylobacter jejuni* hemmen (ALEMKA et al., 2010). Da MUC2 das häufigste Muzin des Darms ist und sich das MUC2-Protein der Hühner vor allem in der stark glykosylierten PTS-Domäne von dem menschlichen Protein unterscheidet, wurde die Hypothese aufgestellt, dass vor allem das unterschiedliche MUC2 O-Glykosylierungsmuster für die Abschwächung der Pathogenität verantwortlich ist (JIANG et al., 2013). 2015 wurde daraufhin die O-Glykanstruktur der intestinalen Muzine des Haushuhns, im Zusammenhang mit der *Campylobacter jejuni* Pathogenität, näher untersucht (STRUWE et al., 2015). Es zeigte sich, dass der intestinale Schleim des Huhns genau in den Darmregionen mit der größten Vielfalt und Anzahl an O-Glykanstrukturen, *Campylobacter jejuni* am besten in menschlichen intestinalen Zelllinien inhibieren konnte. Im Dickdarm war die größte Vielfalt und Anzahl der O-Glykane mit der größten Inhibition von *Campylobacter jejuni*, gefolgt vom Dünndarm und den Blinddärmen (ALEMKA et al., 2010; STRUWE et al., 2015).

Diese Reihenfolge korreliert im Übrigen mit der Beobachtung, dass *Campylobacter jejuni* vor allem im Zäkum des Huhns in großer Anzahl vorzufinden ist. Es existieren weitere wesentliche Unterschiede der O-Glykanstruktur des Huhns und des Menschen, die zu der unterschiedlichen Pathogenität von *Campylobacter jejuni* führen. Beispielsweise sind die intestinalen Muzine des Huhns im Vergleich mit denen des Menschen stark sulfatiert und besitzen unterschiedliche Epitope der Glykane. Alpha 1-2 gebundene Fucose Reste wurden im Dünndarm und Dickdarm des Haushuhns vorgefunden, die hohe Bindungsaffinität zu *Campylobacter jejuni* zeigen (STRUWE et al., 2015).

Die Kokzidiose wird durch intrazelluläre Darmparasiten der Gattung *Eimeria* ausgelöst. Sie stellt für die Geflügelwirtschaft eine ökonomisch verlustreiche parasitäre Erkrankung dar (SMITH et al., 2014; BINDARI und GERBER, 2022). Interessanterweise hat jede Eimerienart eine strikte Spezifität für eine bestimmte Tierart, einen Darmabschnitt und eine Zellart. Für das Huhn sind 7 *Eimeria*-Arten infektiös. So infiziert *Eimeria tenella* z.B. ausschließlich die Enterozyten der Zäka beim Huhn (AUGUSTINE, 2001; MESA-PINEDA et al., 2021). Eine in vitro-Studie des University College Dublin konnte an speziellen Zelllinien einen Zusammenhang zwischen der *Eimeria tenella* und intestinalen Muzinen herstellen. Der Parasit bindet ausschließlich an duodenales Muzin des Huhns, nicht jedoch an zäkales Hühnermuzin oder Rindermuzin. Aufbereitete duodenale und zäkale Mukus-Glykoproteine von Hühnern, nicht aber Rindermuzin, konnten die Invasion der Parasiten in die Zellen dosisabhängig vermindern. Es wurde vermutet, dass die unterschiedlichen Glykosylierungsmuster der Muzine aus verschiedenen Darmbereichen bzw. unterschiedlichen Tierarten der Grund für die strikte Spezifität der Eimerienarten für die Tierart und Darmabschnitt sind. Die spezifischen O-Glykane der Muzine könnten als eine Art „Anker“ für die Eimerien dienen (TIERNEY et al., 2007).

Des Weiteren lösen die Entzündungsreaktionen des Darms durch die Kokzidiose eine vermehrte Schleimbildung aus, was durch vermehrte Muzin-Genexpression und größere und vermehrte Anzahl an Becherzellen bestätigt werden konnte. Es wurde gezeigt, dass dies wiederum einen Wachstumsvorteil für eine Infektion mit *Clostridium perfringens* darstellt, da dieses Bakterium die Glykane der Schleimschicht als Substrat verwendet. Deshalb waren in einer

Untersuchung Eimerien-infizierte Hühner, die anschließend mit *Clostridium perfringens* infiziert wurden, am häufigsten infiziert und auch die α -Toxin-Bildung des Bakteriums war hier am höchsten (COLLIER et al., 2008).

Das grampositive Bakterium *Clostridium perfringens* stellt den Erreger der nekrotisierenden Enteritis unter anderem beim Menschen oder beim Huhn dar. Es ist ubiquitär und kann langlebige Sporen erzeugen. Es bildet mehrere Toxine aus und kann daher Wundinfektionen, Enteritiden, darunter auch die nekrotisierende Enteritis und Septikämien verursachen (MEHDIZADEH GOHARI et al., 2021). Es wurde gezeigt, dass dieses Bakterium verschiedene mukolytische Enzyme besitzt und somit auch Teile des abgebauten Muzins als Nahrung verwenden kann (LOW et al., 2020). Es konnte auf verschiedenen Monosaccharid-Bausteinen der Muzine angezüchtet werden. Ein terminaler Zucker des Muzins, die N-Acetylneuraminsäure kann durch das Bakterium abgebaut und metabolisiert werden. Dieses Endglied findet sich im Hühnerschleim im Vergleich zu anderen Tierarten in besonders großer Anzahl (MACMILLAN et al., 2019). Eine Infektion mit *Clostridium perfringens* und gleichzeitiger Kokzidiose führte bei Hühnern in einer weiteren Untersuchung zu keinem Anstieg von MUC2, aber zu einem Anstieg der MUC5ac-Bildung. Es wurde gefolgert, dass die starke Nekrose der jejunalen-Schleimhaut, dazu führte, dass kein MUC2 mehr gebildet werden konnte (FORDER et al., 2012).

III. MATERIAL UND METHODEN

Das folgende Kapitel beschreibt die verwendeten Materialien und Methoden zur Herstellung sowie Beurteilung der Hühnerdarmproben in Bezug auf die Schleimschicht des Darmepithels.

1. Material

1.1. Verwendete Tiere

Die zur Verfügung stehenden Hühner (*Gallus gallus domesticus*) der PA-12 White Leghorn Linie wurden, durch Blutentzug nach vorheriger Betäubung, getötet. Anschließend wurden den Hühnern jeweils mehrere Proben von unterschiedlichen Darmabschnitten mit Inhalt entnommen.

Tabelle 1 illustriert die Aufteilung der Hühner nach ihrer Haltungsform und ihrem Alter in verschiedene Versuchsgruppen. Jede Versuchsgruppe umfasst fünf Tiere.

Tabelle 1: Zuweisung der Hühner in Versuchsgruppen und zugehörigem Probenmaterial

Versuchsgruppe (Nummer)	Haltungsform und Herkunft (Präparat-Bezeichnung)	Alter (Tage nach dem Schlupf)	Anzahl der Tiere	Entnommene Darmabschnitte
1	Keimfrei aus Frankreich (GF3 85-89)	55	5	Jejunum, Zäkum und Kolon
2	Spezifisch pathogenfrei aus Frankreich (GF3 73-77)	55	5	Jejunum, Zäkum und Kolon
3	Konventionell aus München (GF5 1-5)	3	5	Jejunum und Kolon
4	" (GF5 6-10)	7	5	Jejunum und Kolon
5	" (GF5 11-15)	14	5	Jejunum und Kolon
6	" (GF5 16-20)	21	5	Jejunum und Kolon
7	" (GF5 21-25)	28	5	Jejunum und Kolon
8	" (GF5 26-30)	55	5	Jejunum und Kolon

Die ersten beiden Gruppen der Tabelle 1 stammen aus einem französischen Institut und umfassen Proben von jeweils fünf Hühnern, die alle 55 Tage alt sind.

Gruppe 1: GF Aufzucht und Haltung; Gruppe 2: SPF Aufzucht und Haltung. Von jedem Tier liegen Proben des Jejunums, des Zäkums sowie des Kolons vor.

Die übrigen Gruppen 3 bis 8 stammen aus der Hühnerhaltung des Instituts für Tierphysiologie AG Prof. Dr. B. Kasper, Tierärztliche Fakultät der LMU München und wurden bakteriell nicht restriktiv gehalten. Die Küken wurden von Anfang an auf Einstreu mit direktem Kontakt mit dem Kot konv. Hühner gehalten und wuchsen auch weiterhin unter „Bauernhof-ähnlichen Bedingungen“ (Bezeichnung in Anlehnung an ARNESEN et al., 2023) auf. Dadurch war ihr Mikrobiom hochkomplex im Vergleich zu der geringen Diversität der SPF-Gruppe. Es wurden jeweils fünf Tiere an Tag 3, 7, 14, 21, 28 und 55 nach dem Schlupf getötet, um anschließend Proben des Jejunums und Kolons zu entnehmen, nicht aber des Zäkums, das für andere Untersuchungen der AG Kaspers benötigt wurde.

1.2. Verwendete Materialien und Substanzen

Für die Präparation der Hühnerdarmproben wurden die in Tabelle 2 aufgelisteten Materialien und Substanzen verwendet.

Tabelle 2: Materialien und Substanzen für die Fertigstellung der histologischen Präparate

-gebrauchsfertige Lösung Carnoy'sche Fixierung (Formaldehyd-Alkohol-Essigsäure)
-Holzpipetten, Skalpell
-Einbettkassetten
-Alkoholreihe: wasserfreies Methanol, wasserfreies Ethanol, Xylol
-Paraffinreihe: Paraffin Typ 12 und Typ 13
-Einbett-Gießformen
-Paraffin-Einbettungsmaschine (Gerät der Firma Microm Model AP280) -Kühlplatte
-Rotationsmikrotom (Gerät der Firma Zeiss Model Microm HM 360)
-Objektträger
-Wärmeschrank zum Trocknen

Bei einer Serie der hergestellten Paraffinschnitte wurde die PAS-Färbung durchgeführt. Tabelle 3 listet die dafür benötigten Materialien und Substanzen auf.

Tabelle 3: Benötigte Chemikalien für die PAS-Färbung

-Xylol, Isopropanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol, Aqua. dest.
-0,5% wässriger Lösung Periodsäure
-gebrauchsfertige Lösung Schiff'sches Reagenz
- Schwefeldioxidhaltige Spülflüssigkeit (1 l Leitungswasser mit 50 ml 10% Natriumdisulfitlösung und 50 ml n-Salzsäure)
-Hämalaun
-Epoxidharz/Kunstharz (Marke: Eukitt)

An einer Serie der hergestellten Präparate wurde die PAS-Färbung nach Diastase-Vorverdauung durchgeführt. Tabelle 4 listet die benötigten Materialien und Substanzen dafür auf.

Tabelle 4: Benötigte Chemikalien für die PAS-Färbung nach Diastase-Vorverdauung

-Xylol, Isopropanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol, Aqua. dest.
-Diastase-Lösung 0,1% bei 37°C
-0,5% wässriger Lösung Periodsäure
-gebrauchsfertige Lösung Schiff'sches Reagenz
- Schwefeldioxidhaltige Spülflüssigkeit (1 l Leitungswasser mit 50 ml 10% Natriumdisulfitlösung und 50 ml n-Salzsäure)
-Hämatoxylinlösung modifiziert nach Gill III
-Epoxidharz/Kunstharz (Marke: Eukitt)

Eine weitere Serie der hergestellten Präparate wurde mit Alcianblau pH 2,5 gefärbt. Tabelle 5 listet die benötigten Materialien und Substanzen dafür auf.

Tabelle 5. Benötigte Chemikalien für die Färbung Alcianblau pH 2,5:

-Xylol, Isopropanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol, Aqua. dest.
-3 % iger Essigsäure
-AB-Lösung mit pH-Wert 2,5
-Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung
-Epoxidharz/Kunstharz (Marke: Eukitt)

Zusätzlich wurde eine Serie der hergestellten Präparate mit Alcianblau pH 1,0 gefärbt. Tabelle 6 listet die benötigten Materialien und Substanzen dafür auf.

Tabelle 6: Benötigte Chemikalien für die Färbung Alcianblau pH 1,0

-Xylol, Isopropanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol, Aqua. dest.
-0,1 N HCl
-AB-Lösung mit pH-Wert 1,0
-Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung
-Epoxidharz/Kunstharz (Marke: Eukitt)

Bei einer weiteren Serie der hergestellten Paraffinschnitte wurde die AB 2,5 Färbung mit einer anschließenden Gram-Färbung kombiniert. Tabelle 7 listet die benötigten Materialien und Substanzen dafür auf.

Tabelle 7: Benötigte Chemikalien für die kombinierte AB 2,5- und Gram-Färbung

-Xylol, Isopropanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol, Aqua. dest.
-3 % iger Essigsäure
-AB-Lösung mit pH-Wert 2,5
-Kristallviolett nach Hucker
Lugolsche Lösung
Entfärbelösung nach Gram
Safranin
-Epoxidharz/Kunstharz (Marke: Eukitt)

Die Kombination der AB 2,5-PAS-Färbung nach Diastase-Vorverdauung und anschließender Gram-Färbung wurde an einer weiteren Schnittserie durchgeführt. Tabelle 8 listen die benötigten Materialien und Substanzen dafür auf.

Tabelle 8: Benötigte Chemikalien für die kombinierte PAS-AB 2,5-Färbung nach Diastase-Vorbehandlung und anschließenden Gram-Färbung

-Xylol, Isopropanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol, Aqua. dest.
-Diastase-Lösung 0,1% bei 37°C
-3 % iger Essigsäure
-AB-Lösung mit pH-Wert 2,5
-0,5% wässriger Lösung Periodsäure
-gebrauchsfertige Lösung Schiff'sches Reagenz
- Schwefeldioxidhaltige Spülflüssigkeit (1 l Leitungswasser mit 50 ml 10% Natriumdisulfitlösung und 50 ml n-Salzsäure)
- Kristallviolett nach Hucker
Lugolsche Lösung
Entfärbelösung nach Gram
Safranin
-Epoxidharz/Kunstharz (Marke: Eukitt)

Die Auswertung der fertigen histochemisch behandelten Präparate erfolgte mit einem Lichtmikroskop. Die digitale Dokumentation der Befunde erfolgte mit dem Slide Scanner DotSlide der Firma Olympus auf der Basis eines Forschungslichtmikroskopes vom Typ BX51. Für die Betrachtung der digitalisierten Bilder diente die Bildbetrachter-Software OlyVia. Die Bildverarbeitungs-Softwares ImageJ und QuPath wurden für die morphometrische Auswertung der Bilddateien sowie die Beschriftung ausgewählter Ausschnitte für die Befunddokumentation in dieser Dissertationsschrift genutzt.

2. Methoden

2.1. Präparation des Gewebes mit Erhaltung der Schleimschicht

2.1.1. Organentnahme und Fixierung

Bei der Zerlegung des Darms frisch geschlachteter Tiere wurde darauf geachtet, dass der Darminhalt möglichst im Lumen verbleibt, um eine Ablösung der Schleimschicht zu verhindern.

Eine Formalin-Fixierung führt zur Austrocknung der Schleimschicht, sodass sie mikroskopisch nicht mehr sichtbar ist. Daher wurden die verwendeten Darmpräparate unmittelbar nach der Entnahme in wasserfreier Carnoy'scher Lösung fixiert (vgl. OTA und KATSUYAMA, 1992).

2.1.2. Dehydratation und Paraffineinbettung

Die Präparation der Darmproben erfolgte in den konv. gehaltenen Gruppen unter der Anleitung von Frau S. Mitterer im histologischen Labor des Lehrstuhls für Anatomie, Histologie und Embryologie in München. Die Proben der GF und SPF Tiere aus Frankreich waren bereits nach denselben Herstellungsverfahren verarbeitet und wurden als ungefärbte Paraffinschnitte zur Verfügung gestellt.

Die Darmproben wurden transversal mit speziellen, nicht traumatischen Holzpinzetten und jeweils frischen Skalpell vorsichtig in 1 cm dicke Scheiben geschnitten und in Einbettkassetten überführt. Dieser Vorgang wurde möglichst zügig durchgeführt, um eine Austrocknung zu verhindern. Die Einbettkassetten mit den Darmstücken wurden anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (2x 30 min. wasserfreies Methanol, 2 x 20 min. wasserfreies Ethanol, 2x 15 min. Xylol). Daraufhin erfolgte die Einbettung in Paraffin: Zunächst 30 Min. Paraffin Typ 12, danach 30 Min. Paraffin Typ 13. Nachdem die Proben ausreichend in Paraffin durchtränkt waren, wurden sie in passende Einbettformen gelegt, wobei auf die Orientierung der Proben geachtet wurde, damit die Darmabschnitte möglichst senkrecht geschnitten werden konnten. Anschließend wurden die Proben mit einer Einbettungsmaschine (AP280, Microm) in Paraffinblöcke gegossen. Die fertigen Blöcke härteten auf einer Kühlplatte aus.

2.1.3. Anfertigung der Paraffinschnitte

Die fertigen Paraffinblöcke wurden mit einem Mikrotom (Rotationsmikrotom Zeiss Microm HM 360) in 5 µm Dicke geschnitten. Die Schnitte schwammen in einem warmen Wasserbad auf und dehnten sich dabei auf ihre ursprüngliche Abmessung aus. Anschließend wurden die Schnitte vorsichtig auf Objektträger übertragen und im Wärmeschrank getrocknet.

2.2. Histochemische Färbungen

Es wurden sechs verschiedene histochemische Färbungen durchgeführt. Die beiden zuletzt durchgeführten Färbungen konnten zudem Bakterien darstellen. Im Folgenden werden die Färbeprotokolle, die zu erwartenden Färbeargebnisse des Schleims sowie der umliegenden Strukturen und die chemischen Hintergründe der Färbereaktionen erörtert.

2.2.1. Periodsäure-Schiff-Reaktion

Je ein Schnitt jedes Darmsegments und Tieres wurde nach dem Färbeprotokoll PAS nach McManus von 1948 (RIEDELSEIMER und BÜCHL-ZIMMERMANN, 2015) behandelt (Abkürzung: PAS).

- Entparaffinierung und Rehydratation in absteigender Alkoholreihe bis Aqua dest. (2x Xylol je 5 min, 2x Isopropanol je 2 min, 96% Ethanol 2 min, 70% Ethanol 2 min, Aqua dest. 2 min)
- 5 min in 0,5% wässriger Lösung Periodsäure bei Raumtemperatur (0,5 g Periodsäure/ 100 ml Aqua dest.)
- kurz spülen in Aqua dest.
- 15 min Schiff'sches Reagenz bei Raumtemperatur
- 3 x 2 min waschen in Schwefeldioxid-haltiger Spülflüssigkeit (1 l Leitungswasser + 50 ml 10% Natriumdisulfitlösung + 50 ml n-Salzsäure)
- 10 min. wässern in fließendem Leitungswasser
- kurz spülen in Aqua dest.
- 3 min. Kernfärbung mit Hämalun nach Mayer
- 10 min. wässern in fließendem Leitungswasser
- Absteigende Alkoholreihe (s. erster Punkt in umgekehrter Reihenfolge)
- Eindecken mit Epoxidharz und Deckglas

Die PAS-Färbung färbt allgemein Kohlenhydrate wie Polysaccharide und Glykoproteine. Beispiele sind neutrale Muzine, Zellulose der Pflanzenzellen, Glykogen, Glykolipide, Basalmembranen oder Pilzhyphen. Der chemische Hintergrund besteht darin, dass die Periodsäure eine Oxidation der 1,2-Glykol-Gruppen zu Aldehyden bewirkt, an die im Anschluss Sulfit des Schiffschens Reagens (fuchsin-schweflige Säure) binden kann. Dadurch wird Fuchsin freigesetzt und erzeugt eine leuchtend rote bis magentafarbene Farbe (RIEDELSHEIMER und BÜCHL-ZIMMERMANN, 2015). Mit der PAS-Färbung wird der Schleim entsprechend in einer hellroten bis magentafarbenen Tönung sichtbar. Der Darminhalt der Hühner besteht größtenteils aus Pflanzenteilen, die wiederum aus Zellulose oder Stärke, also Kohlenhydraten bestehen. Folglich färbt sich auch der Darminhalt überwiegend magentafarben. Das Epithel selbst wird in dieser Färbereihe außer dem magentafarbenen Schleimgehalt der Becherzellen nicht gefärbt und erscheint in einem Grauton. Die Gegenfärbung wurde drei Minuten lang mit Hämatoxylin nach Mayer durchgeführt, wodurch eine zarte blaue Kernfärbung entsteht. Hämatoxylin färbt Zellkerne blau, da es als basischer Farbstoff an die sauren (negativ geladenen) Nukleinsäuren bindet. Auch andere saure Substanzen können mitgefärbt werden, wie Muzine, Bakterien oder saure Grundsubstanzen (RIEDELSHEIMER und BÜCHL-ZIMMERMANN, 2015).

2.2.2. Alcianblau pH 2,5

Je ein Schnitt jedes Darmsegments und Tieres wurde nach dem Färbeprotokoll AB 2.5 nach Steedman von 1950 (RIEDELSHEIMER und BÜCHL-ZIMMERMANN, 2015) behandelt (Abkürzung: AB 2.5):

- Entparaffinierung und Rehydratation in absteigender Alkoholreihe bis Aqua dest. (2x Xylol je 5 min, 2x Isopropanol je 2 min, 96% Ethanol 2 min, 70% Ethanol 2 min, Aqua dest. 2 min)
- 3 min. in 3 %iger Essigsäure
- 45 min. AB -Lösung
- abspülen in 3 %iger Essigsäure
- waschen in Aqua dest.
- 5 min. gegenfärben in Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung
- waschen in Aqua dest.

- Absteigende Alkoholreihe (s. erster Punkt in umgekehrter Reihenfolge)
- Eindecken mit Epoxidharz und Deckglas

AB wurde speziell für die Darstellung von Muzinen eingeführt und färbt polyanionische Glykoproteine türkis-blau. Bei pH 2,5 färbt AB Carboxylgruppenreiche Glykoproteine. Der chemische Hintergrund besteht darin, dass saure Muzine und andere Makromoleküle aufgrund der Sulfat- und Carboxylgruppen der Uronsäuren negativ geladen sind und daher den kationischen bzw. positiv geladenen Farbstoff AB binden. Eine Unterscheidung der Polyanionen mit Sulfat- und Carboxylgruppen ist bei pH 2,5 nicht möglich. Zellkerne werden mit der Kerngegenfärbung (Kernechtrot-Aluminiumsulfat) hellrot gefärbt, da AB Zellkerne nicht färbt. Der Futterbrei wird in einem Blauton mit rosa Anteilen dargestellt; der Hintergrund erscheint zartrosa (RIEDELSHEIMER und BÜCHL-ZIMMERMANN, 2015).

2.2.3. Alcianblau pH 1,0

Je ein Schnitt jedes Darmsegments und Tieres wurde nach dem Färbeprotokoll Alcianblau pH 1.0 nach Lev und Spicer von 1964 (RIEDELSHEIMER und BÜCHL-ZIMMERMANN, 2015) behandelt (Abkürzung AB 1.0).

- Entparaffinierung und Rehydratation in absteigender Alkoholreihe bis Aqua dest.
- 3 min. 0,1 N HCl
- 45 min AB -Lösung
- spülen in 0,1 N HCl
- 5 min. gegenfärben in Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung
- aufsteigende Alkoholreihe
- eindecken

AB färbt bei pH 1,0 im Vergleich zur vorherigen Färbung ausschließlich stark sulfatierte Schleime und andere Polyanionen wie Glykosaminoglykane. Durch die Absenkung des pH-Werts auf 1,0 wird die Dissoziation der Carboxylgruppen unterdrückt, sodass nur noch die negative Ladung der Sulfatgruppen für die Reaktion mit AB verbleibt. Es werden daher nur noch sulfatierte Muzine

angefärbt, während sialylierte Muzine nicht mehr angezogen werden (RIEDELSHEIMER und BÜCHL-ZIMMERMANN, 2015).

2.2.4. PAS nach Diastase-Vorbehandlung

Je ein Schnitt jedes Darmsegments und Tieres wurde, nach dem modifizierten Färbeprotokoll PAS nach McManus von 1948 nach Enzym-Vorverdauung mit Diastase (RIEDELSHEIMER und BÜCHL-ZIMMERMANN, 2015) behandelt (Abkürzung: PAS-Diastase).

- Entparaffinierung und Rehydratation in absteigender Alkoholreihe bis Aqua dest. (2x Xylol je 5 min, 2x Isopropanol je 2 min, 96% Ethanol 2 min, 70% Ethanol 2 min, Aqua dest. 2 min)
- 20 min. in 37°C warmer Diastase-Lösung 0,1%
- 1 min. wässern mit Leitungswasser
- 1 min. spülen in Aqua dest.
- 5 min in 0,5% wässriger Lösung Periodsäure bei Raumtemperatur (0,5 g Periodsäure/ 100 ml Aqua dest.)
- 5 min. spülen in Leitungswasser
- 2 x 1 min. spülen in Aqua dest.
- 15 min Schiff'sches Reagenz bei Raumtemperatur
- 3 x 2 min waschen in Schwefeldioxid-haltiger Spülflüssigkeit (1 l Leitungswasser + 50 ml 10% Natriumdisulfitlösung + 50 ml n-Salzsäure)
- 10 min. wässern in fließendem Leitungswasser
- kurz spülen in Aqua dest.
- 5 min. Gegenfärbung mit Hämatoxylinlösung modifiziert nach Gill III (Morphisto GmbH))
- Kurz spülen in Aqua dest.
- 10 min. wässern in fließendem Leitungswasser
- Absteigende Alkoholreihe (s. erster Punkt in umgekehrter Reihenfolge)
- Eindecken mit Epoxidharz und Deckglas

Da der farbliche Unterschied zwischen Darminhalt und Schleimschicht bei der PAS-Färbung gering ist, wurde diese modifizierte Färbereihe angewendet. Durch die Vorverdauung der Präparate in einer Diastase-Lösung und anschließende PAS-Färbung lässt sich ein deutlich besserer Kontrast des

Futterbrei zur Schleimschicht erzielen. Der Futterbrei wird nach der Diastase-Vorverdauung deutlich schwächer als die Schleimschicht gefärbt. Durch die Diastase-Vorverdauung werden PAS-positives Stärke- und Zellulosematerial aus dem pflanzlichen Darminhalt nicht mehr PAS-positiv dargestellt. Der Schleim hingegen wird weiterhin unverändert magenta angefärbt. Als Gegenfärbung wurde in dieser Färbereihe Hämatoxylin modifiziert nach Gill III (Morphisto GmbH) gewählt, die eine noch intensivere blaue Kernfärbung erzeugt. Hämatoxylin ist ein Naturstoff, der zunächst durch Oxidation in Hämatein umgewandelt wird. Dieser färbt die sauren, negativ geladenen Strukturen der DNS im Zellkern sowie weitere basophile Strukturen im Gewebeschnitt (RIEDELSHEIMER und BÜCHL-ZIMMERMANN, 2015).

2.2.5. Kombinierte AB 2.5 - mit Gram-Färbung

Je ein Schnitt jedes Darmsegments und Tieres wurde zuerst nach dem Färbeprotokoll AB 2.5 nach Steedman von 1950 und anschließend mit dem Färbeprotokoll nach Gram 1884 (RIEDELSHEIMER und BÜCHL-ZIMMERMANN, 2015) ohne weitere Gegenfärbung behandelt (Abkürzung: AB-Gram).

- Entparaffinierung und Rehydratation in absteigender Alkoholreihe bis Aqua dest. (2x Xylol je 5 min, 2x Isopropanol je 2 min, 96% Ethanol 2 min, 70% Ethanol 2 min, Aqua dest. 2 min)
- 3 min. in 3 %iger Essigsäure
- 45 min. AB -Lösung
- abspülen in 3 %iger Essigsäure
- waschen in Aqua dest.
- 2-3 min. Kristallviolett nach Hucker (färbt Zellkerne und Zellbestandteile wie Nukleinsäuren und Peptidoglykane)
- Waschen mit Aqua dest. 30 s
- 1 min. Lugolsche Lösung stabilisiert mit PVP
- Waschen mit Aqua dest.
- 10 s. Entfärbelösung nach Gram
- Waschen mit Aqua dest. 30 s.
- 1 min. Safranin (färbt Knorpel, Zellkerne Glykosaminoglykane)

- Waschen mit Aqua dest. 1 min.
- Absteigende Alkoholreihe (s. erster Punkt in umgekehrter Reihenfolge)
- Eindecken mit Epoxidharz und Deckglas

Zur Darstellung der Bakterien in der Schleimschicht wurde die Gram-Färbung eingesetzt. Diese wurde mit der AB 2.5 -Färbung kombiniert, um die Schleimschicht sichtbar zu machen. Eine Vorverdauung mit Diastase wurde durchgeführt, um den Kontrast zum Futterbrei zu verbessern. Der Schleim ist hier durch die AB 2,5-Färbung leuchtend blau gefärbt. Der Futterbrei variiert in seiner Färbung in Abhängigkeit von der bakteriellen Last des jeweiligen Darmabschnitts oder der Haltungsform. In bakteriell stark besiedelten Darmbereichen ist der Futterbrei dunkler gefärbt als in weniger stark besiedelten. Die grampositiven Bakterien färben sich dadurch dunkel-violett und die gram-negativen in leuchtend rötlich-orange (RIEDELSHEIMER und BÜCHL-ZIMMERMANN, 2015).

2.2.6. PAS-AB 2.5-Gram-Färbung nach Diastase-Vorverdauung

Je ein Schnitt jedes Darmsegments und Tieres wurde, nach Diastase-Vorverdauung mit dem Färbeprotokoll AB 2,5 kombiniert mit PAS nach McManus von 1948 und anschließend mit dem Färbeprotokoll nach Gram 1884 (RIEDELSHEIMER und BÜCHL-ZIMMERMANN, 2015) behandelt (Abkürzung: PAS-AB-Gram):

- Entparaffinierung und Rehydratation in absteigender Alkoholreihe bis Aqua dest. (2x Xylol je 5 min, 2x Isopropanol je 2 min, 96% Ethanol 2 min, 70% Ethanol 2 min, Aqua dest. 2 min)
- 20 min. in 37°C warmer Diastase-Lösung 0,1%
- 1 min. wässern mit Leitungswasser
- 1 min. spülen in Aqua dest.
- 3 min. in 3 %iger Essigsäure
- 30 min. AB -Lösung
- 3 min. in 3 %iger Essigsäure
- waschen in Aqua dest.
- 5 min in 0,5% wässriger Lösung Periodsäure bei Raumtemperatur (0,5 g Periodsäure/ 100 ml Aqua dest.)

- kurz spülen in Aqua dest.
- 15 min Schiff'sches Reagenz bei Raumtemperatur
- 3 x 2 min waschen in Schwefeldioxid-haltiger Spülflüssigkeit (1 l Leitungswasser + 50 ml 10% Natriumdisulfitlösung + 50 ml n-Salzsäure)
- 10 min. wässern in fließendem Leitungswasser
- kurz spülen in Aqua dest.
- 2 min. Kristallviolett
- 30 s. Aqua dest.
- 1 min. Lugolsche Lösung
- 20 s. Aqua dest.
- 10 s. Entfärbelösung nach Gram
- 30 s. Aqua dest.
- 1 min. Safranin
- 1 min. Aqua dest.
- Absteigende Alkoholreihe (s. erster Punkt in umgekehrter Reihenfolge)
- Eindecken mit Epoxidharz und Deckglas

Die kombinierte Gram- mit PAS- AB 2.5 -Färbung nach Diastase-Vorverdauung stellt den hell-lila gefärbten Schleim in gutem Kontrast zum dunkler lila gefärbten Futterbrei dar. Schleim, der eher blau erscheint, ist saurer; fällt er eher rötlich aus, dominieren neutrale Anteile. Die Bakterien können hier deutlich erkannt werden; allerdings ist in dieser Färbereihe eine Unterscheidung zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien nicht möglich (RIEDELSEIMER und BÜCHL-ZIMMERMANN, 2015).

2.3. Morphologische und morphometrische Beurteilungen

Die Messparameter, nach deren Vorgaben die Vermessungen durchgeführt wurden, sind in Tabelle 9 wie folgt aufgeführt:

Tabelle 9: Messparameter zur Bestimmung der Dicke der luminalen Schleimschicht

- Jedes Präparat wird nur einmal gemessen, bezogen auf Tier, Darmabschnitt und Färbung.
- Davon werden so viele Messungen wie möglich durchgeführt, maximal jedoch 50.
- Soll möglichst von Ingesta, beziehungsweise Darmlumen, bedeckt sein.
- Nur der lumenzugewandte, oberste Bereich zwischen den Zotten, nicht tiefer zwischen den Zotten
- Senkrecht zur Tangente der gekrümmten Schleimschicht, auf der direktesten Geraden (nicht schräg) vom oberen lumenseitigen Rand der Schleimschicht bis zum epithelnahen Rand der Schleimschicht.
- Falls nicht am Epithel angeheftet (abgelöst): nur die Schleimschicht

Folgende Daten der Tabelle 10 wurden in einer Exceltabelle festgehalten:

Tabelle 10: Vermessungsdaten – Erfasst per Excel-Tabelle

- Bezeichnung des Präparats, die auf dem gefärbten Objektträger steht
- Tiernummer
- Haltungsform (konventionell, spezifisch pathogenfrei, GF)
- Alter
- Darmlokalisation (Jejunum, Kolon, Zäkum)
- Färbemethode (PAS, PAS-Diastase, AB 1.0, AB 2.5, AB 2.5 -Gram, AB 2.5 -PAS-Gram)
- Daten der Schleimschicht-Dicke (Median- und arithmetischer Mittelwert, Streuung, Minimal- und Maximalwert, Anzahl der Messungen)
- Kontinuität der Schicht (in vier Kategorien, von 0: nicht sichtbare Schleimschicht bis 3: durchgängig kontinuierlich)
- Füllungsgrad des Schleims zwischen den Zotten (in vier Kategorien, 0 kein Schleim, 1 strangartig, 2 wabenartig, 3 komplett gefüllt)
- Färbeintensität der Schleimschicht (in drei Kategorien von 1 schwach gefärbt bis 3 stark gefärbt)
- Anhaftung der Schleimschicht am Epithel (0 es ist angeheftet oder keine Ablösung, 1 es ist nicht angeheftet oder Ablösung vorhanden)

Bei der Datenerhebung wurden Werte zu Kontinuität, Füllungsgrad des Zwischenzottenspalts, Färbeintensität des Schleims sowie zur Anhaftung des

Schleims am Epithel erhoben. Die subjektive Tendenz des gesamten Bildes wurde zu einem Gesamtergebnis zusammengeführt. So konnte beispielsweise bei einem Bild, in dem die luminale Schleimschicht an kurzen Strecken am Epithel angeheftet war, aber überwiegend vom Epithel abgelöst wurde, das Gesamtergebnis 1 „nicht angeheftet“ vergeben werden.

2.4. Statistische Methoden

Die statistische Analyse erfolgte mit der Software IBM SPSS Statistics 29.0.2.0 sowie BIAS für Windows Version 11,12 (epsilon-Verlag, Frankfurt). Im Rahmen der Auswertung der Proben wurden sowohl kategoriale als auch metrische Daten erhoben. Die kategorialen Daten wurden deskriptiv statistisch in Form von Kreuztabellen mit absoluten und relativen Häufigkeiten zusammengefasst. Von den metrischen Daten wurden im Rahmen der deskriptiven Statistik die verschiedenen Parameter der Verteilung erhoben. Zudem wurden die Daten mit dem Shapiro-Wilk-Test auf eine Normalverteilung getestet. Gruppenunterschiede bei den kategorialen Daten wurden mit dem Chi-Quadrat-Test auf signifikante Unterschiede getestet. Gruppenunterschiede bei den metrischen Daten wurden mit dem t-Test oder wenn keine Normalverteilung bestand mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede getestet. Bei gruppierenden Variablen mit mehr als zwei Ausprägungen kam der Kruskal-Wallis-Test zum Einsatz. Zusammenhänge zwischen metrischen Variablen wurden mit dem Korrelationskoeffizienten Spearman's rho quantifiziert. Da die abhängigen Parameter wie z.B. die Schleimdicke von mehreren Parametern parallel beeinflusst werden, wurden um Scheinsignifikanzen auszuschließen auch multifaktorielle Analysen mit dem generalisierten linearen Modell durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

IV. ERGEBNISSE

1. Konventionelle Haltung

1.1. Schleim zwischen den Zotten

In beiden Darmabschnitten der konv. Gruppe lässt sich im Bereich zwischen den Zotten Schleim von tief in den Krypten bis nach oben anfärben. Die Becherzellen des Darmepithels sind deutlich mit Schleim gefüllt, den sie in den Zwischenzottenspalt abgeben. Die Verbindungen des Schleims aus den Becherzellöffnungen zu den mehr oder weniger dicht gefüllten Schleimformationen des Zwischenzottenspalts lassen sich deutlich erkennen.

Im Jejunum endet der Schleim zwischen den Zotten meist im oberen Bereich der Zottenspitzen und verbindet sich nicht mit dem dünnen luminalen Schleim. Selten sind Verbindungen des Zwischenzotten-Schleims mit der dünnen luminalen Schleimschicht zu beobachten. Es kann im Jejunum keine Veränderung dieses Zustands mit dem Alter beobachtet werden. Im Kolon reicht der Schleim dagegen vor allem bei älteren Tieren meist weiter nach oben und verbindet sich häufiger mit der hier breiteren luminalen Schleimschicht. An Stellen, an denen die luminale Schleimschicht nicht vorhanden ist, bildet sich im Kolon typischerweise eine Vorwölbung von Schleim, die oberhalb des Niveaus der Zottenspitzen liegt. Dabei ist der Schleim zwischen den Zotten im Kolon bei den jüngeren Tieren deutlich zarter gefüllt und reicht ähnlich wie im Jejunum nur bis ins obere Viertel der Zottenspitzen. Generell findet sich eine größere Schleimdichte in den Präparaten des Kolons im Vergleich zum Jejunum, wobei sich der Unterschied mit dem Alter vergrößert.

In Abbildung 13 ist jeweils eine typische Abbildung einer strangartigen im Jejunum links und einer wabenartigen Schleimformation im Kolon rechts im Zwischenzottenspalt, in der AB 1.0 -Färbung, abgebildet. Der Spalt zwischen den Zotten im Jejunum lässt den Schleim lediglich in feinen Linien erkennen und endet, wie im linken Bildabschnitt, im oberen Viertel der Zotte. Im Kolon hingegen lässt sich eine dichtere, wabenartige Struktur des leuchtend blauen Schleims zwischen den Zotten erkennen, der den Zwischenzottenspalt bis zum oberen Rand ausfüllt.

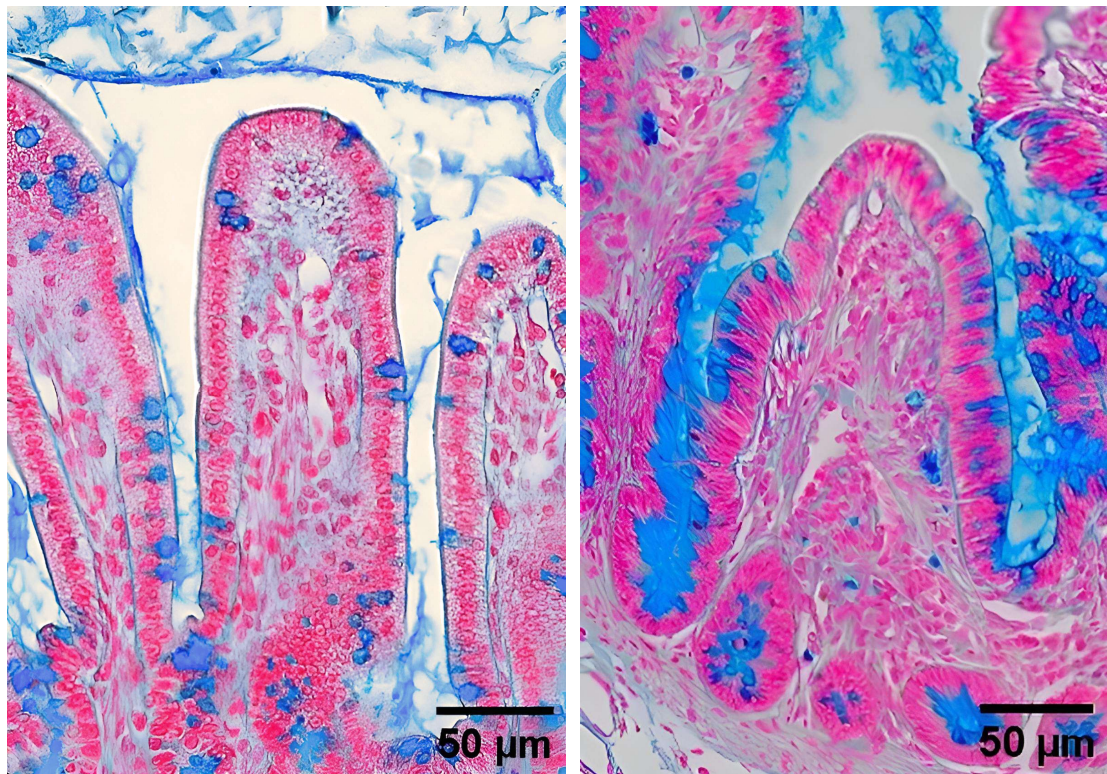


Abbildung 13: Schleim zwischen den Zotten, links im Jejunum strangartig, rechts im Kolon wabenartig, links: Jejunum, konv., 3 Tage alt, rechts: Kolon, konv., 14 Tage alt, AB 1.0

In der kombinierten Färbung mit AB und PAS lässt sich ein Farbverlauf erkennen: Der Schleim in den tiefen Krypten bis zu den Zottenspitzen verändert sich von Blau über Violett zu Rot. Abbildung 14 illustriert dies am Jejunum. Der blaue Pfeil markiert den bläulich-violetten Schleim der Becherzellen der Kryptregion, der sich in Richtung Zottenspitzen in ein zunehmend roter werdendes Violett überführt, wie durch den roten Pfeil gekennzeichnet.

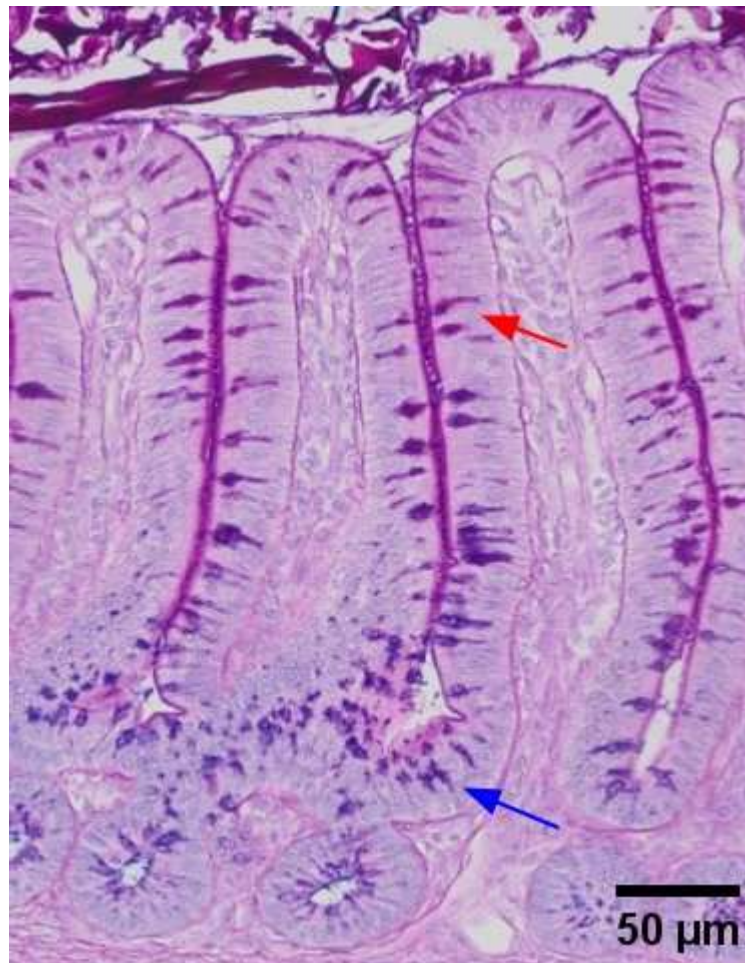


Abbildung 14: Farbveränderung des Schleims auf Krypt-Zotten-Achse im konv. Jejunum
Jejunum, konv.,
7 Tage alt, AB 2.5 -PAS-Gram-Färbung, roter Pfeil: deutet auf oberen Teil der Zotte mit rötlicherem Schleim in den Becherzellen, blauer Pfeil: deutet auf Kryptregion mit bläulichem Schleim in den Becherzellen

In Abbildung 15 ist eine Zotte einer Kolonfalte mit einem ähnlichen Farbverlauf abgebildet. Deutlich zu sehen ist der blau-violette Schleim der Kryptregion sowie an der Zottenbasis; der Schleim in der Zottenspitzenregion verändert sich zunehmend ins Rötliche.

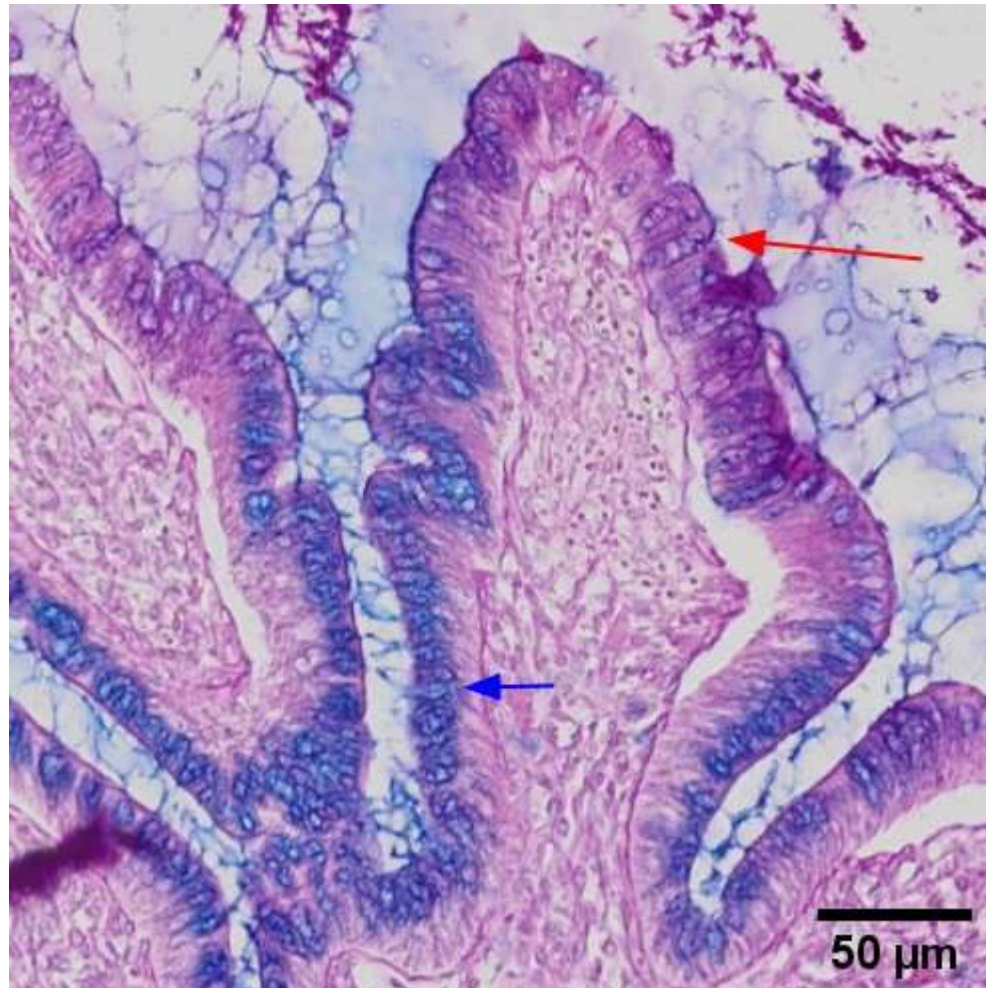


Abbildung 15: Farbveränderung des Schleims auf Krypt-Zotten-Achse im konv. Kolon , Kolon, konv., 55 Tage alt, AB 2.5 -PAS-Gram-Färbung, roter Pfeil: deutet auf oberen Teil der Zotte mit rötlicherem Schleim in den Becherzellen, blauer Pfeil: deutet auf Kryptregion mit bläulichem Schleim in den Becherzellen

Durch die visuelle Einordnung der Einzelpräparate in eine von vier Füllungsgraden und deren statistische Auswertung konnte festgestellt werden, dass in beiden Darmabschnitten überwiegend die beiden mittleren Einstufungen (wablen- oder strangartig) erzielt werden. Selten ist der Raum vollständig homogen gefüllt oder keine Füllung sichtbar. Insgesamt ist im Kolon im Vergleich zum Jejunum mehr Schleimfüllung zwischen den Zotten vorhanden ($p < 0,001$). Dieser ist bei den Kolon-Präparaten in allen Altersgruppen am stärksten wabenartig gefüllt und nimmt mit dem Alter zu

($p=0,023$). Im Jejunum ist die Füllung bei drei Tage alten Tieren zunächst noch annähernd zur Hälfte auf waben- und strangartig aufgeteilt; danach zeigt sich in allen weiteren Altersgruppen überwiegend eine strangartige Füllung, wobei keine klare Altersabhängigkeit beobachtet wird.

1.2. Luminale Schleimschicht

1.2.1. Dicke der Schleimschicht

In der conv. Gruppe konnte bei allen Altersgruppen sowohl im Jejunum als auch im Kolon eine Schleimschicht an den Zottenspitzen dargestellt werden, die als luminale Schleimschicht bezeichnet wird.

Der Unterschied zwischen den beiden Darmabschnitten ist deutlich erkennbar: Im Kolon lässt sich eine deutlich dicke luminale Schleimschicht beobachten, die die Zottenspitzen ummantelt, während sie im Jejunum fein, dünn und linienartig an den oberen Zottenspitzen anliegt.

Im Jejunum zeigen sich interessanterweise keine ersichtlichen Veränderungen der linienförmigen Schleimschicht mit zunehmendem Alter, wie in Abbildung 23 zu erkennen ist. Hier sind Bilder jeder Altersgruppe gegenübergestellt. Die linienförmige Struktur ist bei den jungen, 3-Tage-alten Küken bis zu den 55 Tage alten Tieren beobachtbar und befindet sich oberhalb der Zottenspitzen.

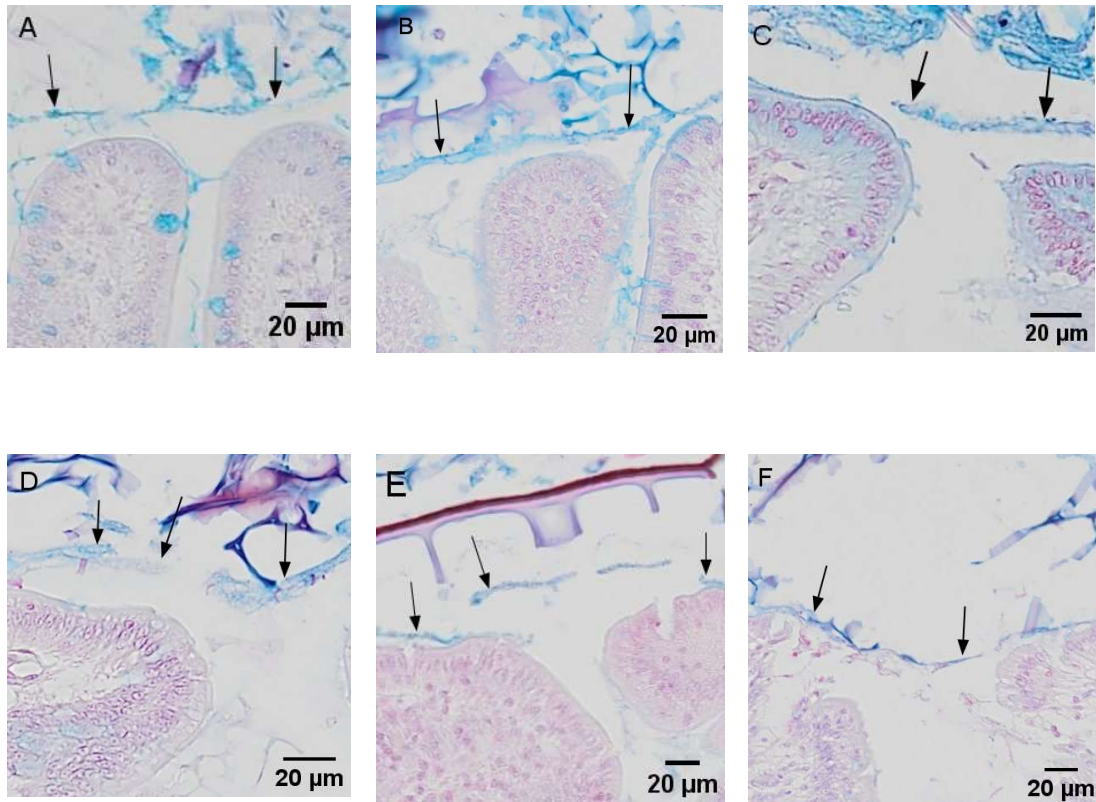


Abbildung 16: Altersvergleich der linienförmigen luminalen Schleimschicht im Jejunum der konv. Gruppe, A: 3 Tage, B: 7 Tage, C: 14 Tage, D: 21 Tage, E: 28 Tage, F: 55 Tage nach dem Schlupf, AB 2.5 -Gram-Färbung

Im Kolon der konv. Tiere entwickelt sich im Gegensatz zum Jejunum eine deutlich breitere und dichtere Schleimschicht mit zunehmendem Alter. In Abbildung 17 ist jeweils ein Bild jeder Altersgruppe vergleichend nebeneinandergestellt. Die jüngsten Küken der Gruppe weisen teilweise eine linienförmige, dünne Schleimschicht auf, die den Verhältnissen im Jejunum ähnelt. Bei den älteren Tieren wird diese Schicht immer breiter und ist schließlich bei den 55 Tage alten Hühnern deutlich ausgeprägt. Bei den älteren konv. gehaltenen Tieren reicht der Schleim bis weit nach außen und umhüllt meist das gesamte Zottenspitzenepithel. Der Schleim bildet einen deutlichen Trennungsbalken zwischen dem Futterbrei und dem darunter liegenden Zottenepithel.

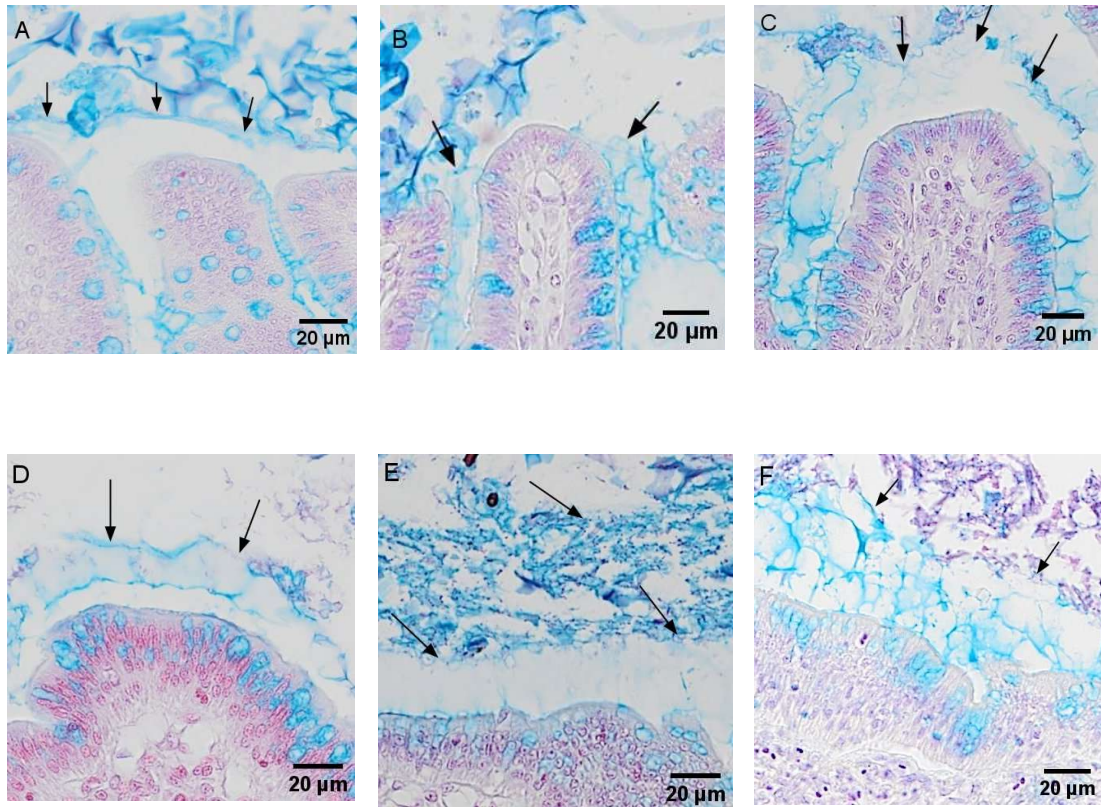


Abbildung 17: Altersvergleich der immer breiter werdenden luminalen Schleimschicht im Kolon der konv. Gruppe, A: 3 Tage, B: 7 Tage, C: 14 Tage, D: 21 Tage, E: 28 Tage, F: 55 Tage nach dem Schlupf, AB 2.5 -Gram-Färbung

Die Ergebnisse der Dickenmessungen bestätigen die morphologischen Beobachtungen in vielen Punkten besonders deutlich.

Zuerst wird die vermessene Dicke der luminalen Schleimschicht im Vergleich der beiden Darmabschnitte Jejunum und Kolon der konv. Gruppe betrachtet. Im Jejunum ist sie deutlich dünner als im Kolon. Abbildung 18 veranschaulicht dies anhand eines Boxplot-Diagramms mit den MW aller Messergebnisse der konv. Gruppe. Die Färbung hat dabei keinen statistischen Einfluss. Durchschnittlich ist die Dicke im Kolon um 48,51 % größer als im Jejunum. Dieser Unterschied ist hochsignifikant ($p < 0,001$).

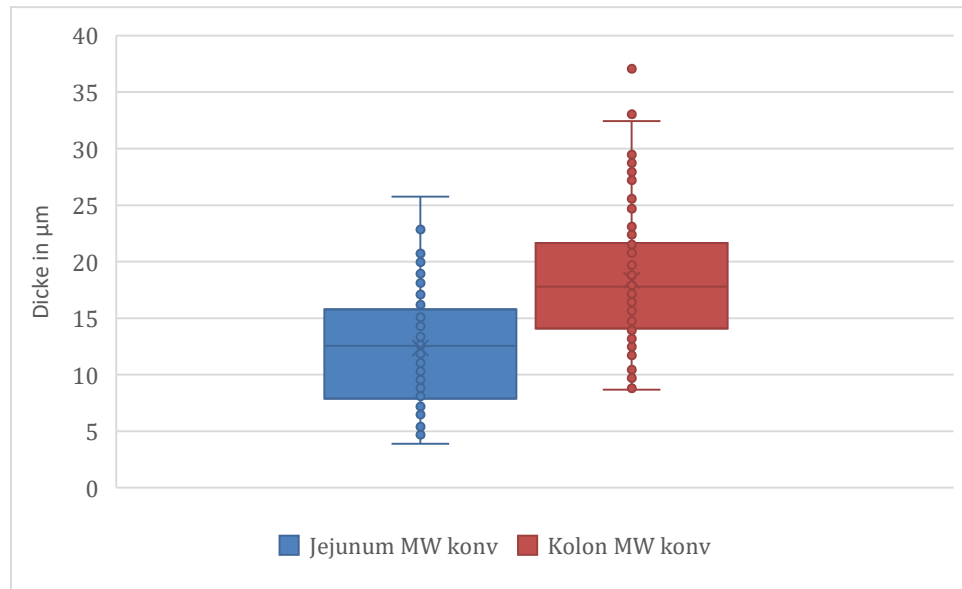


Abbildung 18: Grafische Gegenüberstellung der Dicke der luminalen Schleimschicht im Jejunum und Kolon der konv. Gruppe (alle Messergebnisse einbezogen)

Der Vergleich zwischen Jejunum und Kolon innerhalb der verschiedenen Altersgruppen ist in Abbildung 19 grafisch dargestellt. Auch hier wurden alle Messergebnisse aus allen Färbungen einbezogen. Es zeigt sich, dass in allen Altersgruppen im Kolon signifikant höhere Werte erzielt wurden und die Differenz zwischen Jejunum und Kolon mit dem Alter zunimmt.

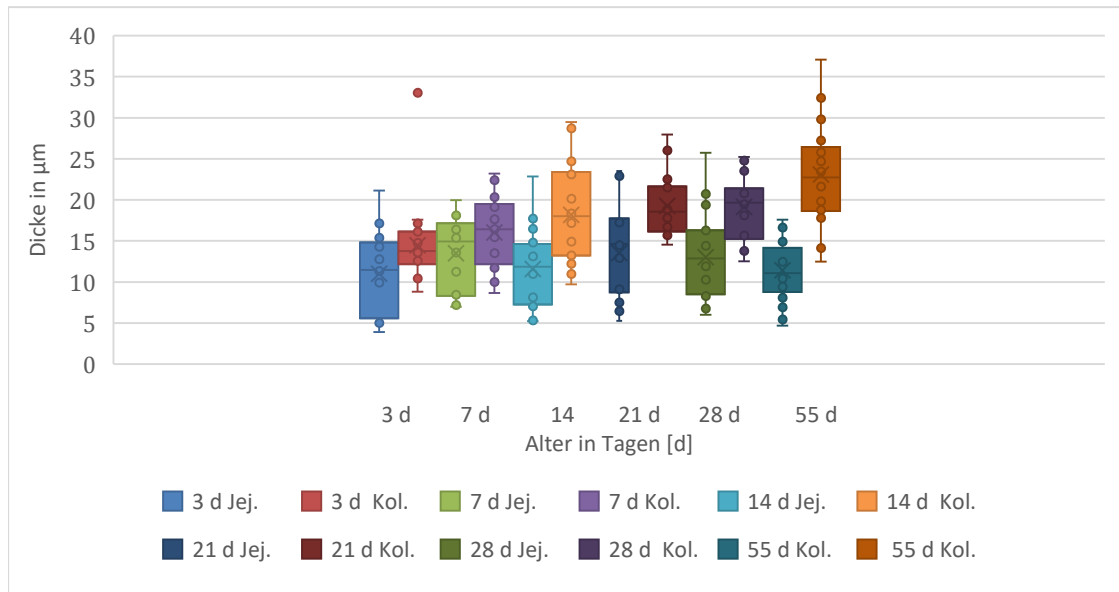


Abbildung 19: Grafische Gegenüberstellung der Messergebnisse von Jejunum und Kolon der konv. Gruppe in den verschiedenen Altersgruppen (alle Messergebnisse einbezogen)

Die statistische Auswertung der Vermessungsdaten zeigt, dass die Dicke der Schleimschicht im Jejunum nicht mit dem Alter der Versuchstiere korreliert ($\rho=-0,029$, $p=0,794$), während dies für das Kolon sehrwohl der Fall ist ($\rho=0,514$, $p<0,001$). Abbildung 20 veranschaulicht ein Balkendiagramm der Mittelwerte sämtlicher Färbungen pro Altersgruppe, wobei ein Balken pro Gruppe dargestellt wird. Die Werte zeigen im Jejunum weder eine signifikante Zunahme mit Alter noch eine erkennbare Abhängigkeit.

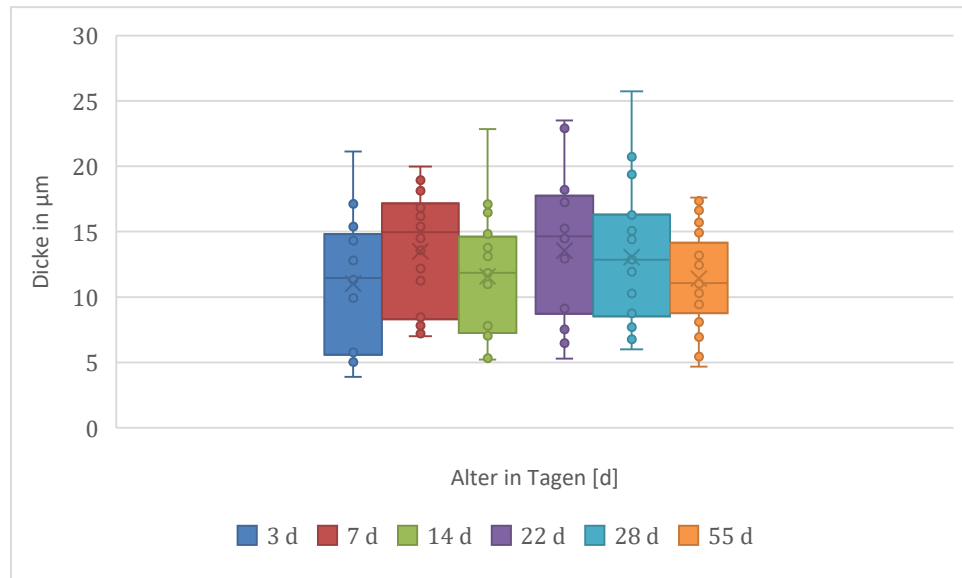


Abbildung 20: Grafische Darstellung der Altersunabhängigkeit der luminalen Schleimschichtdicke im Jejunum der conv. Gruppe

Im Jejunum beeinflusst die Färbung die gemessene Schichtdicke signifikant ($p=0,004$)

Dabei zeigt sich, dass die drei Färbereihen PAS (MW = 14,671 µm), AB 1.0 (MW = 15,516 µm) und AB 2,5 (MW = 14,706 µm) etwa doppelt so hohe Messergebnisse erbrachten wie die Messergebnisse der Färbereihen PAS Diastase (MW = 7,726 µm), AB 2,5-Gram (MW = 6,703 µm) und PAS-AB 2,5-Gram (MW = 7,969 µm). Abbildung 21 illustriert die Ergebnisse der erstgenannten drei Färbereihen, der zuletzt genannten drei Färbereihen sowie aller Färbereihen insgesamt, jeweils im Altersvergleich nebeneinander dargestellt. Zur besseren Anschaulichkeit sind die Daten als Balkendiagramm dargestellt. In allen Färbereihen ist kein signifikanter Zusammenhang mit dem Alter ersichtlich.

Der Grund für die Messunterschiede der verschiedenen Färbereihen im Jejunum liegt in der Schwierigkeit der Abgrenzung der luminalen Schleimschicht in diesem Darmabschnitt. In den ersten drei genannten Färbereihen wurde eine äußere Schicht an den Zottenspitzen mitgemessen, die in den drei zuletzt genannten Färbereihen nicht als Teil der Schleimschicht betrachtet und daher nicht mitgemessen wurde. Dies erklärt die Differenz der Messergebnisse. In den drei zuletzt genannten Färbereihen wurde die äußere Schicht, die dem

Futterbrei farblich ähnelt, nicht mitgemessen. Diese äußere Schicht legt sich linienförmig an die oberen Zottenspitzen an, enthält oftmals Bakterien und ist daher in den Gram-Färbungen sowie in der PAS-Diastase-Färbung farblich von dem Schleim der Zwischenzottenbereiche unterschiedlich.

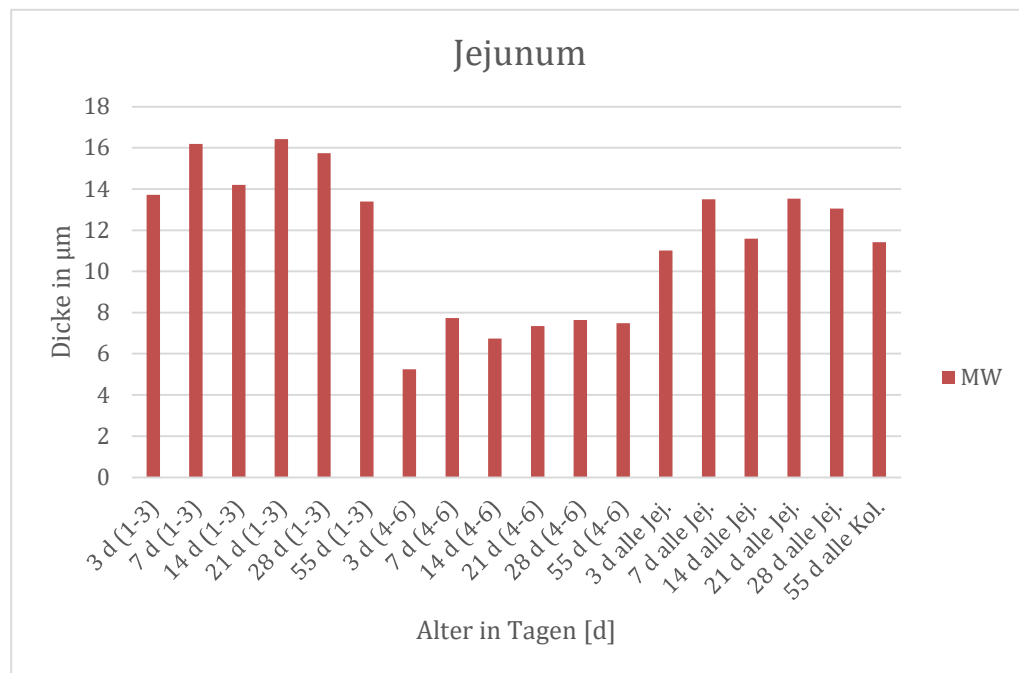


Abbildung 21: Grafische Gegenüberstellung des Einflusses der Färbung auf die luminale Schleimschichtdicken-Messungen im Jejunum der konv. Gruppe bei 3, 7, 14, 21, 28 und 55 Tage alten Hühnern.

Links: Färbungen mit höheren Messergebnissen; Mitte: Färbungen mit niedrigeren Messergebnissen; Rechts: alle Färbungen,
Färbungen: 1) PAS, 2) AB 1.0, 3) AB 2.5, 4) PAS-Diastase, 5) AB2.5-Gram, 6) AB2.5--PAS-Gram

Im Kolon lässt sich eine Dickenzunahme der Schleimschicht mit dem Alter anhand der Messergebnisse statistisch belegen ($\rho=0,514$, $p<0,001$). Abbildung 22 veranschaulicht dies anhand eines Balkendiagramms. Dort steigt die Dicke kontinuierlich von 3 Tagen bis 21 Tagen (14,458 µm, 16,013 µm, 18,184 µm, 19,254 µm); bei 28 Tagen stagniert sie (19,163 µm) und nimmt mit 55 Tagen erneut deutlich zu (23,079 µm).

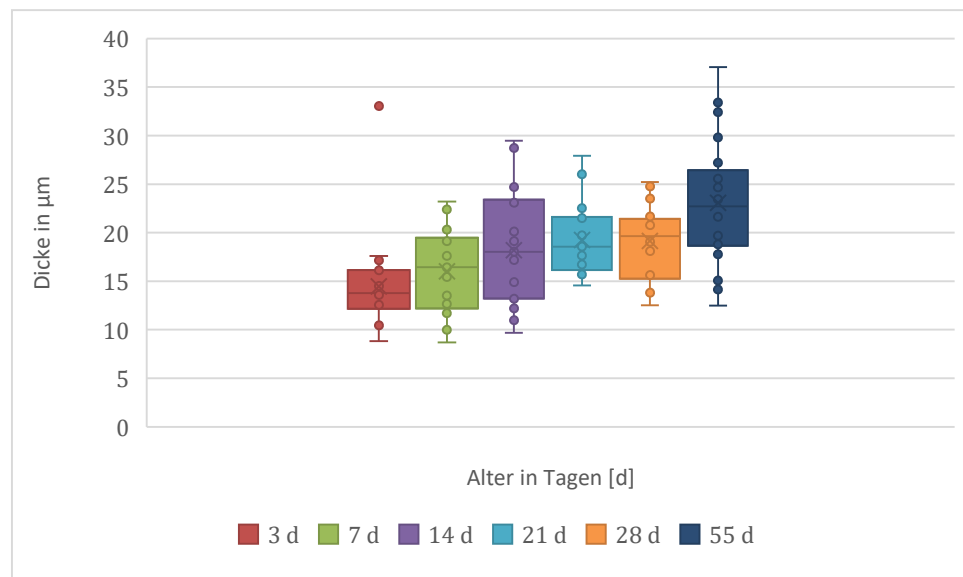


Abbildung 22: Grafische Darstellung der Altersabhängigkeit der luminalen Schleimschichtdicke im Kolon(3, 7, 14, 21, 28 und 55Tage alte Hühner) alle Messergebnisse aller Färbungen sind enthalten.

Im Kolon kann kein Zusammenhang der Dickenmessungen mit den Färbungen, vergleichbar zum Jejunum, gefunden werden. Abbildung 23 stellt die jeweiligen Färbereien 1–3, 4–6 und alle Färbungen in einem Balkendiagramm dar. Es zeigt sich, dass die unterschiedlichen Färbereien ähnliche Ergebnisse liefern. Die Färbungen haben hier keinen statistisch signifikanten Einfluss ($p=0,675$).

Im Kolon lässt sich die Differenzierung der luminalen Schleimschicht im Vergleich zum Jejunum deutlich besser durchführen. Infolgedessen erbrachte die luminale Schleimabdeckung in allen Färbereien ähnliche Ergebnisse. Denn die farbliche Darstellung der luminalen Schleimschicht in den Gram-Färbungen sowie in der PAS-Diastase-Färbung entspricht – anders als im Jejunum – derjenigen des Zottenzwischenraums.

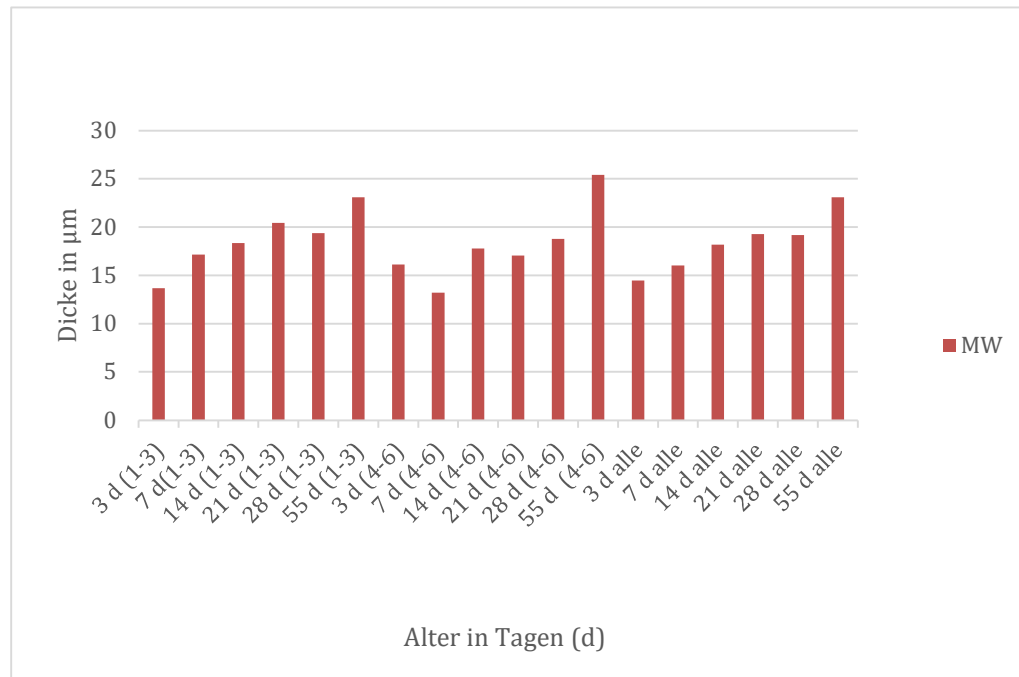


Abbildung 23: Grafische Darstellung der Unabhängigkeit der Färbung von den luminalen Schleimschichtdicken-Messungen im Kolon, bei Hühnern im Alter von 3, 7, 14, 21, 28 und 55 Tagen Färbungen: 1) PAS, 2) AB 1.0, 3) AB 2.5, 4) PAS-Diastase, 5) AB-Gram, 6) PAS-AB-Gram

1.2.2. Ablösung der Schleimschicht vom Epithel

Die luminal Schleimschicht der konv. gehaltenen Gruppe ist auffällig häufig vom Epithel der Zotten abgelöst. Vor allem im Jejunum der konv. Gruppe findet sich diese Ablösung praktisch in jedem Präparat zwischen Epithel und Schleimschicht. Im Kolon der konv. Tiere findet sich dieses Phänomen ebenfalls regelmäßig. Im Kolon hat die Schleimschicht allerdings auch häufiger Kontakt zum Epithel als im Jejunum.

In Abbildung 24 wird ein Bild des Jejunums eines 3 Tage alten Huhns in der AB-pH 1,0-Färbung gezeigt, das auch für andere Altersgruppen repräsentativ ist. Dort befindet sich die linienförmige luminal Schleimschicht, die durch schwarze Pfeile angedeutet wird, nicht direkt an den Zottenspitzen anliegend, sondern in einem gewissen Abstand dazu. Dadurch ergibt sich zwischen dem Epithel der Zottenspitzen und der darüber liegenden Schleimschicht ein Zwischenraum, der orange markiert ist.

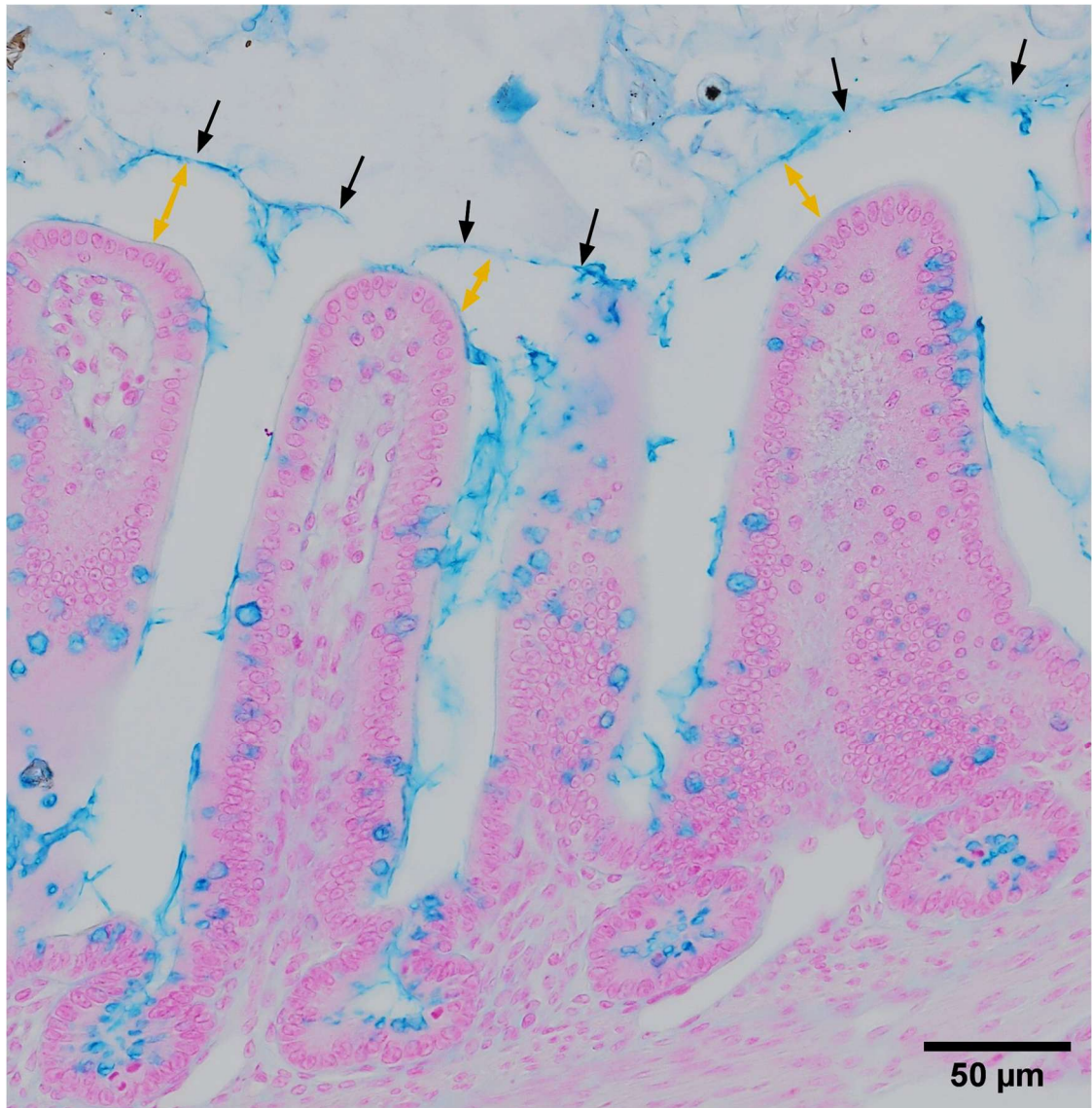


Abbildung 24: Linienförmige luminale Schleimschicht mit Ablösung vom Epithel im Jejunum, konv., 3 Tage alt, Orangene Doppelpfeile: Ablösung der Schleimschicht vom Epithel, schwarze Pfeile: linienförmiger luminaler Schleim, AB 1,0

Im Kolon finden sich ebenfalls häufig Ablösungen des Epithels, wie in Abbildung 25 bei einem 21 Tage alten Tier ersichtlich ist. Die breitere Schleimschicht ist mit schwarzen Doppelpfeilen gekennzeichnet. Sie befindet sich vom Epithel getrennt, was mit orangenen Doppelpfeilen markiert ist. In dieser befinden sich einzelne Keime, was im Kolon selten und dies ausschließlich an den oberen Zottenspitzen zu sehen ist.

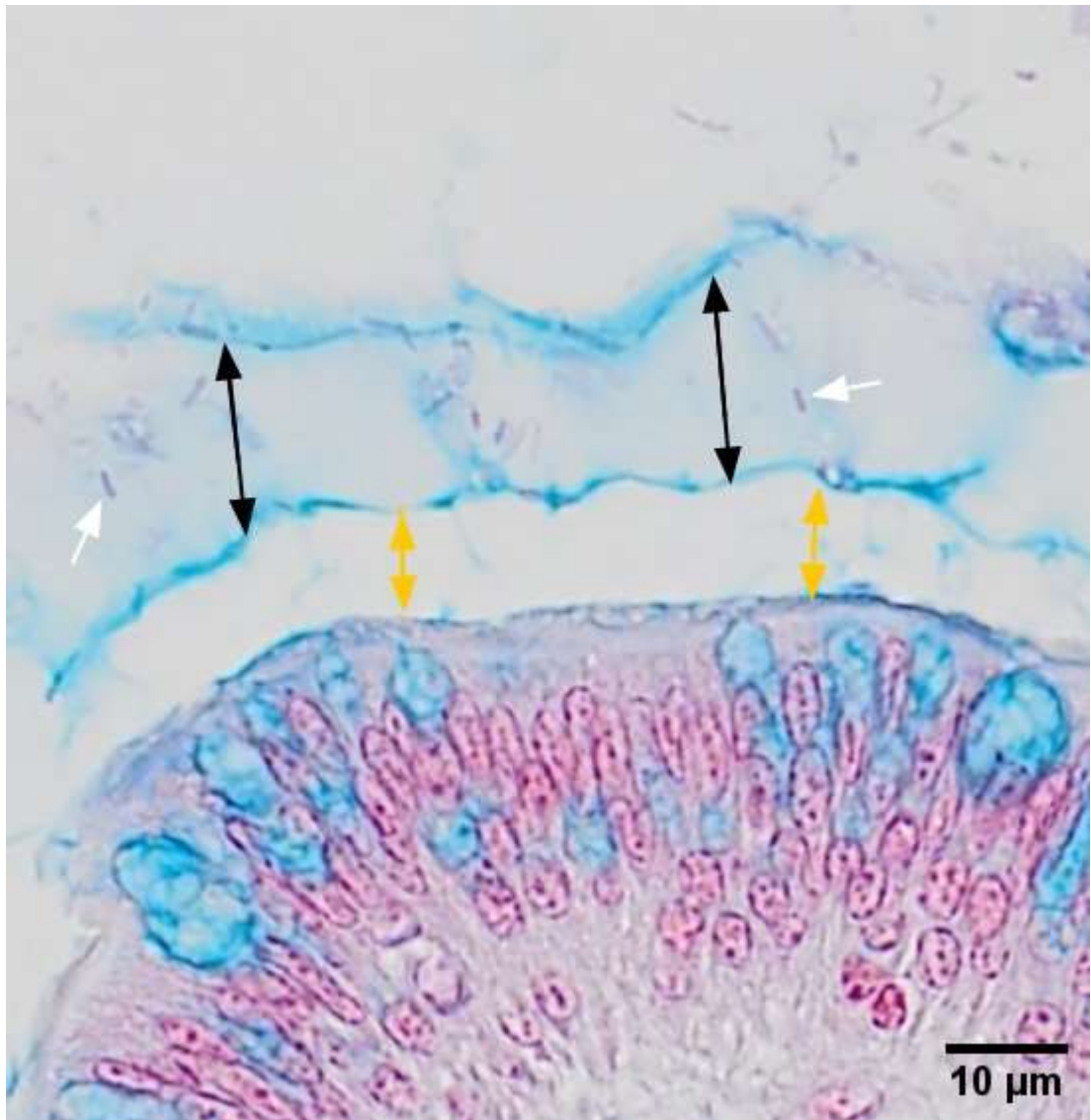


Abbildung 25: Luminale Schleimschicht im Kolon, vom Epithel abgelös, Orange Pfeile markieren die Ablösung des Schleims vom Epithel, schwarze Pfeile kennzeichnen die luminale Schleimschicht mit Bakterien (weiße Pfeile), 21 Tage alt, AB-Gram-Färbung

Vor allem bei den ältesten Tieren der konv. Gruppe haftet die Schleimschicht im Kolon direkt am Epithel, wie in Abbildung 26 dargestellt. Hier wird die breite Schleimschicht durch schwarze Doppelpfeile gekennzeichnet, die unmittelbar am Epithel angrenzt.

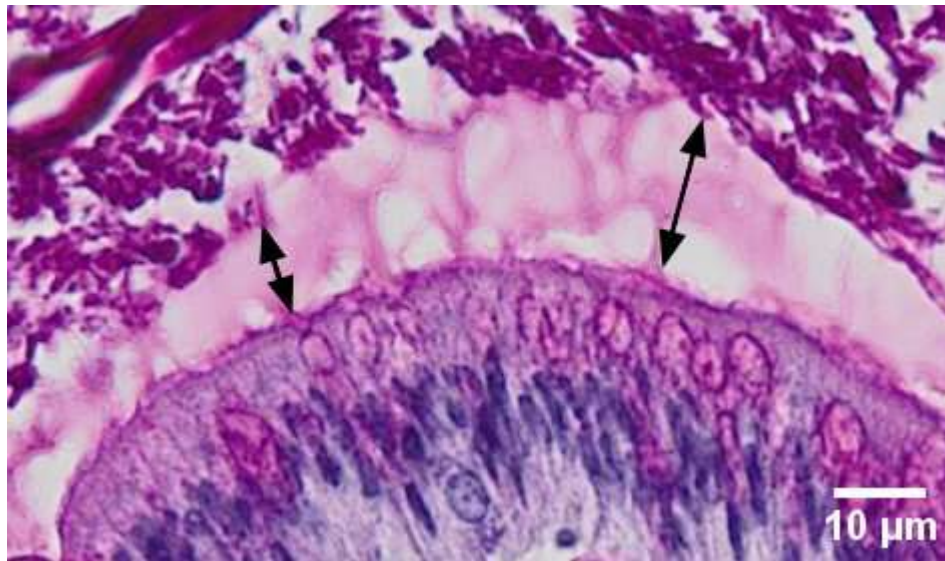


Abbildung 26: Luminale Schleimschicht direkt am Epithel anhaftend, Kolon, 55 Tage nach dem Schlupf, Schwarze Doppelpfeile markieren die luminale Schleimschicht, PAS-Diastase-Färbung

Durch die Einteilung der Einzelpräparate in anhaftende und nicht anhaftende Schleimschicht lässt sich diese Beobachtung im Folgenden durch die statistische Auswertung bestätigen ($p < 0,001$). Im Jejunum findet sich in der Gesamtbeurteilung der Einzelpräparate kaum angeheftete Schleimschicht; sie ist meist vom Epithel abgelöst (nur 1 von 132 Präparaten angeheftet). Dabei lässt sich im Jejunum keine Abhängigkeit vom Alter beobachten ($p = 0,359$). Im Kolon ist die Schleimschicht deutlich häufiger am Epithel angeheftet (46 von 128 Fällen; 35,94 %) und ist bei den Hühnern mit 55 Tagen signifikant häufiger angeheftet als bei den jungen Küken ($p < 0,001$). Dort ist die Schleimschicht bei den jungen 3–28 Tage alten Hühnern zu 27,36 % angeheftet (29 von 106) und bei den ältesten 55 Tage alten Tieren zu 77,27 % angeheftet (17 von 22).

1.2.3. Kontinuität der lumenseitigen Schleimschicht

Die luminale Schleimschicht ist in den meisten Präparaten in beiden Darmabschnitten nicht durchgehend nachvollziehbar. Insbesondere weisen die Zottenspitzen im Jejunum und im Kolonbereich wiederholt Schleimabdeckungslosigkeit auf, und genau dort kann sich Ingesta direkt am Epithel befinden. Tendenziell lässt sich im Kolon aufgrund der dort breiteren Schleimschicht eine kontinuierlichere Schicht beobachten.

Abbildung 27 zeigt die luminale Schleimschicht im Jejunum eines 21 Tage alten Huhns in der PAS-Färbung nach Diastase-Vorverdauung. Die Schleimschicht stellt sich als feine, lückenhafte Linie dar, die an vielen Stellen auch gar nicht sichtbar ist. Die gelben Pfeile markieren die feine luminale Schleimschicht, die im linken Bildbereich nicht weiterverfolgt werden kann.

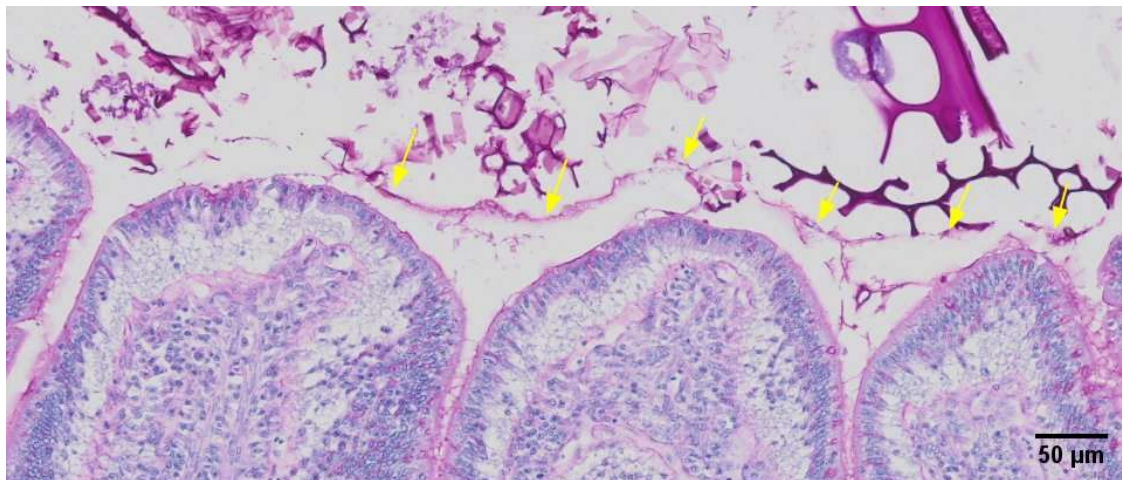


Abbildung 27: Feine lückenhafte linienförmige luminale Schleimschicht im Jejunum, konv., 21 Tage alt, Gelbe Pfeile markieren die luminale Schleimschicht, lückenhaft und im linken Bildbereich nicht mehr sichtbar. PAS-Diastase-Färbung

In Abbildung 28 ist ein Abschnitt eines Kolonpräparats mit einer kontinuierlichen luminalen Schleimschicht (Abstufung 3) dargestellt. Bereits bei diesem drei Tage alten Huhn zeigt sich oberhalb der Zottenspitzen eine durchgehende Schleimschicht, die mit PAS-Färbung nach Diastase-Vorverdauung sichtbar ist.

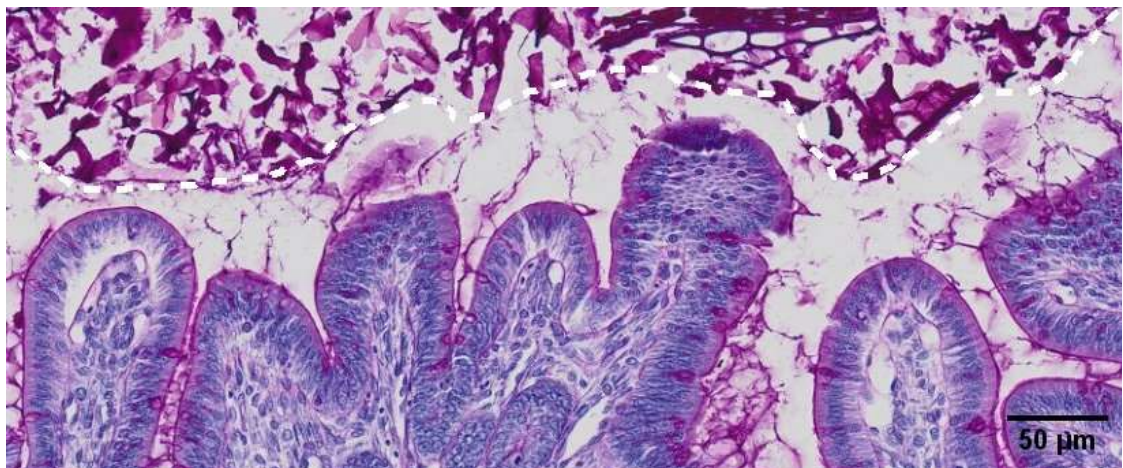


Abbildung 28: Luminale Schleimschicht im Kolon, kontinuierlich, konv., 3 Tage alt, gestrichelte Linie = Grenze zwischen Schleimschicht und Ingesta

Auch hier stützen statistische Auswertungen die Beobachtung ($p < 0,001$). Die Kontinuität wurde bei jedem Präparat in vier Abstufungen eingeteilt. Es zeigt sich, dass etwa die Hälfte der Präparate in beiden Darmabschnitten die Einstufung 1 überwiegend unterbrochen aufweist. Die verbleibenden 50 % verteilen sich im Jejunum und Kolon unterschiedlich: Im Jejunum liegt etwa ein Viertel der Präparate in der Einstufung 0 (keine Kontinuität) und ein weiteres Viertel in Einstufung 2 (kurz unterbrochen); nur wenige Präparate weisen eine kontinuierlich zu verfolgende Schleimschicht (Einstufung 3) auf. Im Kolon erreichen die restlichen 50 % eine höhere Kontinuität: circa ein Drittel ist kurz unterbrochen (Einstufung 2), 12,5 % kontinuierlich (Einstufung 3) und 6,25 % gar nicht zu verfolgen (Einstufung 0).

Es ist zu beobachten, dass in beiden Darmbereichen die Kontinuität mit dem Alter zunimmt (Jejunum $p = 0,002$, Kolon $p = 0,015$). Die Werte im Jejunum und Kolon unterscheiden sich in den Altersgruppen 3 Tage bis 28 Tage nach dem Schlupf jedoch nicht signifikant voneinander ($p = 0,126$). Erst bei den 55 Tage alten Tieren zeigt sich ein klar signifikanter Unterschied zwischen den Darmabschnitten zugunsten einer höheren Kontinuität im Kolon im Vergleich zum Jejunum ($p < 0,001$).

1.3. Lage der Bakterien

1.3.1. Jejunum

Die Lage der Bakterien in Bezug zur Schleimschicht konnte durch Gram-Färbungen dargestellt werden. Im Jejunum existiert luminal oberhalb der Zottenspitzen eine abgelöste, linienförmige Schleimschicht, die Bakterien enthält. Diese unterscheidet sich in der Farbe vom Zwischenzottenschleim durch die Bakterienbeimengungen.

Schon bei den jüngsten, drei Tage alten Hühnern lassen sich im Jejunum mithilfe der Gram-Färbung sowohl im Darminhalt als auch in der luminalen Schleimschicht Bakterien darstellen. Abbildung 29 veranschaulicht dies bei einem drei Tage alten Huhn. Die Bakterien sind als circa 1 bis 3 μm große stäbchen- oder punktförmige Verdunkelungen, dunkelblau oder rot eingefärbt, im leuchtend hellblauen Schleim zu erkennen. Im spitzennahen Bereich

zwischen den Zotten findet sich deutlich weniger Bakterien im Schleim. Nur im spitzennahen Bereich zwischen den Zotten sind noch einzelne Bakterien sichtbar; in Richtung Krypten treten keine mehr auf. Die roten Pfeile weisen auf den Zwischenzottenschleim hin, der in diesem Bild strangartig erscheint. Die Ablösung der luminalen Schleimschicht vom Epithel ist durch schwarze Doppelpfeile gekennzeichnet.

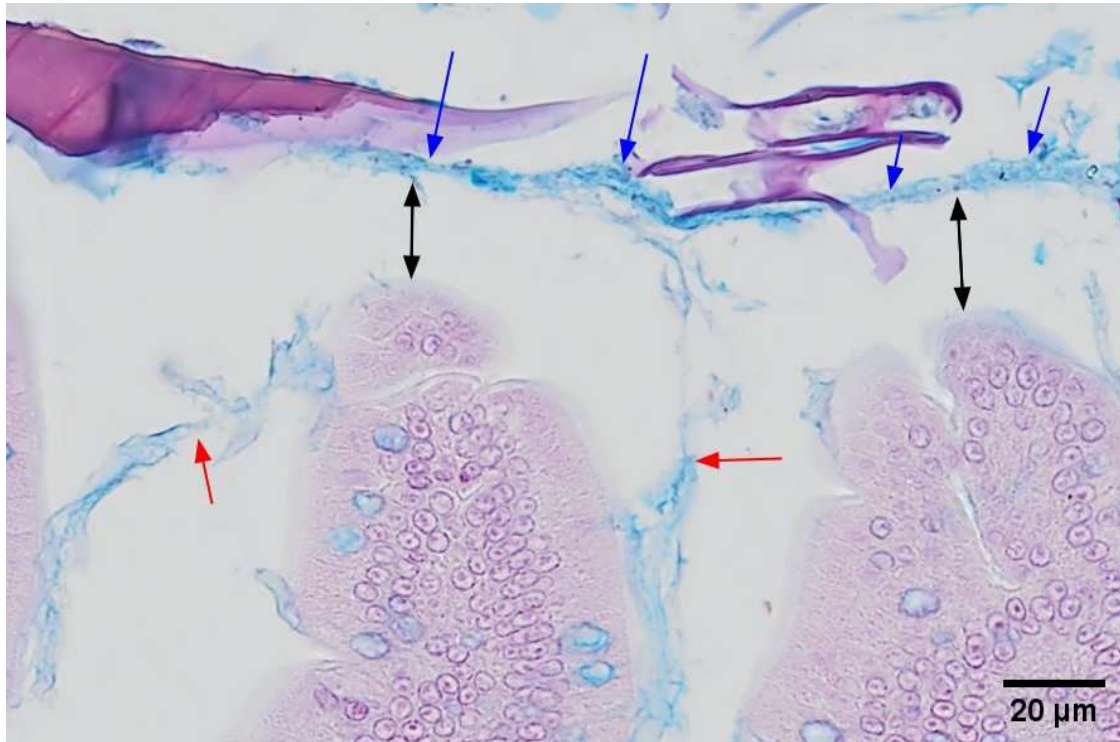


Abbildung 29: Bakterien in der luminalen Schleimschicht, nicht in den tieferen Bereichen des Schleims zwischen den Zotten, Jejunum, konv., 3 Tage alt, blauer Pfeil: luminaler Schleim; dunkle Punkte und Stäbchen in der Schleimschicht entsprechen durch Gram-Färbung gefärbten Bakterien rote Pfeile: Schleim zwischen den Zotten schwarze Doppelpfeile: Ablösung der Schleimschicht von den Zottenspitzen-Epithelien, Gram-AB 2.5-Färbung

In Abbildung 30 wird zur Veranschaulichung bei einem 55 Tage alten Huhn die luminal Schleimschicht im Jejunum als vergrößerte Darstellung gezeigt, wobei zahlreiche eingemischte Bakterien sichtbar sind. Die Ausdehnung der luminalen Schicht wird durch zwei schwarze Doppelpfeile markiert. Die Ablösung der luminalen Schleimschicht vom Epithel lässt sich durch einen roten Doppelpfeil erkennen.

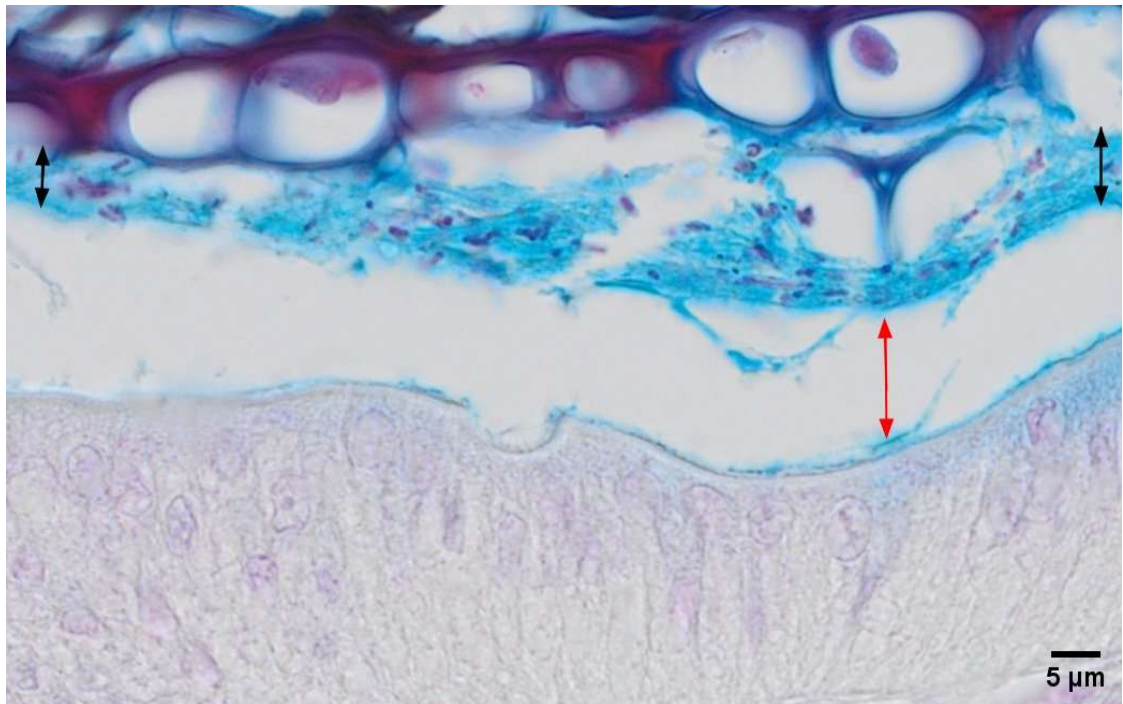


Abbildung 30: Bakterien in der luminalen Schleimschicht, Jejunum, konv , 28 Tage alt
Schwarze Doppelpfeile: luminal Schleimschicht mit eingemischten Bakterien, **roter Doppelpfeil:** Ablösung der luminalen Schleimschicht vom Epithel, Gram-AB; pH 2,5-Färbung

1.3.2. Kolon

Im Darminhalt des Kolons lassen sich im Vergleich zum Jejunum deutlich mehr Bakterien nachweisen. Es lassen sich verschiedene kokkoide und stäbchenförmige Keime erkennen.

Die dem Lumen zugewandte Schleimschicht ist im Allgemeinen deutlich prominenter als im Jejunum. In den Zottenspitzenregionen findet sich stark bakterienhaltiger Darminhalt. Die Schleimschicht enthält vereinzelt im obersten Spitzenbereich Bakterien. In der Spitzenregion lassen sich auch zwischen den Zotten Bakterien nachweisen, die typischerweise im oberen Bereich zwischen den Zotten auftreten und nicht direkt an das Epithel herankommen. An den apikalen Spitzen der Zotten bestehen Areale ohne Schleimabdeckung, an die der bakterienhaltige Darminhalt gelangen kann.

Wie in Abbildung 31 zu erkennen ist, lassen sich bereits bei drei Tage alten Küken Bakterien im Darminhalt nachweisen. Die Bakterien sind circa 1–3 µm

große Partikel mit dem typischen kugel- oder stäbchenförmigen Erscheinungsbild, häufig in aggregierten Gruppen. Die Schleimschicht über den Zottenspitzen ist bei diesem noch sehr jungen Tier dünn; daher grenzt der Darminhalt vielerorts an das Schleimhautepithel. Meist gelangen die darin befindlichen Bakterien jedoch nicht direkt an das Epithel, da, wie in der linken unteren Ecke in Vergrößerung zu erkennen, eine dünne bakterienfreie Schleimschicht den Kontakt zum Epithel abgrenzt. Die Grenze zwischen der bakterienfreien Schleimschicht und dem bakterienhaltigen Darminhalt ist durch eine gestrichelte Linie verdeutlicht. In Richtung der Krypten zwischen den Zotten ist der leuchtend blaue, wabenartig geschrumpfte Schleim ebenfalls bakterienfrei. Eine Verbindung zwischen Becherzellöffnungen und der Schleimschicht bestätigt die Herkunft des Schleims aus den Becherzellen.

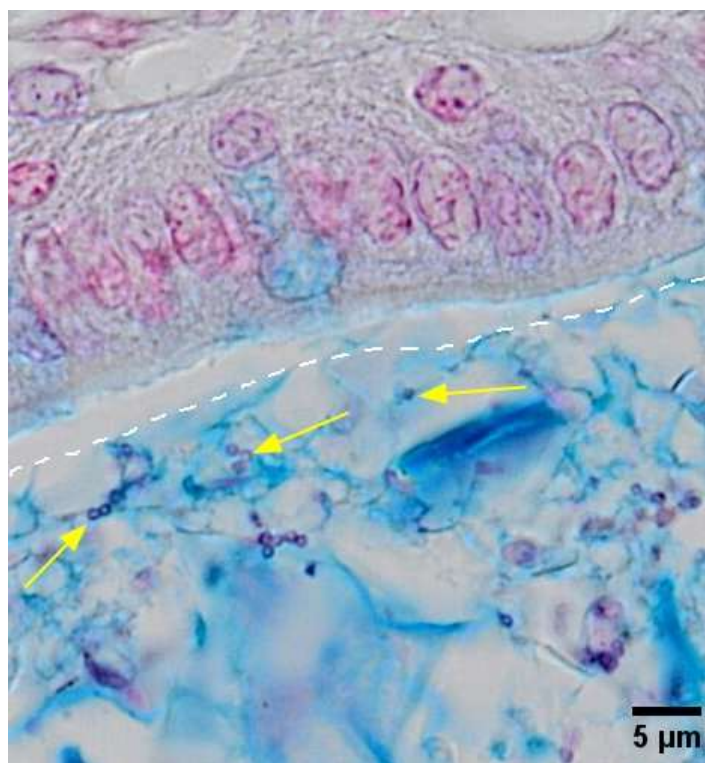
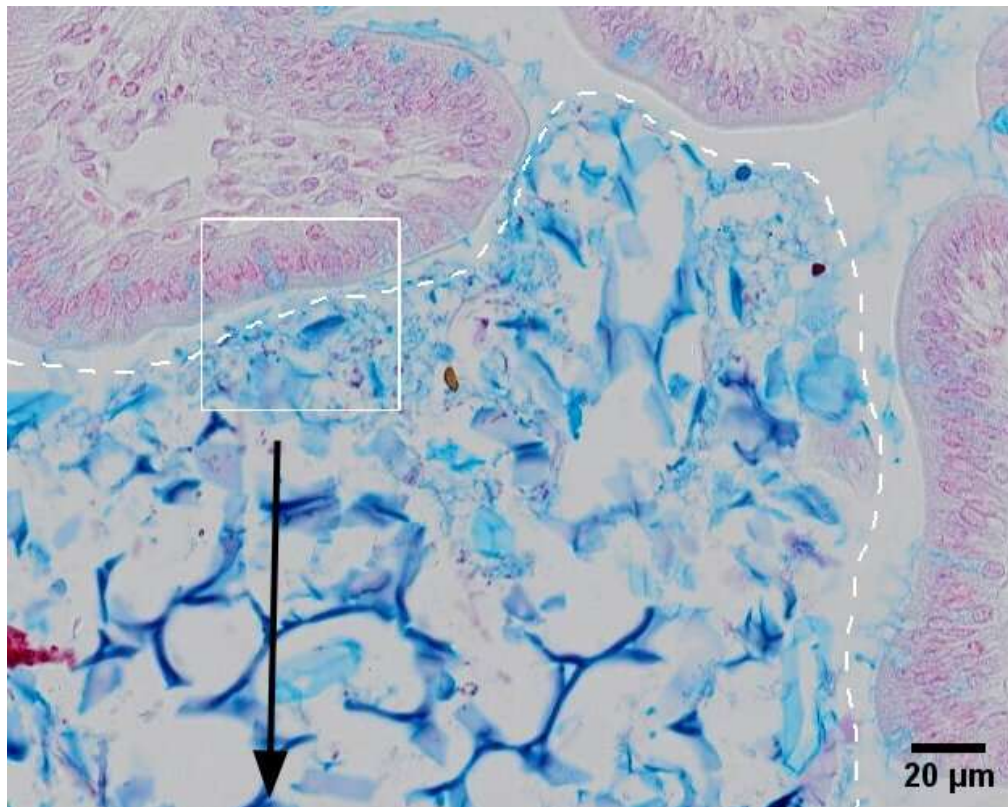


Abbildung 31: Dünne luminale Schleimschicht bei drei Tage alten Huhn trennt Epithel vom bakteriendurchsetzten Darminhalt, Zottenzwischenräume bakterienfrei, Kolon, konv., unten: in Vergrößerung, Gestrichelte Linie: Grenze der luminalen Schleimschicht zum Darminhalt, gelbe Pfeile: Bakterien im Darminhalt nahe Schleimschicht, AB 2.5--Gram-Färbung

Bei den Präparaten älterer Hühner ist die bakterienarme Schleimschicht, die dem Epithel der Zottenspitzen angrenzend liegt, deutlich prominenter. Wie in Abbildung 32 bei einem 28 Tage alten Tier zu erkennen ist, ist die durch einen schwarzen Pfeil im oberen Bildabschnitt bzw. in der Vergrößerung im unteren Bildabschnitt gekennzeichnete Schleimschicht deutlich sichtbar. In diesem Präparat grenzt die Schleimschicht an eine feingranulierte Schicht mit vielen verschieden geformten Bakterien, die parallel zum Epithel oder zur Schleimschicht verläuft und keine groben Futterbestandteile enthält. Diese Schicht wurde durch rote Doppelpfeile angedeutet. Weiter ins Darminnere hinein erkennt man im Darminhalt überwiegend Pflanzenteile, während die der Schleimschicht angrenzende, verdichtete, bakterienreduzierte Schicht nur wenige grobe unverdaute Pflanzenteile zeigt. Die Schleimschichtabdeckung der Zottenspitzen enthält, wie bei höherer Vergrößerung im unteren Bildabschnitt ersichtlich, vereinzelt, aber wenige, Bakterien, die sich nur oberhalb der Zottenspitzen finden lassen; tiefer Richtung Krypten treten sie nicht mehr auf.

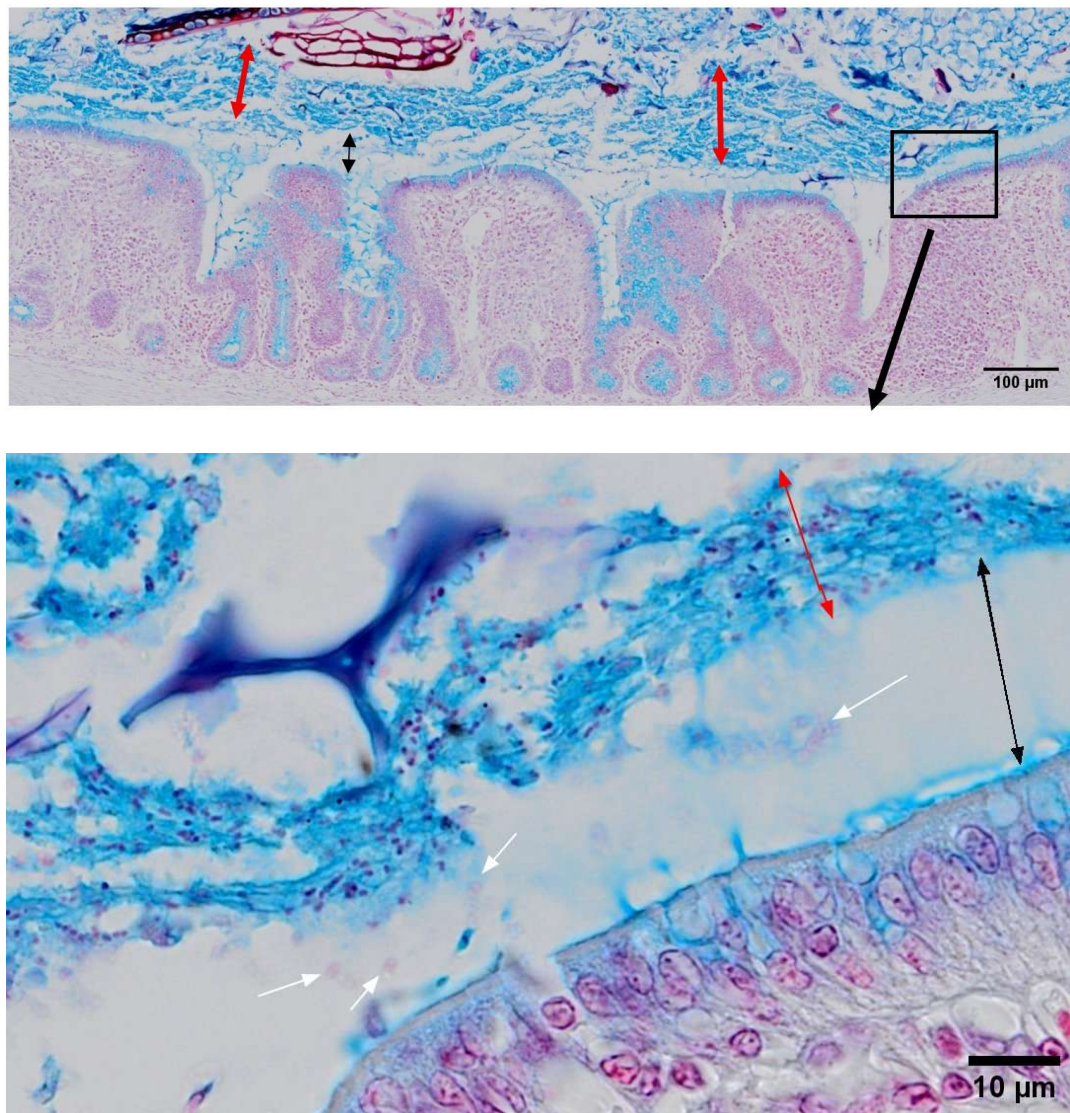


Abbildung 32: Breite, zottenspitzenzugewandte bakterienarme Schleimschicht mit angrenzender bakteriendichter feingranulierter Schicht, Kolon, konv., 28 Tage alt, Unterer Bildabschnitt: vergrößerte Ansicht des oberen Bildabschnitts; schwarzer Doppelpfeile: luminale Schleimschicht; mit wenigen Bakterien (weiße Pfeile), roter Doppelpfeile: bakteriendichte feingranulierte Schicht, AB 2.5–Gram-Färbung

Abbildung 33 zeigt eine Dickdarmfalte dessen Schleim, durch die AB-pH 2,5-Gram-Färbung sichtbar gemacht wurde und von hellblauem Schleim umfasst ist. Der angrenzende Darminhalt ist farblich violett gut von der blauen Schleimschicht zu unterscheiden. Die Grenze zwischen Darminhalt und Schleimschicht ist deutlich zu erkennen.

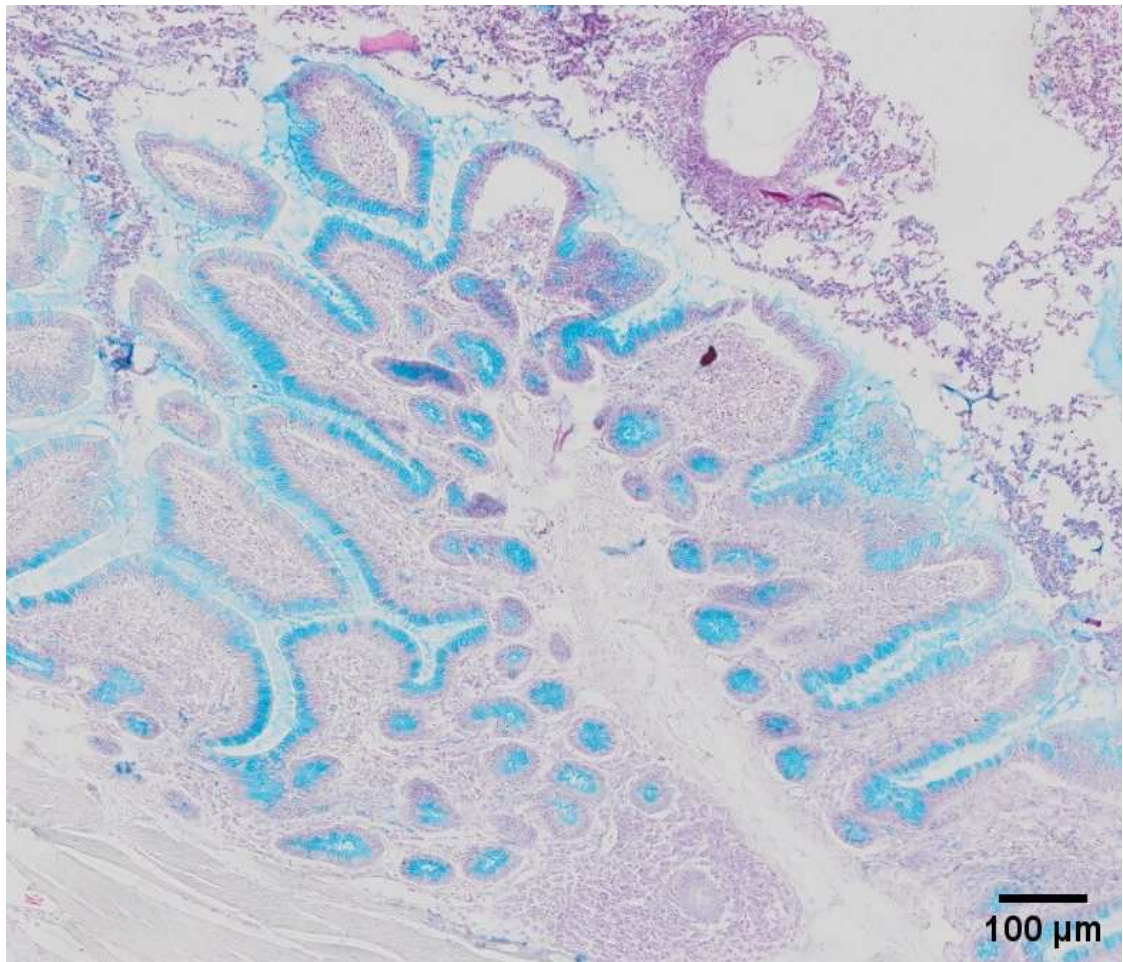


Abbildung 33: Dicke Schleimschicht umhüllt komplette Schleimhautfalte im Kolon konv., 55 Tage alt, Grenze zwischen Schleimschicht (leuchtend blau) und Darminhalt (lila), Färbung: AB 2.5–Gram-Färbung

Abbildung 34 zeigt ein Präparat mit einem typischen Zwischenzottenspalt, in dem Bakterien im oberen Bereich V-förmig zwischen den Zotten nach unten ziehen und nur wenig oder gar keinen Kontakt zur epithelnahen Zone aufnehmen. Der untere Zwischenzottenspalt ist bakterienfrei und mit Schleim gefüllt.

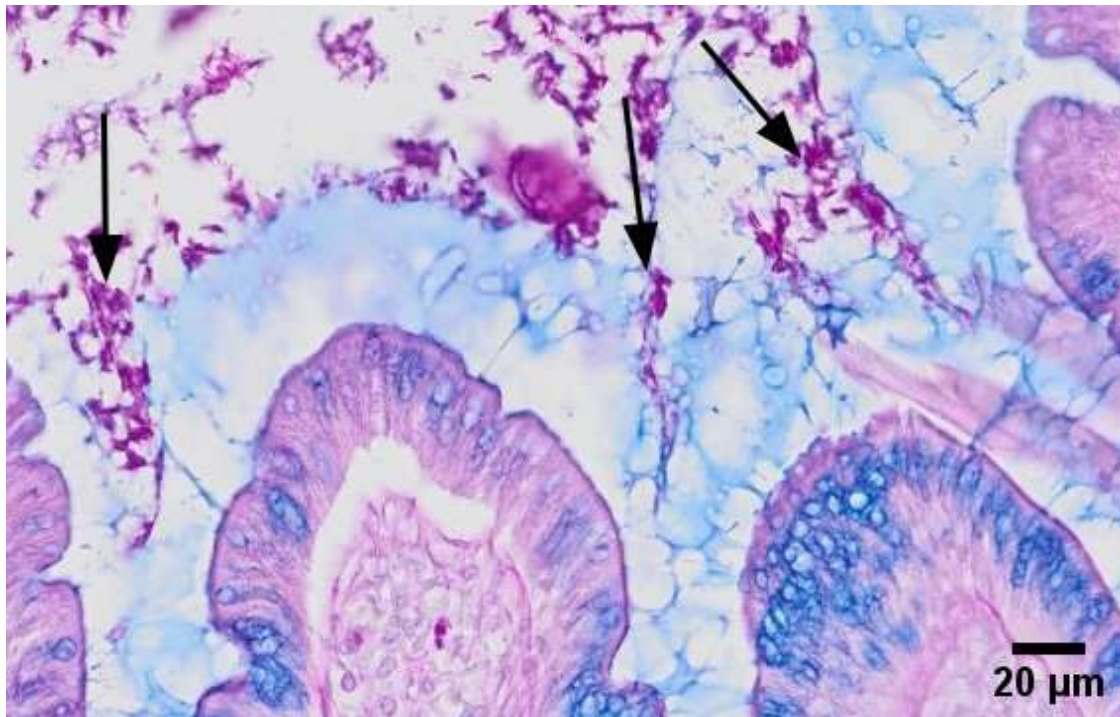


Abbildung 34: Bakterien V-förmig im Spitzenbereich des Zwischenzottenspalt Kolon konv., Bakterienfreie luminale Schleimschicht im oberen Spitzenbereich V-förmige Bakterien zwischen zwei Zotten, untere Zwischenzotten bakterienfrei, Kolon, konv., 55 Tage alt, AB 2.5-Gram-Färbung

2. Einfluss der Haltungsformen

2.1. Schleim zwischen den Zotten

Im Jejunum reicht der Schleim in der konv. Gruppe oft nicht bis zum luminalen Schleim; der Schleim zwischen den Zotten endet in der Regel in den oberen Bereichen der Zottenspitzen. Bei der GF und der SPF Gruppe ist dieses Phänomen signifikant seltener zu beobachten ($p < 0,001$). Dort reicht der Schleim dieses Bereichs meist bis an die luminale Schleimschicht an den Zottenspitzen heran und verbindet sich dort häufiger mit dieser. Außerdem lassen sich im Jejunum keine weiteren ersichtlichen Unterschiede hinsichtlich Lage und Menge des Schleims zwischen den drei Haltungsformen beschreiben. In allen drei Haltungsformen finden sich Futterbestandteile ausschließlich in den oberen Bereichen des Zottenzwischenraums in Richtung Zottenspitzen und nicht in den tieferen Regionen Richtung Krypten.

Der Farbverlauf des Schleims von blau-violett im Kryptbereich zu rot-violett im Spitzenbereich, der in der PAS-AB-Gram-Färbung in der konv. Gruppe im Jejunum und Kolon auffällig war, ist auch bei den GF und SPF Tieren im Jejunum festzustellen, wie Abbildung 35 zeigt.

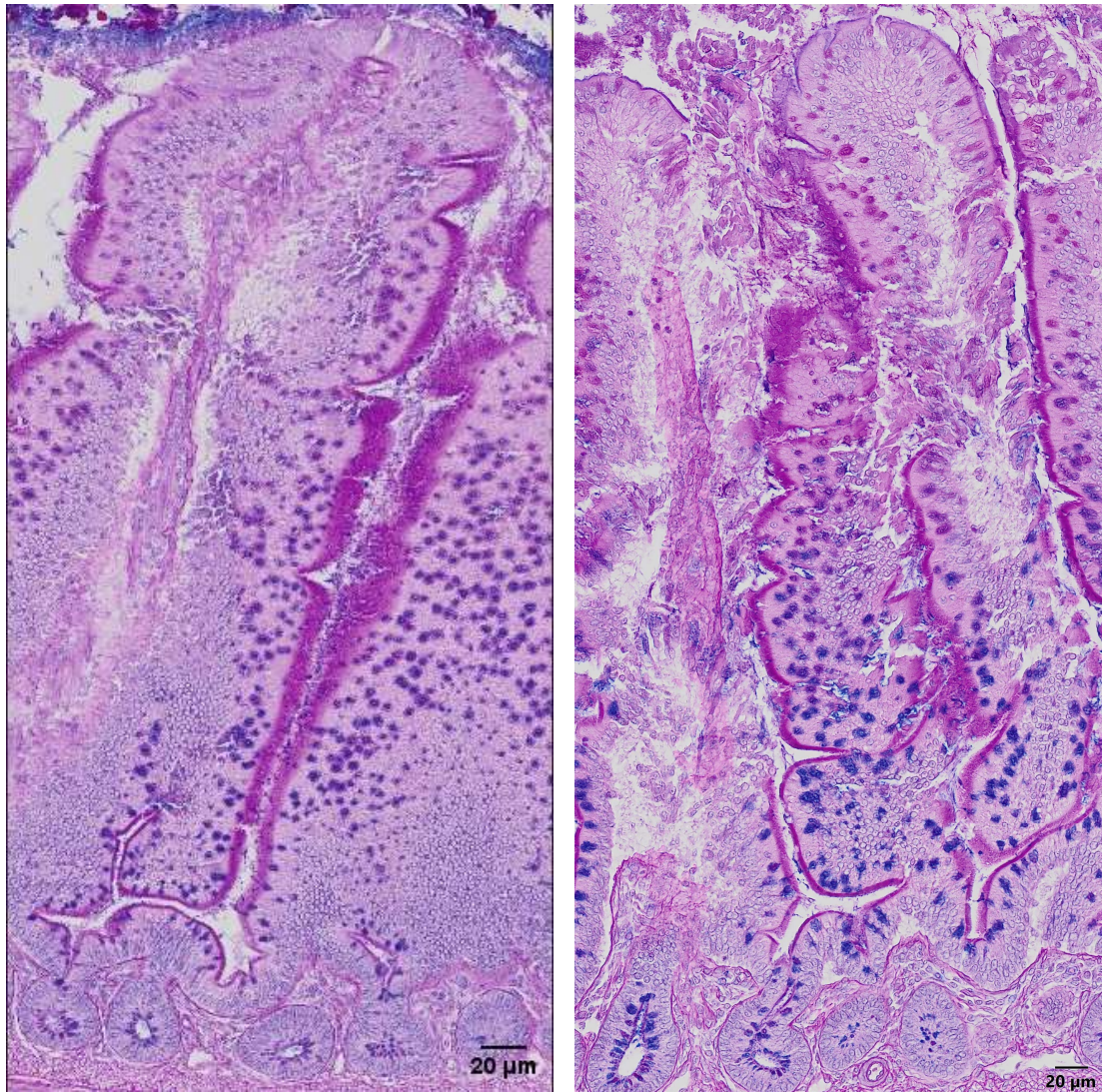


Abbildung 35: sichtbarer Farbverlauf im Jejunum GF und SPF in der AB-PAS-Färbung blau-violett im unteren Zottenbereich bis rot-violett im oberen Zottenbereich, sichtbar im Jejunum: links GF, rechts SPF

Im Kolon der 55 Tage alten Tiere ist der Schleim zwischen den Zotten in allen drei Haltungsformen gut ausgebildet; tiefer zwischen den Zotten finden sich keine Futterbestandteile. Bei der AB-PAS-Färbung zeigt sich im Kolon der GF Tiere ein nur sehr schwacher Verlauf mit leicht rötlicherem Schleim der Becherzellen an den Zottenspitzen im Vergleich zu den unteren Becherzellen

der Krypten. Bei den SPF Tieren lässt sich gar kein Farbverlauf beobachten; der Schleim ist bläulich-violett gefärbt, ohne Unterschiede von oben nach unten. Abbildung 36 illustriert dies anhand zweier Bilder: GF Gruppe (links) und SPF Gruppe (rechts).

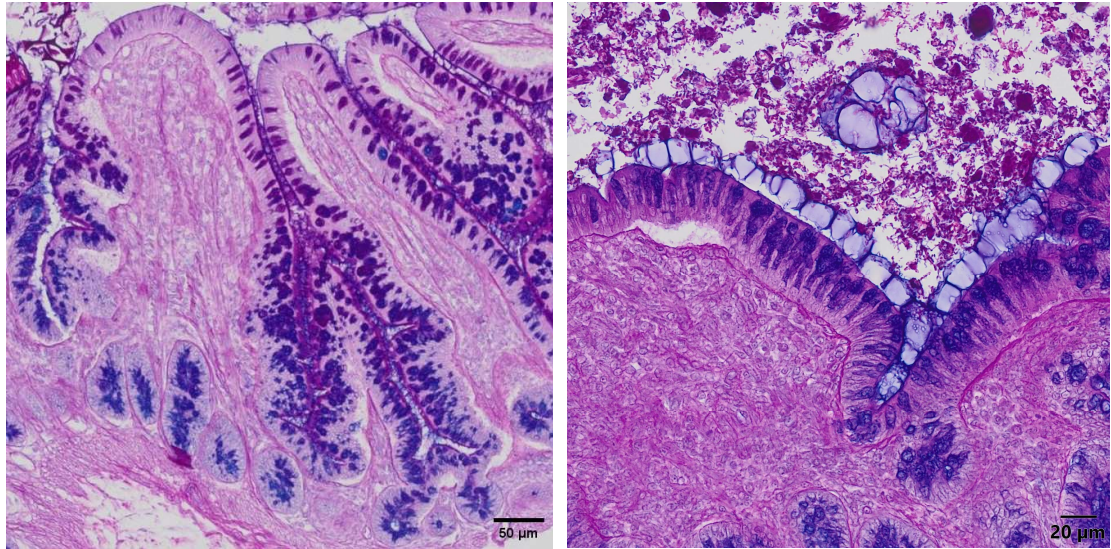


Abbildung 36: leichter bis kein Farbverlauf im Kolon GF und SPF in der AB-PAS-Färbung, GF (links) nur schwach, SPF (rechts) nicht sichtbar

Im Zäkum finden sich generell sehr flache Zottenzwischenräume, an denen an wenigen einzelnen Stellen Schleim erkannt werden kann. Der Schleim der Becherzellen kann für den Vergleich in der AB-PAS-Färbung herangezogen werden. Im Zäkum kann dabei in keiner der beiden Haltungsförmn ein Farbverlauf auf der Villus-Krypt-Achse festgestellt werden. Der Schleim der Becherzellen ist sowohl in den Krypten als auch an den Zottenspitzen gleich blau-violett gefärbt.

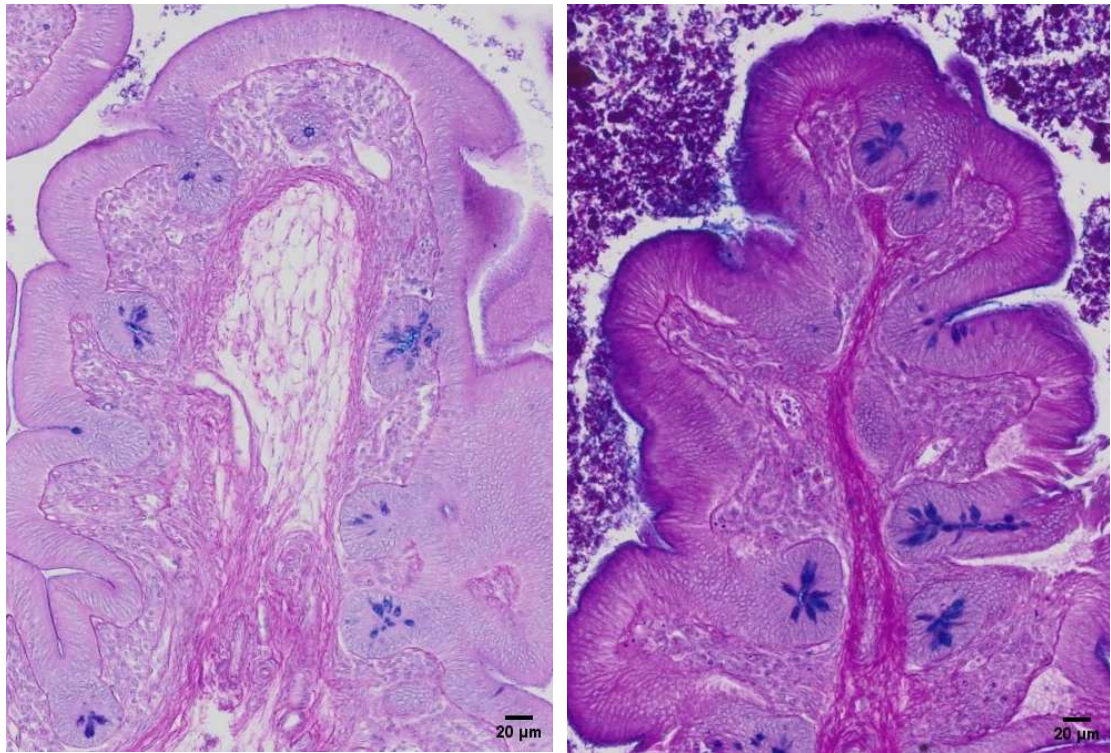


Abbildung 37: kein Farbverlauf im Zäkum in der AB-PAS-Färbung, links: GF, rechts: SPF

Bei dem statistischen Vergleich der subjektiv beurteilten Schleimmenge jedes Präparats konnten interessante Ergebnisse erzielt werden. Unter Einbezug von ausschließlich 55 Tage alten Tieren und der Mittelwertbildung der vier Unterstufungen der Schleimmenge je Haltungsform und Darmabschnitt ergeben sich vergleichbare Muster: Die höchste Schleimkonzentration liegt im Kolon zwischen den Zotten, gefolgt vom Jejunum und Zäkum ($p < 0,001$), während im Zäkum praktisch kein Schleim nachweisbar ist; im Jejunum erreicht die Gruppe der SPF Tiere den höchsten Wert ($p < 0,001$), insgesamt leicht „wabenartig“ im Mittel, während die GF und konv. Gruppen im Mittel „schnurartig“ erscheinen. Im Kolon zeigen die drei Haltungsformen ähnliche Werte mit dem Muster „wabenartig“. und die Zäkum-Werte verbleiben aufgrund der geringen Fallzahl ohne statistische Unterschiede.

2.2. Luminale Schleimschicht

2.2.1. Dicke der Schleimschicht

Analog zur konv. Gruppe zeigt sich auch in der GF sowie in der SPF Gruppe eine prominentere und breitere luminale Schleimschicht im Kolon im Vergleich zum Jejunum. Im Zäkum konnte jedoch keine Schleimschicht nachgewiesen werden; lediglich vereinzelt wurden kleine Schleimansammlungen identifiziert.

Durch die Vermessungsarbeiten der luminalen Schleimschichtdicke wurde diese Beobachtung bestätigt, wie Abbildung 38 zeigt. Das Kolon wies die höchsten Werte auf, gefolgt vom Jejunum und schließlich dem Zäkum ($p < 0,001$). Darüber hinaus ergibt sich, dass die GF Versuchsgruppe in allen drei Darmabschnitten leicht höhere Werte zeigt als die SPF Gruppe ($p = 0,001$). Die Schleimdicke bei den konv. gehaltenen Tieren ist in allen Darmabschnitten nur leicht und nicht signifikant dicker als bei den GF-Tieren ($p = 1,000$), während der Unterschied zu den SPF-Tieren, die in allen drei Darmabschnitten eine besonders dünne Schleimschicht aufweisen, besonders deutlich ist ($p = 0,007$).

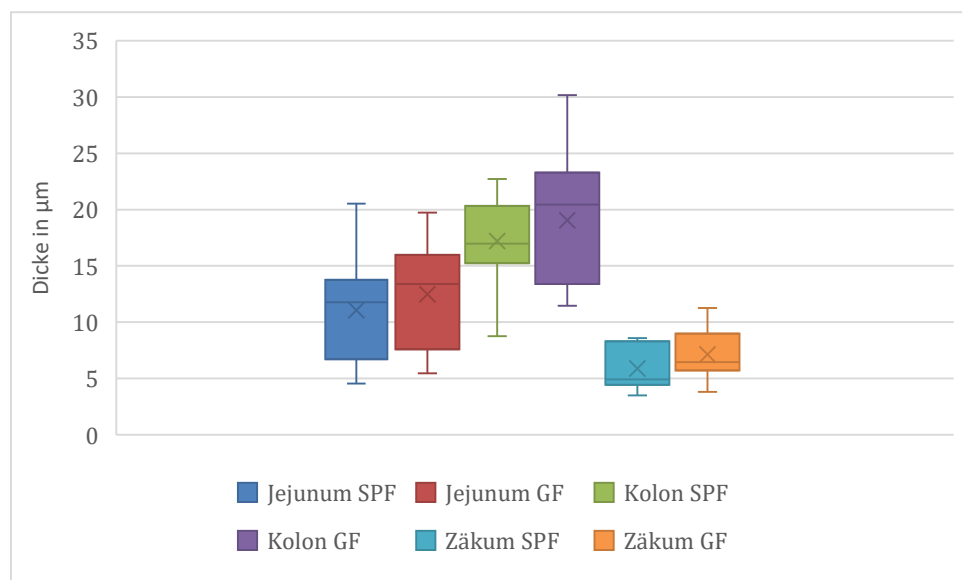


Abbildung 38: Vergleich der luminalen Schleimschichtdicke zwischen GF und SPF Gruppe in den drei Darmabschnitten, Kolon: höchste Werte; Jejunum: mittlere Werte; Zäkum: niedrigste Werte, GF Gruppe zeigt in allen drei Abschnitten signifikant geringfügig höhere Werte als die SPF-Gruppe ($p < 0,001$)

Im Folgenden werden die luminalen Schleimschichten in den jeweiligen Darmabschnitten für die GF und die SPF Gruppe beschrieben.

Im Jejunum liegt die dünne luminale Schleimschicht sowohl in der GF als auch in der SPF Gruppe unmittelbar an den Zottenspitzen. Zwischen zwei Zottenspitzen überspannt sie den Zottenzwischenspalt. In Abbildung 39 wird durch schwarze Pfeile eine gut verfolgbare luminale Schleimschicht bei einem SPF Huhn im Jejunum dargestellt. Im linken Bildabschnitt lässt sie sich nicht mehr rekonstruieren; lediglich das Epithel selbst weist dort eine feine blaue Auflagerung auf. Die luminale Schleimschicht zeigt an mehreren Stellen eine parallel zum Epithel verlaufende Streifung, insbesondere im rechten Teil der durch die schwarzen Pfeile markierten luminalen Schleimschicht.

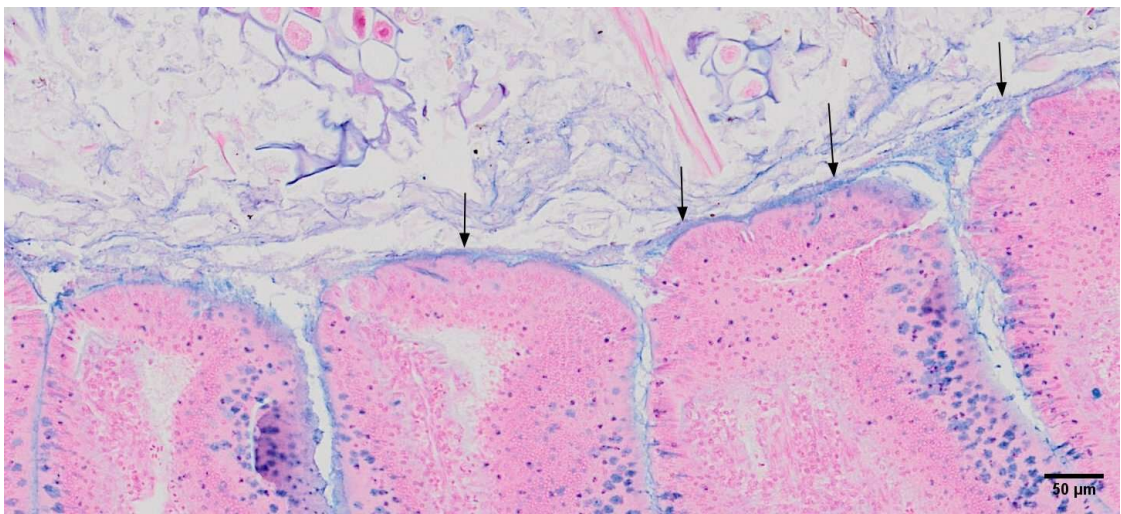


Abbildung 39: Dicht am Epithel anliegende Schleimschicht, Jejunum, SPF , 55 Tage alt, Schwarze Pfeile: Lumen-nahe Schleimschicht mit Streifung parallel zum Epithel, links nicht mehr nachverfolgbar; AB 1.0

Die parallel zum Epithel gerichtete Streifung der luminalen Schleimschicht ist auch in Abbildung 40 bei einem anderen Tier derselben Versuchsgruppe zu erkennen; die Streifen sind hierbei in unterschiedlichen Farben gefärbt. Zum Epithel ausgerichtet, ist sie dort blau gefärbt und enthält anschließend Streifen, die rosa oder rosa-blaue Durchsetzung aufweisen.



Abbildung 40: Schleimschicht mit parallel zum Epithel verlaufender Streifung im Jejunum; SPF, 55 Tage alt, weißer Doppelpfeil: fein laminierte luminale Schleimschicht, direkt auf Zottenspitzen-Epithel, AB 2.5

Nach der subjektiven Beurteilung am Mikroskop sind die Dickenunterschiede der Schleimschicht im Jejunum nicht abhängig von der Haltungsform. Die Morphometrie ergab im Jejunum bei GF gehaltenen Hühnern die höchsten Werte, gefolgt von SPF und konv. Tieren, wie in Abbildung 49 dargestellt, wobei die Unterschiede nur sehr gering und nicht signifikant sind ($p=0,208$).

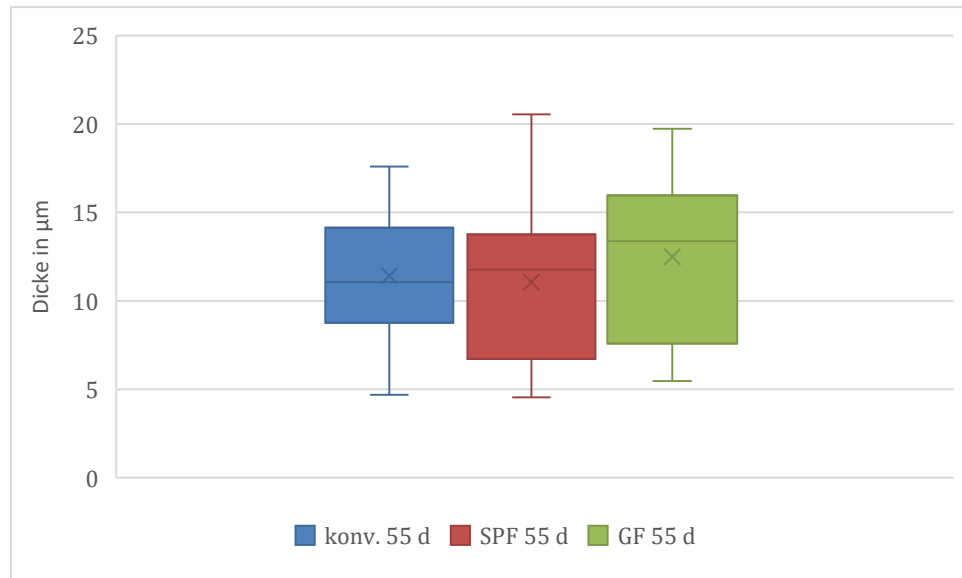


Abbildung 41: Grafische Gegenüberstellung der Schleimschichtdicke im Jejunum in den drei Haltungsformen (konv., SPF, GF)

Die Färbungen beeinflussen die Ergebnisse. Ähnlich wie bei den Messunterschieden im Jejunum der konv. Gruppe konnten auch in der GF und SPF Gruppe bei den drei Färbereihen PAS, AB 1.0 und AB 2,5 im Vergleich zu den Färbereihen PAS-Diastase, AB 2,5-Gram und PAS-AB 2,5-Gram höhere Messergebnisse erzielt werden ($p < 0,001$). Abbildung 42 veranschaulicht dies im Vergleich der ersten drei genannten Färbereihen mit den drei zuletzt genannten Färbereihen.

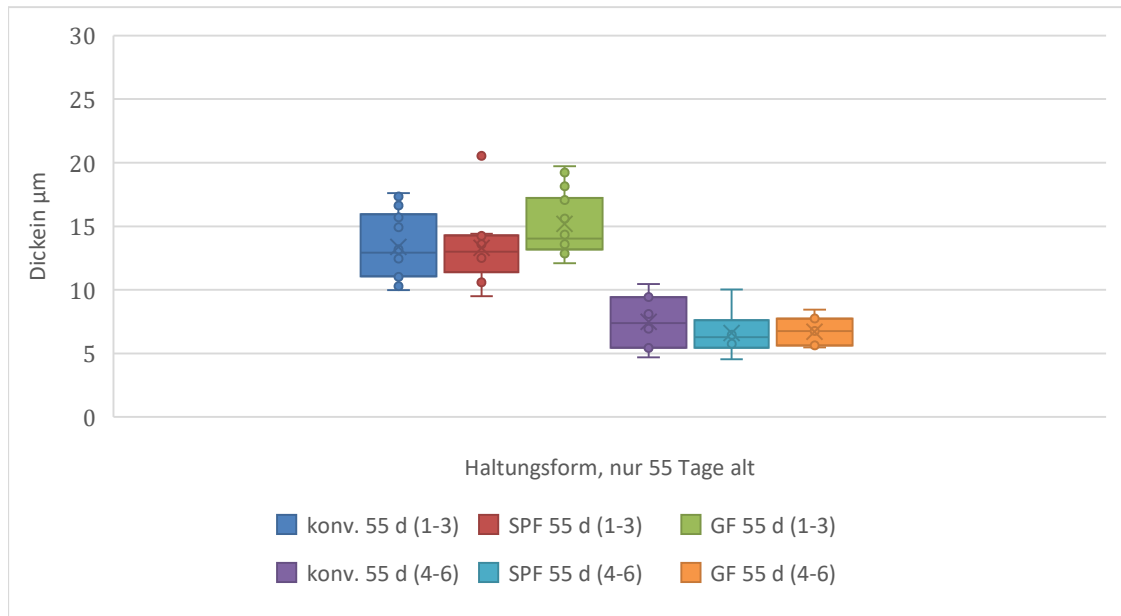


Abbildung 42: Grafische Gegenüberstellung des Einflusses der Färbung auf die luminale Schleimschichtdicken-Messungen im Jejunum. Vergleich zwischen GF, SPF und konv. Haltung Untersuchte Tiere: 55 Tage alt. Färbungen: 1) PAS, 2) AB 1.0, 3) AB 2.5, 4) PAS-Diastase, 5) AB2.5-Gram, 6) AB2.5-PAS-Gram

Im Kolon wirkt die luminale Schleimummantelung der Schleimhautfalten bei der SPF sowie GF Gruppe deutlich weniger ausgeprägt als bei gleichaltrigen konv. Tieren. Dies soll durch die vergleichende Darstellung von drei Präparaten der drei Haltungsformen bei gleichem Alter in Abbildung 43 verdeutlicht werden. Im Bildabschnitt A ist das konv. Präparat zu sehen; die Schleimummantelung reicht hier bis über die Zottenspitzen hinaus. Bei den SPF und GF Tieren, in den Bildabschnitten B und C ersichtlich, lässt sich eine homogene Schleimummantelung nur in den Zottenzwischenräumen, nicht jedoch an den Zottenspitzen finden. Einige Falten zeigen an der Epitheloberfläche keine Schleimummantelung; dort liegen teilweise Ingesta direkt am Epithel. Morphologisch sind zwischen den GF und SPF Präparaten keine Unterschiede festzustellen. In beiden gnotobiotischen Gruppen sind die Zottenspitzen teilweise ohne Schleimschicht und blasig aufgeworfen, während die Zottenzwischenräume gut gefüllt bleiben.

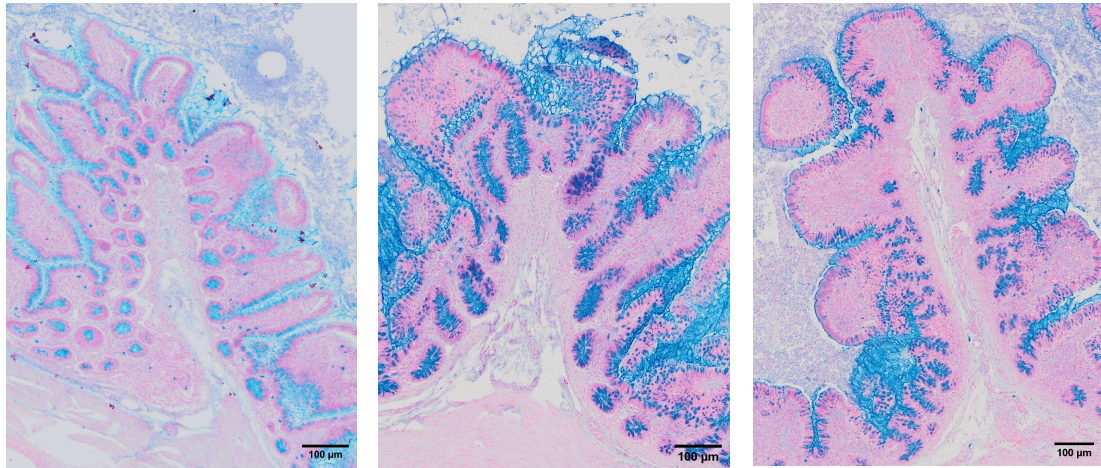


Abbildung 43: Vergleich Schleimhautfalten mit Schleimschicht Kolon bei konv., GF und SPF, alle 55 Tage alt; AB 1,0-Färbung, A. konv. Haltung, hellblaue Schleimschicht ragt knapp über Zottenspitzen hinaus B. SPF Haltung, dünner Saum an Schleim an den Zottenspitzen, blasig aufgeworfen C. GF Haltung, blasiges Aussehen des Schleims mit deutlichen Lücken an den Zottenspitzen

Die Morphometrie bestätigt diese Beobachtung. Die konventionell gehaltene Gruppe weist die höchsten Mittelwerte der Schleimschichtdicke auf, wie Abbildung 44 veranschaulicht (konv. vs SPF $p=0,008$; konv. vs GF $p=0,056$). Die GF gehaltene Gruppe weist nur geringfügig höhere Werte als die SPF gehaltene Gruppe ($p=1,000$).

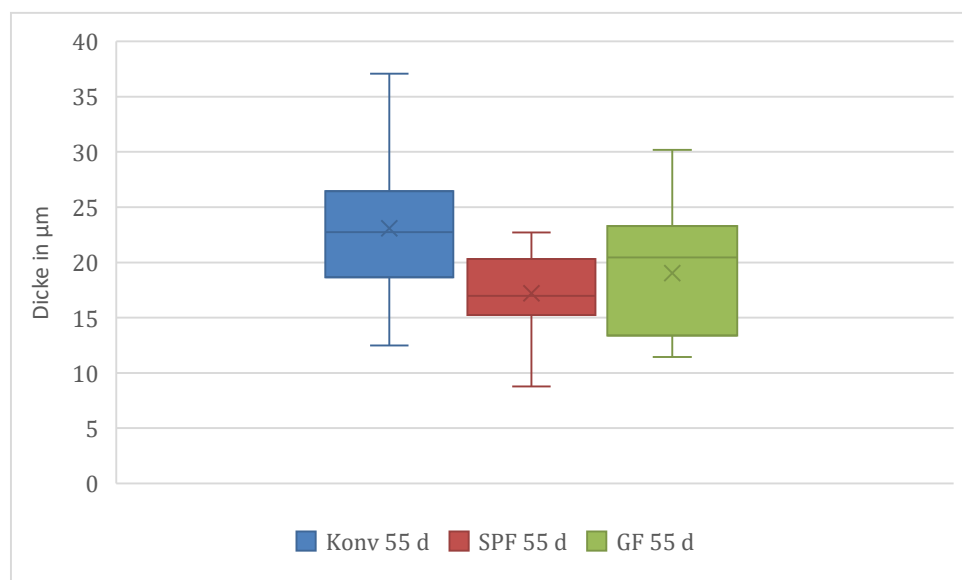


Abbildung 44: Grafische Gegenüberstellung der Schleimschichtdicken im Kolon, Haltungsförmungen im Vergleich

Abbildung 45 vergleicht die verschiedenen Färbungen. Im Kolon waren die Abhängigkeiten der Schleimdicke von der Färbemethode nicht signifikant ($p=0,743$).

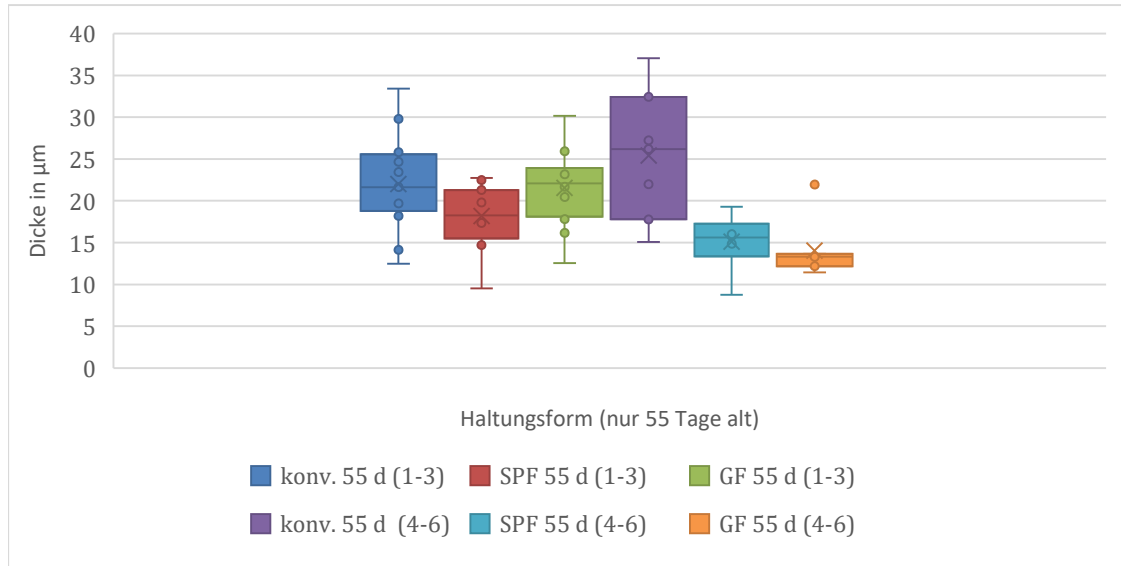


Abbildung 45: Grafische Gegenüberstellung des Einflusses der Färbungen auf die Messergebnisse im Kolon bei der GF, SPF und konv. Gruppe, Färbungen: 1) PAS, 2) AB 1.0, 3) AB 2.5, 4) PAS-Diastase, 5) AB2.5-Gram, 6) AB2.5--PAS-Gram

In den Präparaten des Kolons fällt im Vergleich der Haltungsformen außerdem auf, dass in den Präparaten der SPF und GF Gruppe der Schleim deutlich in Blasen zu beobachten ist. In der konv. Gruppe ist dies nicht in vergleichbarer Weise vorhanden. In Abbildung 46 markiert, ebenfalls bei einem SPF Kolon, eine gestrichelte Linie die Grenze zwischen Ingesta und Schleimschicht. Der Schleim wirkt dort blasig. Der bakteriendichte Darminhalt wird durch die dünne Schleimschicht vom Epithel abgetrennt. Die Zottenzwischenräume sind ebenfalls mit Schleim gefüllt, und dort lassen sich keine Bakterien nachweisen.

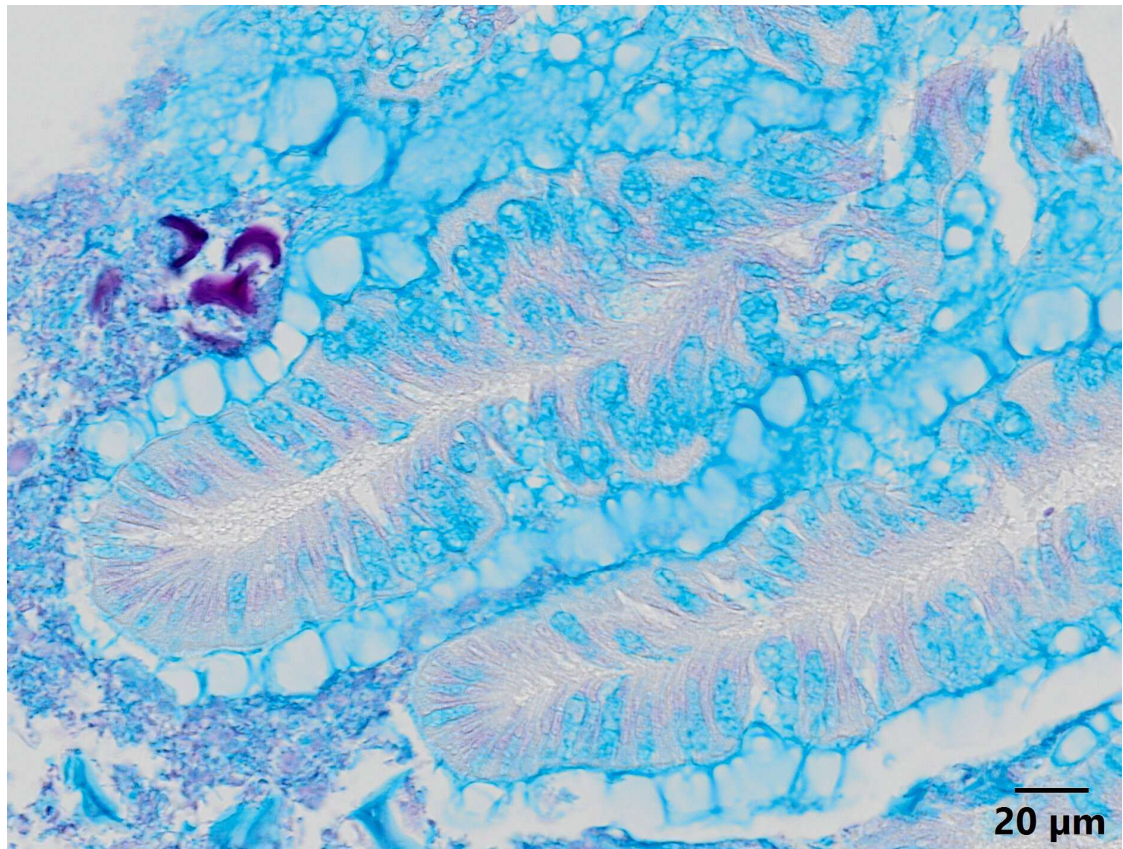


Abbildung 46: Dünne, blasig-aufgeworfene Schleimschicht umhüllt mehrere Zotten, im Kolon SPF ,55 Tage alt, AB 2.5-Gram-Färbung

Im Zäkum konnte keine dem Kolon oder Jejunum vergleichbare luminale Schleimschicht gefunden werden. Fast ausschließlich der Mikrovilli-Saum am Epithel sowie der Becherzellinhalt werden durch die Schleimfärbung gefärbt. An einigen wenigen Stellen lassen sich Schleimansammlungen erkennen, diese treten jedoch nur an kurzen Abschnitten auf.

Die Zäkum-Präparate konnten entsprechend nur an wenigen Stellen vermessen werden. Die grafische Darstellung dieser Messwerte ist als Boxplot-Diagramm in Abbildung 47 dargestellt. Die GF gehaltenen Präparate zeigten höhere Werte als die SPF Gruppe. Aufgrund der geringen Anzahl an Messungen ist die Aussagekraft jedoch begrenzt und wurde daher nicht auf statistisch signifikante Unterschiede getestet.

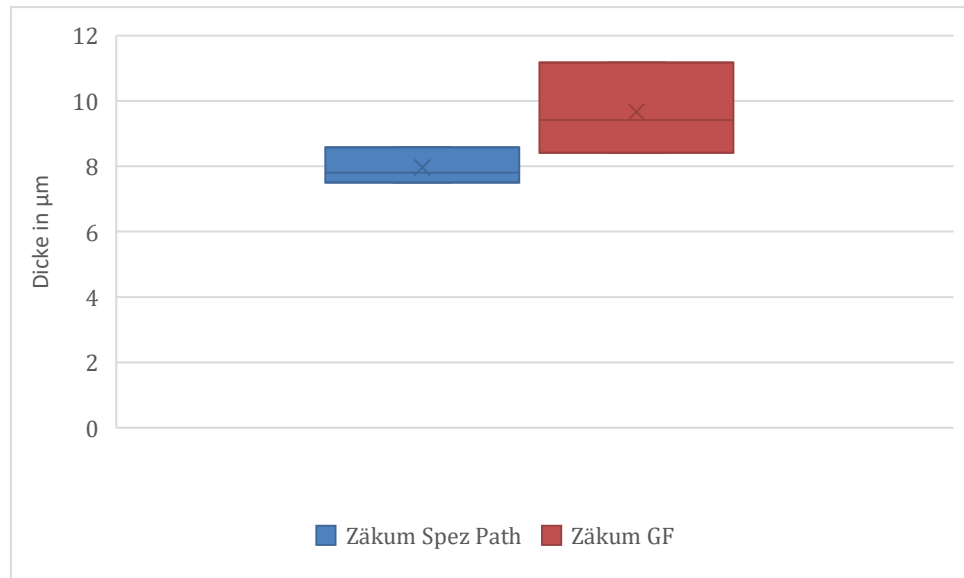


Abbildung 47: Grafische Gegenüberstellung der Schleimschichtdicken im Zäkum: Vergleich der SPF und GF Gruppe- geringe Anzahl an Messungen

Färbungen mit besserer Differenzierung des Darminhalts vom Schleim erbrachten niedrigere Werte, wie Abbildung 48 illustriert ($p < 0,001$).

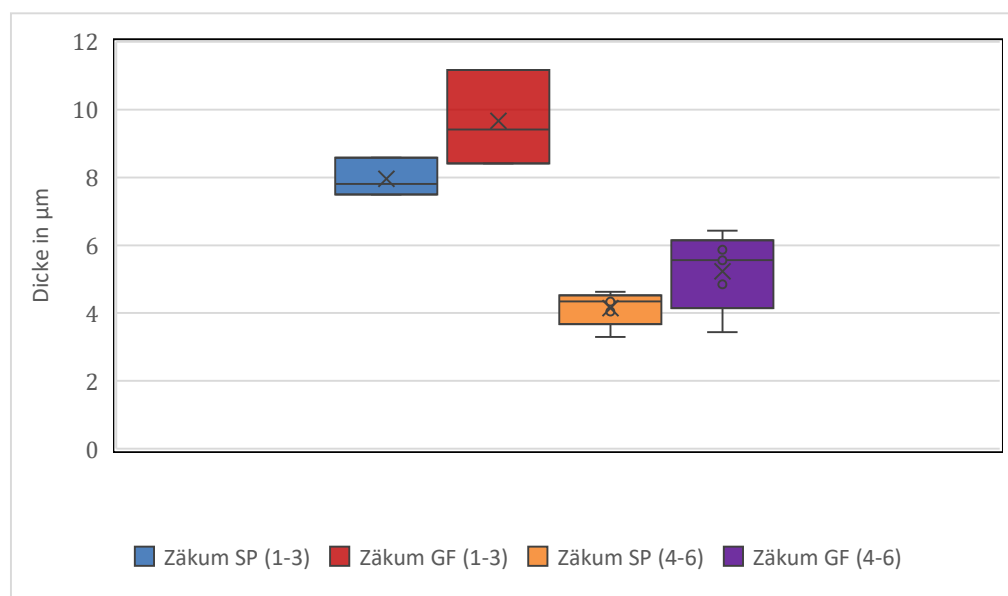


Abbildung 48: Grafische Gegenüberstellung des Einflusses der Färbungen auf die Messergebnisse im Zäkum bei der GF und SPF Tieren, Färbungen: 1) PAS, 2) AB 1.0, 3) AB 2.5, 4) PAS-Diastase, 5) AB2.5-Gram, 6) AB2.5--PAS-Gram

2.2.2. Anhaftung der Schleimschicht am Epithel

Eine Ablösung der luminalen Schleimschicht von den Zottenspitzen-Epithelien lässt sich in der SPF und GF Gruppe im Jejunum und Kolon generell nicht nachweisen. Die Schleimschicht grenzt direkt an die Zottenspitzen; der Futterbrei folgt ebenfalls ohne Abstand. Nur an wenigen, einzelnen Abschnitten der Präparate sind kurze Abschnitte der Ablösung sichtbar.

Vor allem im Jejunum zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen der konv. Gruppe und den beiden anderen Haltungsformen. Die Ablösung der Schleimschicht von den Zottenspitzen ist hier signifikant ($p < 0,001$) häufiger zu beobachten als bei SPF und GF-Hühnern.

In den Präparaten des Zäkums ist keine nachverfolgbare Schleimschicht vorhanden und daher dieses Kriterium der Anhaftung am Epithel nicht beurteilbar.

2.2.3. Kontinuität der lumenseitigen Schleimschicht

Die Kontinuität der luminalen Schleimschicht variiert erheblich zwischen den Tieren aus den unterschiedlichen Haltungsformen ($p < 0,001$). Im Jejunum ist die Schleimschicht in der konv. Gruppe am stärksten unterbrochen: Sie liegt nicht direkt an den Zottenspitzen an, verschwindet teilweise im Darminhalt und lässt sich an anderer Stelle wieder oberhalb der Zottenspitzen finden. In der GF und der SPF Gruppe dagegen liegt die luminale Schleimschicht eng an den oberen Zottenepithelien an und ist mit Ausnahme weniger Lücken meist durchgängig nachzuverfolgen. Im Kolon verhält sich die Situation anders: Die Schleimabdeckung wirkt in der konv. Gruppe am üppigsten, was mit der geringsten Unterbrechung der Schleimschicht einhergeht. In der SPF und in der GF Gruppe ist generell ebenfalls eine gute Kontinuität zu beobachten, jedoch im Vergleich zur konv. Gruppe reduzierter; auch hier treten in allen drei Haltungsformen wiederholt Abschnitte ohne Schleimabdeckung an den Zottenspitzen auf. Im Zäkum finden sich weder in der GF noch in der SPF Gruppe Schleim in nennenswerter Ausprägung; nur an wenigen Stellen des Präparats ist wenig Schleim zu beobachten, sodass kein sinnvoller Gruppenvergleich möglich ist.

Für eine statistische Überprüfung wurde die Kontinuität der luminalen

Schleimschicht systematisch klassifiziert und in eine von vier Abstufungen pro Präparat eingeteilt. Höhere Werte bedeuten eine größere Kontinuität. Bei den konv. Tieren wurden ausschließlich die 55 Tage alten Tiere einbezogen. In allen Haltungsformen ist die Kontinuität im Kolon mit Abstand am höchsten, gefolgt vom Jejunum. Im Jejunum erzielt die GF Gruppe den höchsten Wert, gefolgt von der SPF Gruppe ($p=0,032$); die konv. Gruppe liegt am unteren Ende (konv vs GF $p=0,001$; SPF vs konv $p=0,007$). Im Kolon erreicht die Gruppe der konv. Tiere nur tendenziell höhere Werte als bei SPF-Haltung ($p=0,493$), während die GF Gruppe deutlich geringere Werte aufweist ($p=0,004$). Auch der Unterschied zwischen der GF Gruppe und den Tieren aus der SPF-Haltung ist signifikant ($p=0,015$).

2.3. Lage der Bakterien

Im Jejunum befinden sich in der konv. Gruppe gehäuft Bakterien im Darminhalt, die SPF Gruppe weist einzelne Bakterien auf, und in der GF Gruppe befinden sich keine Bakterien im Darminhalt. Im direkten Vergleich der luminalen Schleimschicht des Jejunums zwischen den drei Haltungsformen, wie in Abbildung 49 dargestellt, fällt auf, dass in der konv. Gruppe gehäufte Keime in der luminalen Schleimschicht zu finden sind. Diese ist im Gegensatz zu den anderen Gruppen vom Epithel abgelöst. Der Schleimschicht haftet bei den beiden bakterienreduzierten Gruppen am Epithel, sie ist fein gestreift und enthält keine Bakterien. In der SPF-Gruppe lassen sich vereinzelt Keime im Darminhalt und selten in der Schleimschicht nachweisen.

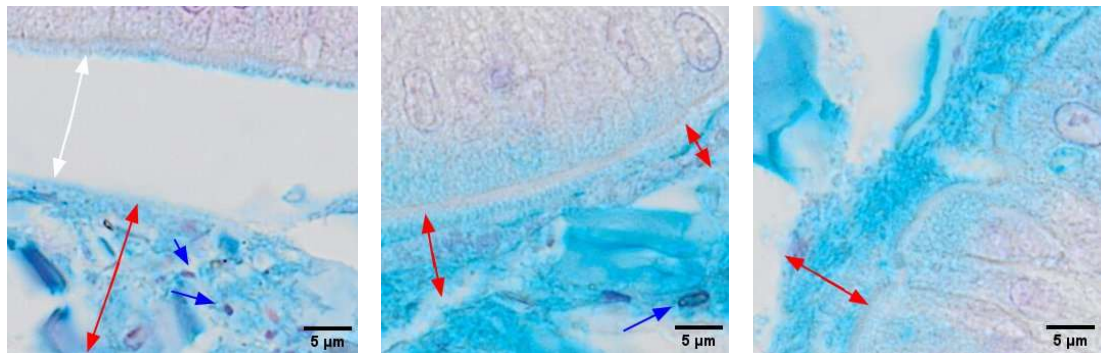


Abbildung 49: Vergleich der luminalen Schleimschicht im Jejunum zwischen den drei Haltungsformen, 55 Tage alt, links): konv., abgelöst vom Epithel mit Bakterien, mittig) SPF, anhaftend am Epithel einzelne Keime im Darminhalt, rechts) GF, geschichtet ohne Bakterien, rote Doppelpfeile: luminal Schleimschicht, blaue Pfeile: Bakterien, weißer Doppelpfeil: Ablösung der Schleimschicht vom Epithel in der konv. Gruppe, AB 2.5

Im Jejunum der konv. Gruppe lassen sich Bakterien in der luminalen Schleimschicht nachweisen. Sie mischen sich in die luminal Schleimschicht ein. Da meist eine Ablösung der Schleimschicht vom Epithel vorliegt, befinden sich Bakterien nur vereinzelt direkt am Epithel. Zwischen den Zotten lassen sich ausschließlich im oberen, spitzennahen Bereich einzelne Bakterien finden; tiefer zwischen den Zotten in Richtung Krypten sind keine Bakterien mehr zu beobachten. In der SPF Gruppe sind im Darminhalt lediglich vereinzelt Bakterien zu finden, und in der dünnen luminalen Schleimschicht konnten keine Bakterien nachgewiesen werden; zwischen den Zotten sind ebenfalls keine zu erkennen. In der GF Gruppe lassen sich, wie erwartet, keine der typischen Bakterienformen bestätigen.

Im Kolon finden sich im Darminhalt in der konv. Gruppe Bakterien in großer Zahl, in der SPF Gruppe weniger und in der GF Gruppe nicht. In Abbildung 50 werden die daraus resultierenden Farbunterschiede der Ingesta in der AB 2.5-Gram-Färbung vergleichend dargestellt. Links wird ein Präparat der konv. Gruppe gezeigt, bei dem die Ingesta am intensivsten durch die Gram-Färbung der Bakterien gefärbt sind; es entsteht eine lila-blaue, intensive Farbe. Die Schleimschicht auf dem Epithel enthält nur vereinzelt Bakterien. Im mittleren Bildabschnitt ist ein SPF Präparat dargestellt. Die luminal Schleimschicht bedeckt in diesem Bild nur teilweise das Epithel. Sie ist blasig aufgeworfen und enthält keine Bakterien. Die Ingesta sind deutlich weniger stark gefärbt und erscheinen überwiegend blau. Im rechten Bildabschnitt ist die Ingesta des GF Huhns hell blassblau gefärbt. Die Schleimschicht ist in großen Blasen

aufgeworfen.

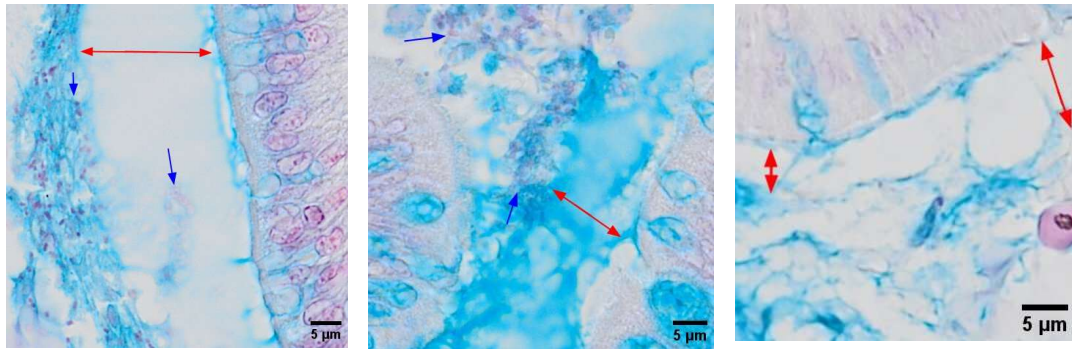


Abbildung 50: Vergleich der luminalen Schleimschicht im Kolon durch die Gram-Färbung zwischen den drei Haltungsförmungen, 55 Tage alt, Links: konv. mit vielen Bakterien, Mitte: SPF mit nur einzelnen Bakterien, Rechts: GF ohne Bakterien, AB 2.5-Gram-Färbung

In der Tiefe zwischen den Zotten lassen sich auch im Kolon grundsätzlich keine Bakterien nachweisen. An dem Zottenspitzen-Schleim der konv. Tiere können selten Bakterien aufgefunden werden, die dort jedoch nicht direkt am Epithel zu finden sind. Größtenteils ist hier die luminal Schleimschicht bakterienfrei und durch sie die Ingesta vom Epithel getrennt. Diese Beobachtung lässt sich auch bei den SPF Präparaten feststellen. Die Zottenspitzen sind allerdings nicht vollständig von Schleim bedeckt. An den nicht von Schleim bedeckten Stellen befinden sich bakterieller Darminhalt direkt am Epithel.

Auch bei den Kolon-Präparaten der GF Tiere wurde die Gram-Färbung angewandt. Wie zu erwarten war, konnten hier keine typischen Bakterienformen gefunden werden. Dies hatte, ähnlich wie im Jejunum der GF Tiere, zur Folge, dass der Darminhalt deutlich heller gefärbt war im Vergleich zu den beiden anderen Haltungsförmungen, die Bakterien enthalten. Dadurch ist der Schleim vom angrenzenden Darminhalt deutlich schwerer zu unterscheiden. Die Ingesta ist bei den GF Tieren meist hellblau gefärbt und einzelne Pflanzenfasern sind teilweise auch rosa gefärbt. Dies begründet den weniger deutlichen Farbunterschied der Schleimschicht zur Ingesta.

Auch im Zäkum wurde der Darminhalt der SPF Tiere im Vergleich zu den GF Tieren durch die Anfärbung der Bakterien mit der Gram-Färbung deutlich kräftiger angefärbt. Dies wird durch eine direkte Gegenüberstellung in Abbildung 51 verdeutlicht. In derselben Abbildung ist zudem ersichtlich, dass im Zäkum in der Regel keine Schleimschicht am Epithel zu beobachten ist. Der Darminhalt liegt direkt am Epithel an oder ist durch einen Spalt vom Epithel

getrennt, wie es im linken Bild bei dem GF Tier der Fall ist.

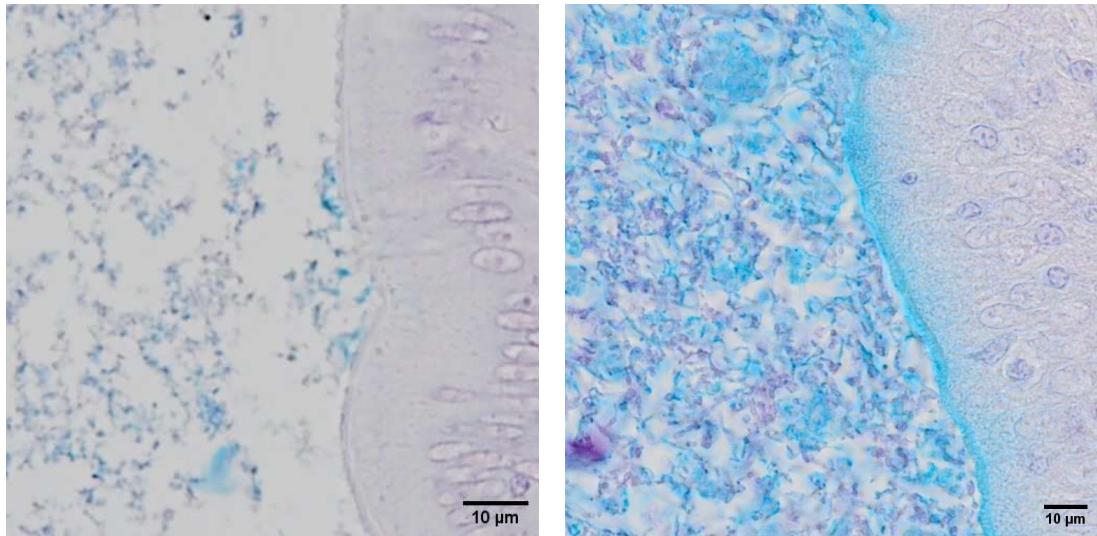


Abbildung 51: Vergleich der luminalen Schleimschicht im Zäkum durch die Gram-Färbung zwischen den zwei Haltungsformen, 55 Tage alt, AB-Gram-Färbung, A) GF Haltung – ohne Schleimschicht, gräulicher Darminhalt, da ohne Bakterien B) SPF Haltung – ohne Schleimschicht, nur Glykokalix der Mikrovilli leuchten blau, im Darminhalt viele Bakterien

In keinem Präparat des Zäkums konnten größere Schleimauflagerungen am Epithel gefunden werden. Sowohl in der SPF als auch in der GF Gruppe waren nur vereinzelt kleine Schleimpunkte sichtbar.

Abbildung 52 zeigt einen Abschnitt des Präparats im Zäkum eines SPF Tiers mit einem Lymphzentrum in der Lamina propria, der deutlich mit Darminhalt überlagert ist. In der Vergrößerung ist zu erkennen, dass auch hier keine Schleimschicht auf dem Epithel vorhanden ist. Lediglich die Glykokalyx des Epithels leuchtet hellblau auf. Der Darminhalt ist—im Vergleich zum Schleim—durch die darin enthaltenen Bakterien dunkler gefärbt. In diesem Präparat ist deutlich, dass sich der Darminhalt genau an den Stellen mit Lymphzentren an das Epithel anlagert.

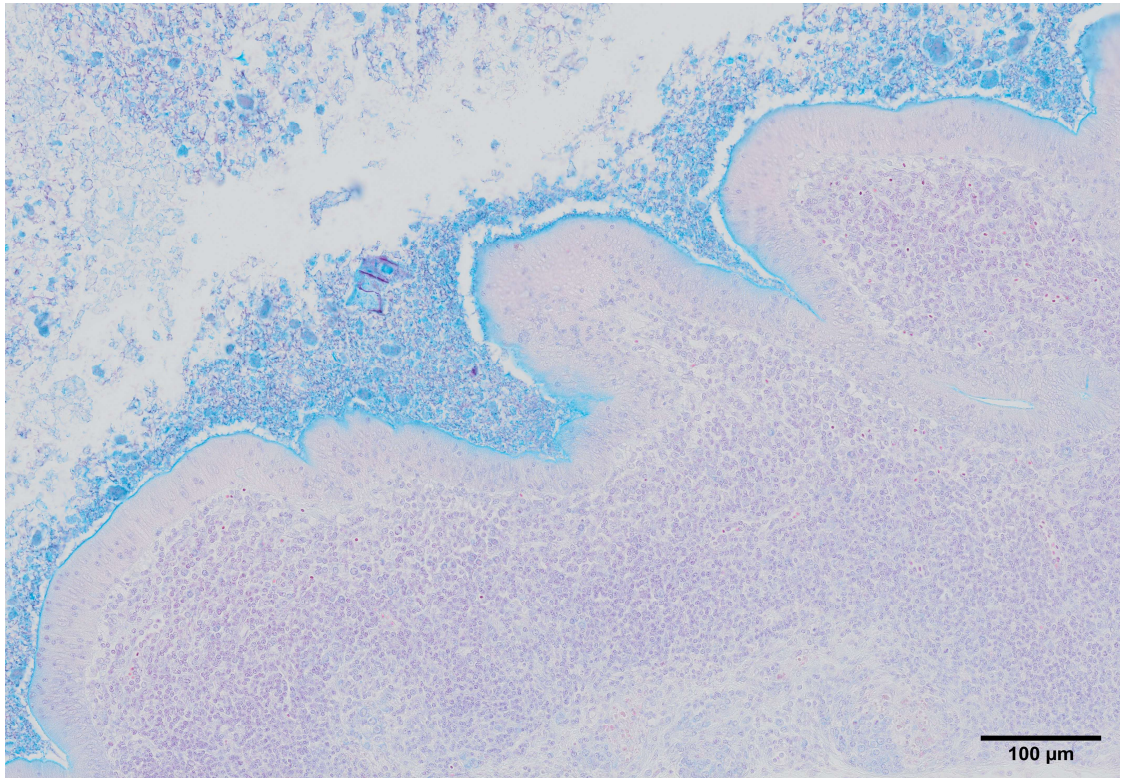


Abbildung 52: Bakterienhaltiger Darminhalt am Epithel oberhalb eines Lymphzentrums; keine Schleimschicht vorhanden. Zäkum, SPF , 55 Tage alt, AB 2.5

V. DISKUSSION

Im folgenden Kapitel werden die Methoden und Ergebnisse dieser Arbeit bewertet, insbesondere hinsichtlich klinischer und physiologischer Bezugspunkte und ihrer Einordnung in den aktuellen Kenntnisstand.

1. Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel der Doktorarbeit ist eine umfassende Beschreibung der Schleimschicht des Darms beim Haushuhn. Durch histologische Untersuchungen soll die Morphologie der intestinalen Schleimschicht in den verschiedenen Darmabschnitten, deren Veränderungen in den ersten Lebenswochen sowie der Einfluss der bakteriellen Belastung darauf bewertet werden.

2. Diskussion der Ergebnisse

Schleim zwischen den Zotten

Allgemein geht man davon aus, dass die intestinale Schleimschicht von den Becherzellen stammt. Die gefundenen schnurartigen Verbindungen von den Öffnungen der Becherzellen zur Schleimschicht in dieser Arbeit, zeigen deutlich, dass dies auch beim Huhn der Fall ist. Das entspricht zudem weitgehend den Beobachtungen anderer Arbeiten bei Mäusen (JOHANSSON et al., 2008; NYSTRÖM et al., 2021). Der Ursprung des Schleims im Darm liegt daher beim Huhn ebenfalls hauptsächlich bei den Becherzellen.

In den vorliegenden Untersuchungen ist im Jejunum und Kolon grundsätzlich Schleim zwischen den Zotten vorhanden, während im Zäkum kein Schleim zu finden ist. Anatomische Unterschiede beeinflussen dabei maßgeblich die Eigenschaften des Schleims zwischen den Zotten. Forschungsarbeiten von CLOETTA (1893); MICHEL und GUTTE (1971); TURK (1982); sowie FERRER et al. (1991) zeigen, dass die Zotten im Verlauf des Darms unterschiedliche Erscheinungsformen aufweisen, die den Spalt bedingen, in dem sich Schleim ansammeln kann. Im Jejunum treten auffällig lange Zotten mit gleichzeitig langem Zwischenzotten-Spalt auf. Im Kolon sind die Zotten insgesamt kürzer, doch die Schleimhaut ist zusätzlich in Falten gelegt, wodurch sich auch hier ein großer Raum für den Schleim zwischen den Zotten ergibt. Demgegenüber lässt

sich im Zäkum kein vergleichbarer Zwischenzotten-Spalt finden, da die Zotten aus dem Mittel- und Endstück der Blinddärme, von dem die vorliegenden Proben stammen, kurz sind und flach auslaufen. Meine Untersuchungen bestätigen diese anatomischen Besonderheiten.

Der Schleim zwischen den Zotten unterscheidet sich deutlich zwischen dem Jejunum und dem Kolon: Im Jejunum ist er meist schnurartig, während er im Kolon wabenartig, das heißt deutlich dichter gefüllt, ist. Das könnte auf unterschiedlichen Schleimeigenschaften in den beiden Darmabschnitten beruhen. Ein vergleichbarer Befund wurde von NYSTRÖM et al. (2021) bei Mäusen beschrieben. Sogenannte „kryptale“ Becherzellen im Kolon bei Mäusen bilden einen besonders undurchdringlichen Schleim; im Dünndarm konnten solche Becherzellen nicht in vergleichbarer Weise nachgewiesen werden. Diese speziellen Becherzellen sind dafür verantwortlich, dass der Schleim des Kolons eine Barrierefunktion hat, die die Zottenzwischenräume bei den untersuchten Nagetieren absolut von Bakterien freihält. Außerdem beschreiben NYSTRÖM et al. (2021) im Kolon der Mäuse Schleimvorwölbungen, die als „crypt mucus plume“ bezeichnet werden und an den Zottenspitzen durch den aufwärtsdrückenden Schleim an den apikalen Enden der Zottenzwischenräume entstehen. In meinen Untersuchungen zeigt sich im Kolon im Vergleich zum Jejunum ebenfalls deutlich mehr Schleim im oberen Bereich der Zotten. Dieser Schleim verdrängt Bakterien nach oben, sodass sie V-förmig zwischen die Zottenspitzen hineinragen und tiefe Regionen nicht erreichen. Im Jejunum hingegen erreicht der Schleim im Zottenzwischenraum meist nicht den oberen Bereich. Die vorliegenden morphologischen Befunde beim Huhn sind den in der Literatur beschriebenen Verhältnissen bei der Maus vergleichbar. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die funktionelle Bedeutung dieser Schleimfunktion als Barriere gegen Bakterien in gleicher Weise auch für das Huhn gilt.

Der Farbverlauf der Becherzellen auf der Krypt-Villus-Achse der Zotten in der PAS-AB-Gram-Färbung ist besonders interessant: In der konv. Gruppe zeigen Jejunum und Kolon einen Farbverlauf der Zotten von blau-violett im Krypten-Bereich hin zu rot-violett im Spitzen-Bereich. Im Jejunum der GF und SPF Gruppe ist dieser Farbverlauf ebenfalls deutlich ausgeprägt. Im GF Kolon dominiert eine bläuliche Färbung, die an den Zottenspitzen geringfügig rötlicher ist; hingegen zeigen die SPF Proben im Kolon und in beiden Haltungsförmern

im Zäkum keinen deutlichen Verlauf, sondern verbleiben blau-violett. Die Farbverteilung reflektiert in dieser Färbung gemäß RIEDELSHEIMER und BÜCHL-ZIMMERMANN (2015) die Dominanz neutraler bzw. saurer (sulfatierter bzw. sialylierter) Muzine: Ein stärker roter Farbton deutet darauf hin, dass mehr neutrale Glykane vorhanden sind, während ein stärkerer Blauton auf einen höheren Anteil saurer Glykane der Muzine im Schleim schließen lässt. In den biochemischen Untersuchungen von STRUWE et al. (2015) weisen neutrale Glykane insbesondere im Zäkum tatsächlich einen geringen Anteil am Schleim auf (circa 22%), während dort saure, das heißt sulfatierte bzw. sialylierte Glykane vorherrschen. Dies erklärt die Abwesenheit einer rötlichen Anfärbung des Schleims in den Becherzellen des Zäkums. Im Dünndarm zeigten sich in allen drei Haltungsformen rötliche Zottenspitzen, wobei dieser Darmabschnitt gemäß STRUWE et al. (2015) einen, im Vergleich zu den anderen Darmabschnitten, hohen Anteil neutraler Glykane von circa 40% aufweist. Im Dickdarm liegt der Anteil neutraler Glykane gemäß derselben Studie bei 26%; lediglich in der konv. Gruppe trat in diesem Darmabschnitt ein deutlicher Farbverlauf auf. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Färbeergebnisse tatsächlich die Glykan-Zusammensetzung in den Darmabschnitten widerspiegeln. Außerdem lässt sich vermuten, dass sich ihre Eigenschaften je nach Darmabschnitt und bakterieller Belastung von einem höheren Anteil saurer Muzine in der Krypten-Region zu mehr neutralen Verbindungen an den Zottenspitzen verändern. Schließlich ist bekannt, dass Zellen Zellwachstum und Zellentwicklung durchführen und etwa 2 bis 4 Tage nach ihrer Bildung durch Apoptose an den Zottenspitzen abgeschilfert werden (IMONDI und BIRD, 1966; HODGES und MICHAEL, 1975; TURK, 1982; GEYRA et al., 2001; UNI et al., 2003; SMITH et al., 2014; DUANGNUMSAWANG et al., 2021). Es ist zu vermuten, dass sich dabei teilweise die Schleimeigenschaften verändern.

Luminale Schleimschicht

In den vorliegenden Untersuchungen zeigt sich in der konv. Gruppe im Jejunum eine feine, dünne und linienartige, von den oberen Zottenspitzen abgelöste luminale Schleimschicht mit einer großen Anzahl Bakterien. Im Kolon hingegen liegt eine deutlich dickere Schutzschicht vor, mit geringgradiger bakterieller Besiedlung ausschließlich im oberen Spitzenbereich, im Gegensatz zu Mäusen,

bei denen die innere Schleimschicht dort vollständig bakterienfrei ist (JOHANSSON et al., 2008). Im Zäkum ist keine Schleimschicht nachweisbar. Der Vergleich der Schleimschichtdicken zwischen Kolon, Jejunum und Zäkum bei 55 Tage alten Tieren ergab bei allen Haltungsformen einheitlich deutlich signifikante Unterschiede, die mit den morphologischen Beobachtungen übereinstimmen und daher plausibel sind. Damit hat das Kolon die dickste Schleimschicht gefolgt vom Jejunum und dem Zäkum.

Nach ERMUND et al. (2013a) lässt sich die Schleimmorphologie durch die Physiologie der jeweiligen Darmabschnitte begründen:

Die meisten Verdauungs- und Absorptionsvorgänge finden im Dünndarm statt (TURK, 1982), weshalb eine feine, durchdringbare Schleimschicht erforderlich ist, wie ERMUND et al. (2013a) auch bei Mäusen zeigten. Für die Aufnahme von Nährstoffen muss der Verdauungsbrei das Epithel erreichen können. Die dünne, nicht anhaftende Schleimschicht im Jejunum ermöglicht einen größeren Kontakt der Ingesta mit der Epitheloberfläche. Dadurch lässt sich erklären, warum die Schleimschicht des Jejunums im Vergleich zum Kolon so fein ist. Im Jejunum lässt sich oberhalb der Darmzotten auch bei meinen Proben beim Huhn eine strangartige, dünne Schleimschicht beschreiben. Diese dünne Schleimschicht wird auch in Untersuchungen anderer Tierarten so beschrieben und unterscheidet sich von der Schleimschicht des Dickdarms oder Magens. Pionierarbeiten von ATUMA et al. (2001); und ERMUND et al. (2013a) kamen bei Mäusen erstmals zu dem Ergebnis, dass die jejunale Schleimschicht gegenüber anderen Darmabschnitten dünn ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit bestätigen dies auch beim Huhn.

Bei den Mäusen ist die Verdauung im Kolon bereits abgeschlossen und eine dicke und undurchdringliche Schleimschicht dient als Barriere, die keine Bakterien oder Futterbestandteile an die Schleimhaut lassen, um der großen Anzahl an Bakterien im Enddarm gerecht zu werden (ATUMA et al., 2001; JOHANSSON et al., 2008; BIRCHENOUGH et al., 2023). Im Dickdarm der Hühner dagegen befinden sich auch Zotten und daher sind dort – anders als bei Säugetieren – Verdauungsvorgänge aktiv (MICHEL und GUTTE, 1971). Das legt eine im Vergleich zum Säugetier weniger dichte Schleimschicht nahe. Dies könnte den Befund erklären, dass sich in meinen Proben einzelne Bakterien in den oberen Bereichen der Schleimschicht finden lassen, bei Nagetieren und

dem Menschen nicht.

Für die Zweischichtigkeit der Schleimschicht im Kolon, die bei Maus, Ratte oder Mensch bestätigt wurde (ATUMA et al., 2001; JOHANSSON et al., 2008; VAN DER POST et al., 2019), konnten in dieser Arbeit auch Hinweise für das Huhn gefunden werden. An einzelnen Präparaten lässt sich in Richtung Lumen eine weitere, parallel aufliegende Schicht finden, die feingranuliert ist und viele Bakterien sowie wenige grobe Futterbestandteile enthält. Ob dies eine zufällige Ansammlung von feinem Darminhalt oder ein Hinweis auf eine äußere Schleimschicht im Kolon ist, lässt sich nicht sicher bestätigen, da dieses Phänomen nicht in jedem Präparat beobachtet wird. JOHANSSON et al. (2008) berichten, dass die äußere Schicht der zweischichtigen Schleimschicht im Kolon der Mäuse derjenigen im Jejunum ähnelt. Diese äußere Schicht ist nicht anhaftend und locker strukturiert. Diese Beschreibung deckt sich mit meinen Beobachtungen. Weitere Untersuchungen sind anzustreben, um die mögliche Zweischichtigkeit genauer zu erkunden.

Lage der Bakterien

Dem Schleim zwischen den Zotten wird, wie ERMUND et al. (2013a) postulierten, eine Barrierefunktion zugesprochen, die die tief unten liegende Krypten-Region schützen soll. Der bereits tief unten von den Becherzellen gebildete Schleim wird nach oben transportiert und bildet damit eine physikalische Barriere gegen eindringende Bakterien.

Im Jejunum bei Mäusen fand BIRCHENOUGH et al. (2023) allerdings auch zwischen den Zotten Bakterien. Daraus folgerten sie, dass der jejunale Schleim, im Gegensatz zum Schleim des Kolons, ein Habitat für Bakterien sei. Im Ileum dagegen waren keine Keime im Zwischenzottenschleim zu finden, allerdings schon im luminalen Schleim. Sie stellten die Hypothese auf, dass die AMPs, die im Ileum im Vergleich zum Jejunum der Mäuse vermehrt nachzuweisen sind, dafür verantwortlich sein könnten. Denn diese vermischen sich mit dem Schleim und bilden einen antibakteriellen Gradienten (BIRCHENOUGH et al., 2023). In den vorliegenden Untersuchungen wurden beim Huhn Bakterien im Jejunum ausschließlich im oberen Spitzenbereich nachgewiesen; tiefer liegende Bereiche zwischen den Zotten zeigten keine Bakterien. Meine Ergebnisse im Jejunum spiegeln daher die Situation im Ileum der untersuchten Mäuse von

BIRCHENOUGH et al. (2023) wider: Das heißt, eine luminale Schleimschicht mit bakterieller Besiedlung und im Raum zwischen den Zotten bakterienfreier Schleim. Es kann daher die Hypothese aufgestellt werden, dass auch beim Huhn AMPs im Schleim zwischen den Zotten des Jejunums vorliegen, die eine hemmende Wirkung auf die bakterielle Besiedlung dieses Bereichs ausüben. Diese Hypothese wird darauf gestützt, dass beim Huhn eine Reihe AMPs auch im Jejunum gebildet werden (EVANS et al., 1994; ZHANG und SUNKARA, 2014; NAZEER et al., 2021). Auch Immunglobuline im Schleim spielen eine wichtige Rolle für die Abwehr (BAR-SHIRA et al., 2014; BAR SHIRA und FRIEDMAN, 2018) und können ein Eindringen der Bakterien in tiefere Regionen der Zottenzwischenräume erschweren.

In der vorliegenden Untersuchung kann eine bakterienbesiedelte luminale Schleimschicht im Jejunum der Haushühner bestätigt werden. Diese stellt ein Habitat für Bakterien dar, was wiederum die Widerstandskraft gegen pathogene Bakterien erhöht, wie BIRCHENOUGH et al. (2023) vermuteten.

Im Kolon findet sich dagegen selten und vereinzelt Bakterien im Schleim der Zottenspitzen, obwohl die Ingesta dort wesentlich mehr Bakterien enthalten als im Jejunum. Die Beobachtung der Barrierefunktion des Schleims im Kolon deckt sich in ähnlichem Ausmaß mit Befunden anderer Studien, z. B. JOHANSSON et al. (2008) bei Mäusen. Allerdings zeigte die untersuchte Kolon-Schleimschicht bei Mäusen, im Gegensatz zu meinen Proben, eine absolut bakterienfreie innere Schleimschicht. Im Kolon des Huhns finden, wie eben schon erwähnt, – im Gegensatz zu dem der Säugetiere –noch Verdauungsprozesse statt (MICHEL und GUTTE, 1971). Dies könnte erklären, dass die Schleimschicht durchdringbarer sein muss, um eine erleichterte Passage der Nährstoffe zum Epithel zu ermöglichen, wodurch vereinzelt Bakterien bei den Hühnern nachgewiesen werden können, gleichzeitig jedoch eine Barrierefunktion bestehen bleibt.

Einfluss des Alters auf die Morphologie

Im Jejunum besteht keine erkennbare Korrelation zwischen dem Alter der Tiere und der Schleimschichtdicke; im Kolon zeigte sich hingegen eine Zunahme mit dem Alter. Das betrifft sowohl den Schleim zwischen den Zotten als auch die luminale Schleimschicht. Die statistischen Erhebungen bestätigen diese

Beobachtungen.

Im Jejunum verändert sich die linienartige Schleimschicht nicht mit dem Alter. Sowohl bei den jüngsten als auch bei den ältesten Tieren liegt sie als linienförmige Struktur oberhalb der Zottenspitzen vor. TSIRTSIKOS et al. (2012a); und TSIRTSIKOS et al. (2012b) fanden bei ihren Untersuchungen der Schleimschicht-Färbeintensität und der Schleimschicht-Dicke im Dünndarm von Hühnern unterschiedlichen Alters ebenfalls keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Altersgruppen. Die MUC2-Genexpression zeigte, wie JIANG et al. (2013); und ZHANG et al. (2015) herausfanden, im Dünndarm von Hühnern einen starken Anstieg kurz vor dem Schlupf, gefolgt von einem mäßigen Anstieg auf niedrigem Niveau. Auch die Zählung der Becherzellen ergab, dass im Dünndarm nach dem Schlupf ein kontinuierlicher, leichter Anstieg der Becherzellen zu beobachten ist (UNI et al., 2003; CALIK und ERGÜN, 2015; REYNOLDS et al., 2020). Die geringgradig ansteigende MUC2-Genexpression (JIANG et al., 2013; ZHANG et al., 2015) und die Anzahl der Becherzellen (UNI et al., 2003; CALIK und ERGÜN, 2015; REYNOLDS et al., 2020) korrelieren mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit mit keiner Zunahme der Schleimschicht-Dicke mit dem Alter. TSIRTSIKOS et al. (2012a) vermuteten bei Messungen der Schleimschicht im Hühnerdarm, dass die Ergebnisse stärker von der Höhe entlang der Villus-Krypten-Achse abhängen als von Alter oder Fütterung. Allerdings beruhten ihre Untersuchungen ausschließlich auf Dünndarm- und Zäkumproben; Kolonproben wurden nicht berücksichtigt. In der vorliegenden Arbeit wurden im Gegensatz zum Kolon auch bei Dünndarmproben lediglich geringe Unterschiede im Altersvergleich beobachtet.

Physiologisch lässt sich die Altersunabhängigkeit der Schleimschichtdicke im Jejunum durch die Verdauungsprozesse in diesem Darmabschnitt erklären. Die luminale Schleimschicht dient als natürliches Habitat für Darmbakterien (BIRCHENOUGH et al., 2023) und Nahrungsbestandteile müssen das Epithel erreichen können, um die Verdauung zu ermöglichen (ERMUND et al., 2013a). Daher bleibt die luminale Schleimschicht im Jejunum auch bei älter werdenden Tieren eine konstant dünne Schicht, die dies ermöglicht.

Im Kolon zeigt sich bei jungen Tieren zunächst eine dünne Schleimschicht, die kontinuierlich an Dicke zunimmt. Mit 55 Tagen ist diese Schicht derart fortgeschritten, dass sie die Falten vollständig ummantelt und einen breiten

Balken bildet. Die Beobachtungen ähneln einer Studie, in der bei Ratten die Schleimschicht des Kolons von Tag eins nach der Geburt bis Tag 15 konstant dicker wurde und anschließend einen Maximalwert erreichte, der bis ins Erwachsenenalter konstant blieb (JOHANSSON et al., 2024). In der vorliegenden Studie erreichten die Hühner mit 55 Tagen die bei weitem höchsten Werte in den Schleimschicht-Vermessungen des Kolons. Sie hatten damit das Erwachsenenalter noch nicht erreicht. Gegebenenfalls existiert auch beim Huhn ein Maximalwert, ab dem die Schleimschicht-Dicke konstant bleibt, vergleichbar mit der Studie von JOHANSSON et al. (2024). Um dies zu klären, sind weitere Untersuchungen mit Hühnern bis ins Erwachsenenalter erforderlich.

Einfluss der Haltungsformen

Morphologisch lassen sich zwischen der GF und der SPF Gruppe kaum Unterschiede feststellen. Die beiden Gruppen unterscheiden sich jedoch in mehreren Punkten von der konv. Gruppe.

In der konv. Gruppe zeigt sich regelmäßig eine Ablösung der Schleimschicht vom Epithel. Im Jejunum dieser Gruppe lässt sich diese Ablösung in jedem Präparat feststellen; im Kolon der konv. Gruppe tritt dieses Merkmal bei etwa der Hälfte der Präparate auf. Bei den SPF und GF Tieren findet sich dieses Phänomen dagegen in keinem Präparat; hier ist die Schleimschicht eng am Epithel anhaftend. Als möglicher Grund wurde in der Literatur bereits eine Artefakt-Bildung angenommen, resultierend aus der Schrumpfung des Schleims durch Wasserentzug bei der Präparate-Herstellung und daraus resultierender Spaltbildung (JOHANSSON et al., 2008; PELASEYED et al., 2014). Gegen dieses Argument spricht die Tatsache, dass in der GF und der SPF Gruppe keine Spaltbildung vorhanden ist, obwohl dieselben Herstellungsverfahren verwendet wurden. Ein anderer Mechanismus für die Loslösung des Schleims wurde von SCHÜTTE et al. (2014) beschrieben. Sie berichten, dass gerade im Dünndarm Bakterien nötig sind, um Meprin β zu aktivieren und dadurch MUC2 von der Zellmembran des Schleimhautepithels zu lösen. Bei GF Mäusen dagegen bleibt die Schleimschicht am Epithel verankert. Der Zusammenhang der abgelösten Schleimschicht bei den konv. Hühnern und der anhaftenden Schleimschicht bei den GF Hühnern ist auch bei meinen Ergebnissen offensichtlich, weshalb vermutet werden kann, dass die

beschriebene Kaskade auch beim Huhn existiert. Bisher wurde noch nicht nachgewiesen, welche spezifischen Bakterien dafür verantwortlich sind. Da die Schleimschicht nicht nur bei der GF, sondern auch bei der SPF Gruppe am Epithel anhaftet, könnten bestimmte Anteile des Mikrobioms der konv. Gruppe eine Aktivierung des Meprin β bedingen, die der SPF Gruppe fehlen. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Bakterien zu identifizieren, die die Loslösung aktivieren können.

In den vorliegenden Untersuchungen zeigen etwa die Hälfte der konv. Kolonpräparate Ablösungen der Schleimschicht vom Epithel. Generell ist bekannt, wie JOHANSSON et al. (2015) schildern, dass sich der Schleim im Jejunum und im Kolon zwischen GF und konv. Mäusen deutlich unterscheidet. Im Jejunum bedingt dies die beschriebenen Anhaftungseigenschaften; im Kolon die Durchdringbarkeit der inneren festen Schleimschicht. Bei GF Mäusen ist sie im Kolon deutlich durchlässiger als bei konventionellen Tieren (JOHANSSON et al., 2015). Unter Umständen besteht hier ein Zusammenhang mit der teilweise abgelösten Schleimschicht im Kolon der untersuchten Hühner. BÜLCK et al. (2023) erforschten die Wirkungen des Meprin- α - und - β -Komplexes, der im Kolon bei Mäusen vermehrt gefunden wird. Dieser spielt eine wichtige Rolle für das Gleichgewicht eines gesunden Mikrobioms in diesem hinteren Darmabschnitt. Ob dies auch beim Huhn der Fall ist und ob es mit den beobachteten Ablösungen der Schleimschicht zusammenhängt, bleibt hypothetisch.

Zwischen den Zotten liegt der Schleim im Jejunum unter allen drei Haltungsbedingungen in vergleichbarer Menge vor. Allerdings endete der Schleim im Jejunum der konv. gehaltenen Tiere häufig bereits im oberen Zottenbereich, ohne den luminalen Schleim zu erreichen oder sich mit ihm zu verbinden. Bei den GF und SPF Haltungsformen war dies meist schon der Fall. Eine mögliche Erklärung könnte in dem eben beschriebenen unterschiedlichen Anhaftungsverhalten der Schleimschicht zwischen den Haltungsformen liegen. Dadurch könnte sich der Schleim in den oberen Zottenspitzenbereichen leichter ablösen im Vergleich zu dem fest anhaftenden Schleim der GF und SPF Gruppen.

Die luminale Schleimschicht in den Dünndarmpräparaten der GF und SPF Gruppen zeigt eine parallel zum Epithel verlaufende Streifung. Im Kolon treten

bei der GF und der SPF Gruppe häufig blasig aufgeworfene Schleimbereiche auf. Beides wird in der konv. Gruppe nicht beobachtet. Ähnliche Streifungen der Schleimschicht wurden auch in Untersuchungen am menschlichen Magen (OTA und KATSUYAMA, 1992), am menschlichen Kolon (MATSUO et al., 1997) oder am Kolon der Maus (JOHANSSON et al., 2008) beschrieben. JOHANSSON et al. (2008) berichten im Kolon von Mäusen eine innere Schleimschicht mit geschichteter Optik, die sich von der äußeren unterscheidet, und schließen daraus, dass unterschiedliche Schleimzusammensetzungen verantwortlich sind. So könnten auch bei den untersuchten Hühnern unterschiedliche Schleimeigenschaften der GF und SPF Gruppen im Vergleich zur konv. Gruppe vorliegen. STRUWE et al. (2015) fanden bei Hühnern, dass die O-Glykane in verschiedenen Darmbereichen unterschiedliche Beschaffenheiten aufweisen und sich deutlich von anderen Tierarten unterscheiden. Folglich könnten auch unterschiedliche Schleimeigenschaften der konv. Gruppe bewirken, dass die Streifung im Jejunum und das blasige Erscheinungsbild im Kolon trotz gleicher Präparate-Herstellung dort nicht auftreten. Diese Unterschiede könnten durch bestimmte Bakterien bedingt sein, die in der konv. Gruppe vorhanden sind, in den anderen Gruppen jedoch fehlen.

Bezüglich der Kontinuität ist festzuhalten, dass im Jejunum die linienförmige Schleimschicht bei konv. gehaltenen Tieren häufig unterbrochen und in größeren Abständen zeitweise nicht mehr erkennbar ist, bevor erneut Epithelnachbarschaften erreicht wird. Folglich ist die Kontinuität der Schleimschicht im Jejunum bei konv. gehaltenen Tieren reduziert. GF und SPF Gruppen zeigen im Jejunum eine bessere Nachverfolgung der Schleimschicht. Dabei beeinflusst ebenfalls die Ablösung der Schleimschicht vom Epithel in der konv. Gruppe, die in den anderen Gruppen fehlt, maßgeblich die Kontinuität. Die Schleimschicht bricht leichter bei Ablösung, als wenn sie gegen das Epithel gedrückt wird. Dafür könnten unterschiedliche Schleimeigenschaften bei den gnotobiotischen Tieren verantwortlich sein. Auch bei Mäusen beobachteten ERMUND et al. (2013a) einen leicht aspirierbaren Schleim im Jejunum, der meist die Villusspitzen bedeckte, jedoch nicht immer. Insbesondere könnte die im Jejunum dünnere und weniger anhaftende Schleimschicht in der konv. Gruppe an einzelnen Stellen Lücken leichter zulassen als die dickere, besser anhaftende Schleimschicht des Kolons. Denn auch im Kolon der untersuchten

Hühner fällt bei der morphologischen Begutachtung auf, dass die Schleimschicht bei konv. gehaltenen Tieren die Zottenspitzen lückenloser bedeckt als im Jejunum. Im Gegensatz zum Jejunum allerdings in der konv. Gruppe mehr als in den beiden gnotobiotischen Gruppen. ARNESEN et al. (2023) fand keine Unterschiede in den Schleimschicht-Eigenschaften inklusive Dicke der verschiedenen bakteriell belasteten Mäuse. JOHANSSON et al. (2015) allerdings beschreiben bei GF Mäusen, dass die innere Kolon-Schleimschicht geringgradig dünner und gegenüber Bakterien durchlässiger ist. Die höheren Kontinuitätswerte der konv. Gruppe im Vergleich zu den anderen Haltungsformen im Kolon könnten auf eine unterschiedlich dichte Barriere gegen eindringende Bakterien hinweisen.

Zäkum

In den Präparaten des Zäkums, von denen bedauerlicherweise lediglich Proben der GF und SPF Gruppe zur Verfügung standen, lässt sich keine Schleimschicht feststellen, die mit der Schleimschicht des Jejunums oder Kolons vergleichbar wäre. Dass Schleim in den Becherzellen des Zäkums gebildet wird, ist in verschiedenen Arbeiten bestätigt worden (ZHANG et al., 2015; KOÇAK und ÖZAYDIN, 2023). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde Schleim in den Becherzellen nachgewiesen. Doch es finden sich lediglich vereinzelt kleine Schleimansammlungen oberhalb der Epithelzellschicht.

Anhand der Physiologie dieses Darmbereichs lässt sich ein Erklärungsansatz dafür finden. Das Zäkum beim Huhn besitzt als Verdauungs- und Immunorgan laut ELLING-STAAITS et al. (2022); und KOÇAK und ÖZAYDIN (2023) eine Sonderstellung. Generell finden im Zäkum Verdauungsprozesse statt, da hier die Fermentation der schwer verdaulichen Nahrungsbestandteile durch Bakterien erfolgt (ELLING-STAAITS et al., 2022). Außerdem sind hier Immunzentren zu finden (CASTELEYN et al., 2010; NAZEER et al., 2021) und das vielfältigste Mikrobiom des gesamten Magen-Darm-Trakts (RINTTILÄ und APAJALAHTI, 2013; STANLEY et al., 2014; BINDARI und GERBER, 2022), wobei auch die retrograde Peristaltik bakterienreichen Verdauungsbrei von der Kloake in die Zäka spült (FRIEDMAN et al., 2003; SACRANIE et al., 2007) und dabei unter anderem Immunglobuline gebildet werden können (HONDA und TAKEDA, 2009; PIETRZAK et al., 2020). Dies setzt voraus, dass der Verdauungsbrei mit der Schleimhaut im Zäkum in Kontakt kommt. Die

Schleimschicht darf demnach keine Barriere darstellen, sondern soll durchlässig sein. Unter Umständen zeigt sich daher in meinen Proben im Zäkum keine deutlich sichtbare Schleimschicht.

Oberhalb der Peyerschen Platten bei Mäusen stellte ERMUND et al. (2013a), einen „leicht zu entfernenden“, dünnen Schleim bei den Mäusen fest, der möglicherweise einen Vergleich zu den Zäkum-Präparaten des Huhns erlaubt. Denn wie die Peyerschen Platten spielt auch das Zäkum eine zentrale Rolle im immunologischen Geschehen. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass die Schleimschicht des Zäkums auch in den vorliegenden Untersuchungen besonders wenig anhaftet und fragil ist, weshalb sie nicht darstellbar war. Die Schleimschicht im Zäkum könnte beim Huhn auf Grund der genannten physiologischen Gründe besonders leicht zu entfernen und somit wenig anhaftend und somit nicht sichtbar sein.

Auch beim Menschen konnten MATSUO et al. (1997) im Vergleich den anderen untersuchten Darmabschnitten die geringsten Schleimschicht-Dicken feststellen.

Des Weiteren besitzt der Schleim des Zäkums, wie STRUWE et al. (2015) erforschten, eine dem Schleim des Jejunums und Kolons unterschiedliche O-Glykan-Struktur. Im Zäkum konnten besonders wenige neutrale Muzine und mehr saure Muzine gefunden werden. Von den sauren Muzinen sind wesentlich mehr sulfatierte und weniger sialylierte Glykane vorhanden. Die O-Glykane weisen insgesamt die geringste Heterogenität im Vergleich zu anderen Darmabschnitten auf. Dementsprechend konnte die Färbung des Becherzellinhalts, wie bereits besprochen, in der PAS-AB-Gram-Färbung mehr bläulichen Schleim im Vergleich zu den anderen Darmabschnitten nachweisen. Da die Glykane die Eigenschaften des Schleims maßgeblich beeinflussen (LIS und SHARON, 1993; VAN KLINKEN et al., 1995; HANSSON, 2020; SURIANO et al., 2022), ist es möglich, dass sich der Schleim des Zäkums, auf Grund der unterschiedlichen O-Glykane, nicht leicht zu einer Schleimschicht formieren kann.

In Untersuchungen von TSIRTSIKOS et al. (2012a); und TSIRTSIKOS et al. (2012b) erfolgte beim Huhn die Identifikation und Vermessung einer Schleimschicht im Jejunum, Ileum und Zäkum mittels Gefrierschnitten. Im

Zäkum wiesen die Autoren Werte von circa 15 bis 17 μm aus. Im Gegensatz zu dieser Studie analysierte die vorliegende Arbeit ausschließlich Zäkum-Präparate der SPF und GF Gruppe; die kov. Gruppe enthielt keine Zäkum-Proben. Dies könnte erklären, weshalb die Schleimschicht nicht sichtbar war, während in den genannten Studien deren Vorhandensein demonstriert wurde, zumal Bakterien im Zäkum eine wesentliche Rolle spielen. In gnotobioten Tiermodellen wurden verschiedentlich signifikante Veränderungen der Mikrobiota sowie des Immunsystems im Vergleich zu konventionell gehaltenen Hühnern beschrieben (LETTMANN, 2015; VOLF et al., 2016; ZENNER et al., 2021). Gerade im Zäkum könnte eine unzureichende Besiedlung mit bestimmten Bakterien Einfluss auf die Schleimschicht ausüben, wodurch deren Darstellung erschwert wird.

Es könnte sich auch um herstellungsbedingte Verluste der Schleimschicht im Zäkum handeln. Die sackförmigen Blinddärme der Hühner (MCLELLAND, 1993) bedingen eine diffizile Herstellung der Präparate. Der Darminhalt der entnommenen Darmabschnitte muss bei der Entnahme, Fixierung und der anschließenden Präparate-Herstellung möglichst unverändert belassen und als ganzer Querschnitt verarbeitet werden. Ein möglicher Verlust der an das Epithel anhaftenden Schleimschicht mitsamt Ingesta ist aufgrund der sackförmigen Form der Blinddärme wahrscheinlicher als im Jejunum oder Kolon. Außerdem sind die Zotten kurz und breit aufsitzend und laufen flach aus (FERRER et al., 1991). Dadurch kann sich der Schleim bei der Herstellung der Präparate leichter ablösen als bei den langen Zotten des Jejunums, zwischen denen der Schleim besser verbleibt. Im Halsteil, wo die Zotten länger sind, könnte sich unter Umständen besser Schleim zwischen den Zotten ansammeln.

3. Kritische Betrachtung der verwendeten Methodik

Die Fixierung nach Carnoy sowie die anschließenden unterschiedlichen histochemischen Schleimfärbungen wurden gewählt, weil sich ihre Eignung zur morphologischen Darstellung der Schleimschicht in früheren Studien sowohl bei verschiedenen Tierarten als auch beim Menschen als geeignet erweisen konnten (OTA und KATSUYAMA, 1992; GARCÍA-DÍAZ et al., 2022; MEZHIBOVSKY et al., 2022; NABI et al., 2022; BIRCHENOUGH et al., 2023; KOÇAK und ÖZAYDIN, 2023; YU et al., 2023; JOHANSSON et al., 2024).

Die chemische Fixierung in der Carnoy-Lösung führt zu weniger Wasserentzug im Vergleich zur Formaldehyd-Fixierung, verursacht jedoch dennoch eine gewisse Schrumpfung des Schleims (OTA und KATSUYAMA, 1992; MATSUO et al., 1997; ERMUND et al., 2013a). Deshalb können die Messwerte der Schleimschichtdicke nicht als tatsächliche Werte gelten. Die reale Dicke der Schleimschicht lässt sich durch andere Verfahren – etwa durch in vitro- oder ex vivo-Verfahren – genauer bestimmen, da dort keine Schrumpfung auftritt (JOHANSSON et al., 2010; JOHANSSON et al., 2024). Meine Vermessungsarbeiten liefern insbesondere im Hinblick auf den Gruppenvergleich dennoch wertvolle Erkenntnisse. Denn mit den verwendeten Verfahren wurde eindeutig gezeigt, dass charakteristische Dicken-Unterschiede in den drei Darmabschnitten bestehen, mit altersabhängigen Veränderungen im Kolon und nicht im Jejunum.

Schrumpfungsprozesse, die durch die Fixierung mit Carnoy hervorgerufen werden, können außerdem die Morphologie der Schleimschicht beeinflussen. Bereits in früheren Studien wurde diskutiert, dass beispielsweise das Auftreten schnurartiger Strukturen durch Schrumpfung bedingt sein kann (ERMUND et al., 2013a). Im Gruppenvergleich gilt es kritisch zu prüfen, welche Zusammenhänge tatsächlich als Schrumpfungs-Artefakte gelten und welche als gruppentypische Veränderungen zu betrachten sind, wie bereits in der Diskussion betont wurde. Vergleiche mit den übrigen Versuchsgruppen legen beispielsweise nahe, dass die im Jejunum beobachtete, luminale Schleimschicht auch als feine, dünne Schleimschicht interpretiert werden kann und nicht ausschließlich Folge einer Schrumpfung ist. Auch die Ablösung der linienartigen Schleimschicht im Jejunum der konv. Gruppe, wie im Diskussionsteil ausführlich erörtert, muss nicht ausschließlich, als Schrumpfungsartefakt betrachtet werden.

Zur Darstellung der Bakterien eignet sich die Kombination mit einer Gram-Färbung, um die Bakterien in der Schleimschicht sichtbar zu machen, wie es bereits in verschiedenen Studien erfolgreich getestet wurde (HENDRICKX ANTONI et al., 2015; SAKATA et al., 2022). In dieser Arbeit lag der Hauptfokus primär auf der genauen Lage der Bakterien in Bezug zur Schleimschicht. Die Mikrobiom-Zusammensetzung lässt sich damit jedoch nicht bestimmen. Die Auswirkungen der bakteriellen Zusammensetzung auf die Schleimschicht sind

ausgesprochen vielschichtig; es wird vermutet, dass sie sogar durch die bakterielle Besiedlung des Muttertieres beeinflusst werden könnten (JOHANSSON et al., 2024). Daher bedingt unter Umständen die genaue Zusammensetzung der Bakterien der SPF Gruppe, dass ihre Schleimschicht der GF Gruppe stark ähnelt. Andere Ergebnisse sind denkbar, wenn gewisse Bakterien dazu kommen. Daher sind genaue bakterienspezifische Untersuchungen erforderlich, um Aussagen über die konkreten Auswirkungen einzelner Keime auf die Darm-Schleimschicht treffen zu können.

Die Grenzziehung der Schleimschicht bei der Dickenmessung hängt maßgeblich von der Färbetechnik und der individuellen Einschätzung ab, wodurch die Ergebnisse der Dickenmessung potenziell verzerrt werden. So lässt sich im Jejunum feststellen, dass bei bestimmten Färbungen ein Teil der luminalen Schleimschicht als solche erachtet wurde und bei anderen nicht. Im Kolon ist die Abgrenzung zwischen luminaler Schleimschicht und Darminhalt deutlich klarer, sodass zwischen den Färbungen kein relevanter Unterschied erkennbar ist. Es ist jedoch zu betonen, dass der Fokus auf dem Gruppenvergleich liegt und dieser deutlich ausgefallen ist. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die wahre Schichtdicke zu bestimmen, idealerweise unter Einsatz automatisierter, digitaler Messmethoden, die ohne subjektiven Einfluss und ohne Färbeungenauigkeiten arbeiten.

Zum Abschluss besteht grundsätzlich eine Begrenzung der Histologie bei der Untersuchung dynamischer Prozesse, etwa der genauen Analyse von Schleimbildung und -degradation. Für diese Zwecke kommen Verfahren mit lebenden Versuchstieren infrage (beispielsweise JOHANSSON et al., 2024), sie sind jedoch mit deutlich höherem Aufwand verbunden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die intestinale Schleimschicht spielt eine zentrale Rolle für den Schutz und die Funktion des Darms und ist bei Menschen und Versuchsnagetieren bereits intensiv erforscht – zur Morphologie beim Haushuhn lagen bislang jedoch kaum Erkenntnisse vor.

Diese Dissertation untersucht die Morphologie der intestinalen Schleimschicht des Haushuhns. Mit histochemischen und morphometrischen Methoden wurden Carnoy-fixierte Transversalschnitte des Jejunums, Zäkums und Kolons von Hühnern aus unterschiedlichen Haltungsbedingungen (konventionell, SPF und keimfrei) und im Altersverlauf untersucht.

Im Jejunum und Kolon konnte eine Schleimschicht (zwischen und über den Zotten) nachgewiesen werden; die im Zäkum weitgehend fehlt. Jejunum: Konventionell gehaltene Tiere weisen eine bakterienreiche Schleimschicht auf, die vom Epithel abgelöst ist. Keimfreie bzw. SPF-Hühner zeigen dagegen eine anhaftende Schleimschicht. Kolon: Die Schleimschicht ist deutlich ausgeprägt, mit Hinweisen für eine Zweischichtigkeit. Konventionell gehaltene Tiere zeigen partiell Ablösungen vom Epithel, keimfreie/SPF-Gruppen weisen durchgehend anhaftende Schleimschichten auf. Bakterien finden sich im Kolon nur vereinzelt in oberen Schleimschichtbereichen. Eine altersabhängige Dickenzunahme der Schleimschicht tritt ausschließlich im Kolon auf.

Die unterschiedlichen Schleimeigenschaften spiegeln regionale physiologische Besonderheiten wider. Im Jejunum liegt der Schleim infolge aktiver Verdauung locker auf und bietet Bakterien Ansiedlungsraum. Die Befunde sprechen dafür, dass spezifische Bakterien die Ablösung vom Epithel fördern. Im Kolon bildet der Schleim eine Barriere. Im Gegensatz zur komplett bakterienfreien Schleimschicht bei Säugern finden sich beim Huhn vereinzelt nachweisbare Keime in oberen Schichten, was eine begrenzte Durchlässigkeit nahelegt. Die fehlende Darstellung im Zäkum könnte auf eine besonders dünne, fragile Schleimschicht hindeuten, was besser mit immunologischer Funktion und notwendiger Antigenpassage vereinbar wäre.

VII. SUMMARY

Studies on the mucous layer in the small and large intestine of domestic chickens

The intestinal mucus layer plays a central role in protecting and functioning of the intestine and has been extensively researched in humans and laboratory rodents – however, little is known about its morphology in domestic chickens.

This dissertation examines the morphology of the intestinal mucus layer of domestic chickens. Histochemical and morphometric methods were used to examine Carnoy-fixed transverse sections of the jejunum, caecum and colon of chickens from different housing conditions (conventional, SPF and germ-free) and at different ages.

A mucus layer (between and above the villi) was detected in the jejunum and colon; this layer is largely absent in the caecum. Jejunum: Conventionally reared animals have a bacteria-rich mucus layer that is detached from the epithelium. Germ-free or SPF chickens, on the other hand, have an adherent mucus layer. Colon: The mucus layer is clearly pronounced, with indications of a two-layer structure. Conventionally kept animals show partial detachment of the epithelium, while germ-free/SPF groups show continuously adhering mucus layers. Bacteria are found only sporadically in the upper mucus layer areas of the colon. An age-related increase in the thickness of the mucus layer occurs exclusively in the colon.

The different mucus properties reflect regional physiological characteristics. In the jejunum, the mucus lies loosely as a result of active digestion and provides a colonisation site for bacteria. The findings suggest that specific bacteria promote detachment from the epithelium. In the colon, the mucus forms a barrier. In contrast to the completely bacteria-free mucus layer in mammals, isolated detectable germs are found in the upper layers of chickens, suggesting limited permeability. The lack of representation in the caecum could indicate a particularly thin, fragile mucus layer, which would be more consistent with immunological function and necessary antigen passage.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Aitken RN. A histochemical study of the stomach and intestine of the chicken. *J Anat* 1958; 92: 453-66.

Al-Marzooqi W, Al-Maskari ZAS, Al-Kharousi K, Johnson EH, El Tahir Y. Diversity of Intestinal Bacterial Microbiota of Indigenous and Commercial Strains of Chickens Using 16S rDNA-Based Analysis. *Animals (Basel)* 2020; 10

Al Hakeem WG, Fathima S, Shanmugasundaram R, Selvaraj RK. *Campylobacter jejuni* in Poultry: Pathogenesis and Control Strategies. *Microorganisms* 2022; 10

Alemka A, Whelan S, Gough R, Clyne M, Gallagher ME, Carrington SD, Bourke B. Purified chicken intestinal mucin attenuates *Campylobacter jejuni* pathogenicity in vitro. *J Med Microbiol* 2010; 59: 898-903.

Alemka A, Corcionivoschi N, Bourke B. Defense and adaptation: the complex inter-relationship between *Campylobacter jejuni* and mucus. *J Anim Sci Biotechnol* 2012; 2: 15.

Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 1919-25.

Amer MM, Amer AM, El-Bayoumi KM. Chicken Gastrointestinal Microbiota, Composition, Function, and Importance. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences* 2023; 54: 403-20.

An R, Robbins D, Rey FE, Thibeault SL. Vocal fold mucus layer: Comparison of histological protocols for visualization in mice. *Laryngoscope Investig Otolaryngol* 2022; 7: 444-53.

Andrew A. Intestinal endocrine cells of chicks around the time of hatching. *Cell and Tissue Research* 1976; 172: 541-51.

Antoni L, Nuding S, Weller D, Gerseemann M, Ott G, Wehkamp J, Stange EF. Human colonic mucus is a reservoir for antimicrobial peptides. *Journal of Crohn's and Colitis* 2013; 7: e652-e64.

Apajalahti J, Kettunen A, Graham H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *Poult Sci* 2004; 60: 223-32.

Arike L, Holmén-Larsson J, Hansson GC. Intestinal Muc2 mucin O-glycosylation is affected by microbiota and regulated by differential expression of glycosyltransferases. *Glycobiology* 2017; 27: 318-28.

Arnesen H, Hitch TCA, Steppeler C, Müller MHB, Knutsen LE, Gunnes G, Angell IL, Ormaasen I, Rudi K, Paulsen JE, Clavel T, Carlsen H, Boysen P. Naturalizing laboratory mice by housing in a farmyard-type habitat confers protection against colorectal carcinogenesis. *Gut Microbes* 2021; 13: 1993581.

Arnesen H, Markussen T, Birchenough G, Birkeland S, Nyström EEL, Hansson GC, Carlsen H, Boysen P. Microbial experience through housing in a farmyard-type environment alters intestinal barrier properties in mouse colons. *Scientific Reports* 2023; 13: 13701.

Atuma C, Strugala V, Allen A, Holm L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G922-9.

Augustine PC. Cell: sporozoite interactions and invasion by apicomplexan parasites of the genus *Eimeria*. *Int J Parasitol* 2001; 31: 1-8.

Axelsson MA, Asker N, Hansson GC. O-glycosylated MUC2 monomer and dimer from LS 174T cells are water-soluble, whereas larger MUC2 species formed early during biosynthesis are insoluble and contain nonreducible intermolecular bonds. *J Biol Chem* 1998; 273: 18864-70.

Bar-Shira E, Cohen I, Elad O, Friedman A. Role of goblet cells and mucin layer in protecting maternal IgA in precocious birds. *Dev Comp Immunol* 2014; 44: 186-94.

Bar Shira E, Friedman A. Innate immune functions of avian intestinal epithelial cells: Response to bacterial stimuli and localization of responding cells in the developing avian digestive tract. *PLoS One* 2018; 13: e0200393.

Barmapsalou V, Dubbelboer IR, Rodler A, Jacobson M, Karlsson E, Pedersen BL, Bergström CAS. Physiological properties, composition and structural profiling of porcine gastrointestinal mucus. *Eur J Pharm Biopharm* 2021; 169: 156-67.

Befus AD, Johnston N, Leslie GA, Bienenstock J. Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny, and some functional characteristics of Peyer's patches. *J Immunol* 1980; 125: 2626-32.

Bennett EP, Mandel U, Clausen H, Gerken TA, Fritz TA, Tabak LA. Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology* 2012; 22: 736-56.

Bergstrom K, Fu J, Johansson ME, Liu X, Gao N, Wu Q, Song J, McDaniel JM, McGee S, Chen W, Braun J, Hansson GC, Xia L. Core 1- and 3-derived O-glycans collectively maintain the colonic mucus barrier and protect against spontaneous colitis in mice. *Mucosal Immunol* 2017; 10: 91-103.

Bergstrom K, Shan X, Casero D, Batushansky A, Lagishetty V, Jacobs JP, Hoover C, Kondo Y, Shao B, Gao L, Zandberg W, Noyovitz B, McDaniel JM, Gibson DL, Pakpour S, Kazemian N, McGee S, Houchen CW, Rao CV, Griffin TM, Sonnenburg JL, McEver RP, Braun J, Xia L. Proximal colon-derived O-glycosylated mucus encapsulates and modulates the microbiota. *Science* 2020; 370: 467-72.

Bergstrom K, Xia L. The barrier and beyond: Roles of intestinal mucus and mucin-type O-glycosylation in resistance and tolerance defense strategies guiding host-microbe symbiosis. *Gut Microbes* 2022; 14: 2052699.

Bergstrom KS, Kissoon-Singh V, Gibson DL, Ma C, Montero M, Sham HP, Ryz N, Huang T, Velcich A, Finlay BB, Chadee K, Vallance BA. Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000902.

Bickel M, Kauffman GL, Jr. Gastric gel mucus thickness: effect of distention, 16,16-dimethyl prostaglandin e2, and carbenoxolone. *Gastroenterology* 1981; 80: 770-5.

Bindari YR, Gerber PF. Centennial Review: Factors affecting the chicken gastrointestinal microbial composition and their association with gut health and productive performance. *Poult Sci* 2022; 101: 101612.

Birchenough GM, Nyström EE, Johansson ME, Hansson GC. A sentinel goblet cell guards the colonic crypt by triggering Nlrp6-dependent Muc2 secretion. *Science* 2016; 352: 1535-42.

Birchenough GMH, Schroeder BO, Sharba S, Arike L, Recktenwald CV, Puértolas-Balint F, Subramani MV, Hansson KT, Yilmaz B, Lindén SK, Bäckhed F, Hansson GC. Muc2-dependent microbial colonization of the jejunal mucus layer is diet sensitive and confers local resistance to enteric pathogen infection. *Cell Rep* 2023; 42: 112084.

Bittner H. Beitrag zur topographischen Anatomie der Eingeweide des Huhnes. Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere 1925; 2: 785- 93.

Bohorquez DV, Samsa LA, Roholt A, Medicetty S, Chandra R, Liddle RA. An enteroendocrine cell-enteric glia connection revealed by 3D electron microscopy. PLoS One 2014; 9: e89881.

Bohorquez DV, Shahid RA, Erdmann A, Kreger AM, Wang Y, Calakos N, Wang F, Liddle RA. Neuroepithelial circuit formed by innervation of sensory enteroendocrine cells. J Clin Invest 2015; 125: 782-6.

Bohórquez DV, Liddle RA. The gut connectome: making sense of what you eat. J Clin Invest 2015; 125: 888-90.

Branton SL, Lott BD, Morgan GW, Deaton JW. Position of Meckel's diverticulum in broiler-type chickens. Poult Sci 1988; 67: 677-9.

Brownlee IA, Havler ME, Dettmar PW, Allen A, Pearson JP. Colonic mucus: secretion and turnover in relation to dietary fibre intake. Proc Nutr Soc 2003; 62: 245-9.

Bülck C, Nyström EEL, Koudelka T, Mannbar-Frahm M, Andresen G, Radhouani M, Tran F, Scharfenberg F, Schrell F, Armbrust F, Dahlke E, Zhao B, Vervaeke A, Theilig F, Rosenstiel P, Starkl P, Rosshart SP, Fickenscher H, Tholey A, Hansson GC, Becker-Pauly C. Proteolytic processing of galectin-3 by meprin metalloproteases is crucial for host-microbiome homeostasis. Sci Adv 2023; 9: eadf4055.

Calhoun ML. Gross Anatomy. In: Microscopic Anatomy of the Digestive System of the Chicken Ames, Iowa: Iowa State College Press 1954: 29-85.

Calik A, Ergün A. Effect of lactulose supplementation on growth performance, intestinal histomorphology, cecal microbial population, and short-chain fatty acid composition of broiler chickens. *Poult Sci* 2015; 94: 2173-82.

Calvigioni M, Panattoni A, Biagini F, Donati L, Mazzantini D, Massimino M, Daddi C, Celandroni F, Vozzi G, Ghelardi E. Development of an In Vitro Model of the Gut Microbiota Enriched in Mucus-Adhering Bacteria. *Microbiol Spectr* 2023; 11: e0033623.

Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, Severi C. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann Gastroenterol* 2015; 28: 203-9.

Carrington SD, Irwin JA, Liu L, Rudd PM, Matthews E, Corfield AP. Analysing mucin degradation. *Methods Mol Biol* 2012; 842: 191-215.

Casteleyn C, Doom M, Lambrechts E, Van den Broeck W, Simoens P, Cornillie P. Locations of gut-associated lymphoid tissue in the 3-month-old chicken: a review. *Avian Pathol* 2010; 39: 143-50.

Caviedes-Vidal E, McWhorter TJ, Lavin SR, Chediack JG, Tracy CR, Karasov WH. The digestive adaptation of flying vertebrates: high intestinal paracellular absorption compensates for smaller guts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 19132-7.

Chang M, Alsaigh T, Kistler EB, Schmid-Schönbein GW. Breakdown of mucin as barrier to digestive enzymes in the ischemic rat small intestine. *PLoS One* 2012; 7: e40087.

Cheled-Shoval SL, Gamage NSW, Amit-Romach E, Forder R, Marshal J, Van Kessel A, Uni Z. Differences in intestinal mucin dynamics between germ-free and conventionally reared chickens after mannan-oligosaccharide supplementation. *Poultry Science* 2014; 93: 636-44.

Chodnik KS. A cytological study of the alimentary tract of the domestic fowl, *Gallus domesticus*. Q J Microsc Sci 1947; 88: 419-43.

Cisek AA, Binek M. Chicken intestinal microbiota function with a special emphasis on the role of probiotic bacteria. Pol J Vet Sci 2014; 17: 385-94.

Clavijo V, Flórez MJV. The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. Poult Sci 2018; 97: 1006-21.

Cloetta M. Beiträge zur mikroskopischen Anatomie des Vogeldarmes / von M. Cloetta. Arch Mikrosk Anat 1893; Bd 41 Separat-Abdruck: 1-35.

Collier CT, Hofacre CL, Payne AM, Anderson DB, Kaiser P, Mackie RI, Gaskins HR. Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth. Veterinary Immunology and Immunopathology 2008; 122: 104-15.

Corfield AP. Mucins: a biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. Biochim Biophys Acta 2015; 1850: 236-52.

Corr SC, Gahan CC, Hill C. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. FEMS Immunol Med Microbiol 2008; 52: 2-12.

Cox KE, Liu S, Lwin TM, Hoffman RM, Batra SK, Bouvet M. The Mucin Family of Proteins: Candidates as Potential Biomarkers for Colon Cancer. Cancers 2023; 15: 1491.

Creeth JM. Constituents of mucus and their separation. Br Med Bull 1978; 34: 17-24.

Cullen TW, Trent MS. A link between the assembly of flagella and lipooligosaccharide of the Gram-negative bacterium *Campylobacter jejuni*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 5160-5.

Derrien M, van Passel MW, van de Bovenkamp JH, Schipper RG, de Vos WM, Dekker J. Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes* 2010; 1: 254-68.

Duangnumsawang Y, Zentek J, Goodarzi Boroojeni F. Development and Functional Properties of Intestinal Mucus Layer in Poultry. *Front Immunol* 2021; 12: 745849.

Dubbelboer IR, Bampatsalou V, Rodler A, Karlsson E, Nunes SF, Holmberg J, Häggström J, Bergström CAS. Gastrointestinal mucus in dog: Physiological characteristics, composition, and structural properties. *Eur J Pharm Biopharm* 2022; 173: 92-102.

Elling-Staats ML, Gilbert MS, Smidt H, Kwakkel RP. Caecal protein fermentation in broilers: a review. *World's Poultry Science Journal* 2022; 78: 103-23.

Ermund A, Schütte A, Johansson MEV, Gustafsson JK, Hansson GC. 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. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013a; 305: G341-G7.

Ermund A, Gustafsson JK, Hansson GC, Keita AV. Mucus properties and goblet cell quantification in mouse, rat and human ileal Peyer's patches. *PLoS One* 2013b; 8: e83688.

Ermund A, Meiss LN, Scholte BJ, Hansson GC. Hypertonic saline releases the attached small intestinal cystic fibrosis mucus. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2015; 42: 69-75.

Escande F, Porchet N, Bernigaud A, Petitprez D, Aubert JP, Buisine MP. The mouse secreted gel-forming mucin gene cluster. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1676: 240-50.

Evans EW, Beach GG, Wunderlich J, Harmon BG. Isolation of antimicrobial peptides from avian heterophils. *J Leukoc Biol* 1994; 56: 661-5.

Ferrando C, Vergara P, Jimenez M, Gonalons E. Study of the rate of passage of food with chromium-mordanted plant cells in chickens (*Gallus gallus*). *Q J Exp Physiol* 1987; 72: 251-9.

Ferrer R, Planas JM, Durfort M, Moretó M. Morphological study of the caecal epithelium of the chicken (*Gallus Gallus domesticus* L.). *Br Poult Sci* 1991; 32: 679-91.

Ferrer R, Planas JM, Moreto M. Cell apical surface area in enterocytes from chicken small and large intestine during development. *Poult Sci* 1995; 74: 1995-2002.

Florey HW. The secretion and function of intestinal mucus. *Gastroenterology* 1962; 43: 326-9.

Forder RE, Howarth GS, Tivey DR, Hughes RJ. Bacterial modulation of small intestinal goblet cells and mucin composition during early posthatch development of poultry. *Poult Sci* 2007; 86: 2396-403.

Forder REA, Nattrass GS, Geier MS, Hughes RJ, Hynd PI. Quantitative analyses of genes associated with mucin synthesis of broiler chickens with induced necrotic enteritis. *Poult Sci* 2012; 91: 1335-41.

Forstner J, Taichman N, Kalninis V, Forstner G. Intestinal Goblet Cell Mucus: Isolation and Identification by Immunofluorescence of a Goblet Cell Glycoprotein. *J Cell Sci* 1973; 12: 585-601.

Friedman A, Bar-shira E, Skan D. Ontogeny of gut associated immune competence in the chick. *Poult Sci* 2003; 59: 209-19.

Gadow H. On the Taxonomic Value of the Intestinal Convolutions in Birds. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 1889: 303- 16.

Gadow H, Selenka E. Vögel. In: Bronn`s Klassen und Ordnungen des Thier-Reichs Leipzig: C.F. Winter'sche Verlagshandlung 1891: 304.

Gallego P, Garcia-Bonete MJ, Trillo-Muyo S, Recktenwald CV, Johansson MEV, Hansson GC. The intestinal MUC2 mucin C-terminus is stabilized by an extra disulfide bond in comparison to von Willebrand factor and other gel-forming mucins. *Nat Commun* 2023; 14: 1969.

García-Díaz M, Cendra MDM, Alonso-Roman R, Urdániz M, Torrents E, Martínez E. Mimicking the Intestinal Host-Pathogen Interactions in a 3D In Vitro Model: The Role of the Mucus Layer. *Pharmaceutics* 2022; 14

Garcia MA, Nelson WJ, Chavez N. Cell-Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018; 10

Geisler C, Jarvis DL. Effective glycoanalysis with Maackia amurensis lectins requires a clear understanding of their binding specificities. *Glycobiology* 2011; 21: 988-93.

Gerbe F, Legraverend C, Jay P. The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 2012; 69: 2907-17.

Gerken TA, Gilmore M, Zhang J. Determination of the site-specific oligosaccharide distribution of the O-glycans attached to the porcine submaxillary mucin tandem repeat. Further evidence for the modulation of O-glycans side chain structures by peptide sequence. *J Biol Chem* 2002; 277: 7736-51.

Geyra A, Uni Z, Sklan D. The effect of fasting at different ages on growth and tissue dynamics in the small intestine of the young chick. *Br J Nutr* 2001; 86: 53-61.

Godl K, Johansson ME, Lidell ME, Morgelin M, Karlsson H, Olson FJ, Gum JR, Jr., Kim YS, Hansson GC. The N terminus of the MUC2 mucin forms trimers that are held together within a trypsin-resistant core fragment. *J Biol Chem* 2002; 277: 47248-56.

Graney DO. Electron microscopic observations on the morphology of intestinal capillaries in the chicken and the transcapillary passage of chylomicra during fat absorption. *Anat Rec* 1967; 157: 250.

Grau H. Anatomie der Hausvögel. In: Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere 18. Auflage. Ellenberger W, Baum H, Zietzschmann O, Ackerknecht E, Grau H, eds. Berlin: Springer Verlag 1943: 1073- 124.

Grootjans J, Hundscheid IH, Lenaerts K, Boonen B, Renes IB, Verheyen FK, Dejong CH, von Meyenfeldt MF, Beets GL, Buurman WA. Ischaemia-induced mucus barrier loss and bacterial penetration are rapidly counteracted by increased goblet cell secretory activity in human and rat colon. *Gut* 2013; 62: 250-8.

Guerry P. Campylobacter flagella: not just for motility. *Trends Microbiol* 2007; 15: 456-61.

Guo X, Lv J, Xi R. The specification and function of enteroendocrine cells in *Drosophila* and mammals: a comparative review. *Febs j* 2022; 289: 4773-96.

Gustafsson JK, Ermund A, Johansson ME, Schutte A, Hansson GC, Sjövall H. An ex vivo method for studying mucus formation, properties, and thickness in human colonic biopsies and mouse small and large intestinal explants. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 302: G430-8.

Gustafsson JK, Davis JE, Rappai T, McDonald KG, Kulkarni DH, Knoop KA, Hogan SP, Fitzpatrick JA, Lencer WI, Newberry RD. Intestinal goblet cells sample and deliver lumenal antigens by regulated endocytic uptake and transcytosis. *Elife* 2021; 10

Hansson GC. Mucins and the Microbiome. *Annu Rev Biochem* 2020; 89: 769-93.

He C, Gao H, Xin S, Hua R, Guo X, Han Y, Shang H, Xu J. View from the Biological Property: Insight into the Functional Diversity and Complexity of the Gut Mucus. *Int J Mol Sci* 2023; 24

Hendel SK, Kellermann L, Hausmann A, Bindselev N, Jensen KB, Nielsen OH. Tuft Cells and Their Role in Intestinal Diseases. *Front Immunol* 2022; 13: 822867.

Hendrickx Antoni PA, Top J, Bayjanov Jumamurat R, Kemperman H, Rogers Malbert RC, Paganelli Fernanda L, Bonten Marc JM, Willems Rob JL. Antibiotic-Driven Dysbiosis Mediates Intraluminal Agglutination and Alternative Segregation of *Enterococcus faecium* from the Intestinal Epithelium. *mBio* 2015; 6: 10.1128/mbio.01346-15.

Henneberger R, Birch D, Bergquist P, Walter M, Anitori RP. The fluorescent dyes TO-PRO-3 and TOTO-3 iodide allow detection of microbial cells in soil samples without interference from background fluorescence. *BioTechniques* 2011; 51: 190-2.

Henriksnas J, Phillipson M, Storm M, Engstrand L, Soleimani M, Holm L. Impaired mucus-bicarbonate barrier in *Helicobacter pylori*-infected mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G396-403.

Herath M, Hosie S, Bornstein JC, Franks AE, Hill-Yardin EL. The Role of the Gastrointestinal Mucus System in Intestinal Homeostasis: Implications for Neurological Disorders. *Front Cell Infect Microbiol* 2020; 10: 248.

Hermans D, Martel A, Van Deun K, Verlinden M, Van Immerseel F, Garmyn A, Messens W, Heyndrickx M, Haesebrouck F, Pasmans F. Intestinal mucus protects *Campylobacter jejuni* in the ceca of colonized broiler chickens against the bactericidal effects of medium-chain fatty acids. *Poult Sci* 2010; 89: 1144-55.

Hermans D, Van Deun K, Martel A, Van Immerseel F, Messens W, Heyndrickx M, Haesebrouck F, Pasmans F. Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. *Vet Res* 2011; 42: 82.

Herrmann A, Davies JR, Lindell G, Martensson S, Packer NH, Swallow DM, Carlstedt I. Studies on the "insoluble" glycoprotein complex from human colon. Identification of reduction-insensitive MUC2 oligomers and C-terminal cleavage. *J Biol Chem* 1999; 274: 15828-36.

Hodges RD, Michael E. Structure and histochemistry of the normal intestine of the fowl. III. The fine structure of the duodenal crypt. *Cell Tissue Res* 1975; 160: 125-38.

Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 45-60.

Honda K, Takeda K. Regulatory mechanisms of immune responses to intestinal bacteria. *Mucosal Immunol* 2009; 2: 187-96.

Imondi AR, Bird FH. The turnover of intestinal epithelium in the chick. *Poult Sci* 1966; 45: 142-7.

Jakobsson HE, Rodriguez-Pineiro AM, Schutte A, Ermund A, Boysen P, Bemark M, Sommer F, Backhed F, Hansson GC, Johansson ME. The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Rep.* 2015; 16: 164-77.

Janicka-Kłos A, Janek T, Burger J, Czapor-Irزابek H. Human salivary MUC7 mucin fragment and its analogues. Coordination and biological studies. *J Inorg Biochem* 2020; 203: 110923.

Jiang Z, Applegate TJ, Lossie AC. Cloning, annotation and developmental expression of the chicken intestinal MUC2 gene. *PLoS One* 2013; 8: e53781.

Johansson Å, Subramani MV, Yilmaz B, Nyström E, Layunta E, Arike L, Sommer F, Rosenstiel P, Vereecke L, Holm LM, Wullaert A, Pelaseyed T, Johansson MEV, Birchenough GMH. Neonatal microbiota colonization drives maturation of primary and secondary goblet cell mediated protection in the pre-weaning colon. *bioRxiv* 2024: 2024.07.03.601781.

Johansson ME, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 15064-9.

Johansson ME, Thomsson KA, Hansson GC. Proteomic analyses of the two mucus layers of the colon barrier reveal that their main component, the Muc2 mucin, is strongly bound to the Fcgbp protein. *J Proteome Res* 2009; 8: 3549-57.

Johansson ME, Gustafsson JK, Sjöberg KE, Petersson J, Holm L, Sjövall H, Hansson GC. Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model. *PLoS One* 2010; 5: e12238.

Johansson ME, Larsson JM, Hansson GC. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108 Suppl 1: 4659-65.

Johansson ME, Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10: 352-61.

Johansson ME, Gustafsson JK, Holmen-Larsson J, Jabbar KS, Xia L, Xu H, Ghishan FK, Carvalho FA, Gewirtz AT, Sjoval H, Hansson GC. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut* 2014; 63: 281-91.

Johansson ME, Jakobsson HE, Holmén-Larsson J, Schütte A, Ermund A, Rodríguez-Piñeiro AM, Arike L, Wising C, Svensson F, Bäckhed F, Hansson GC. Normalization of Host Intestinal Mucus Layers Requires Long-Term Microbial Colonization. *Cell Host Microbe* 2015; 18: 582-92.

Jordan N, Newton J, Pearson J, Allen A. A novel method for the visualization of the in situ mucus layer in rat and man. *Clin Sci (Lond)* 1998; 95: 97-106.

Karcher DM, Applegate T. Survey of enterocyte morphology and tight junction formation in the small intestine of avian embryos. *Poult Sci* 2008; 87: 339-50.

Kemper L, Hensel A. *Campylobacter jejuni*: targeting host cells, adhesion, invasion, and survival. *Appl Microbiol Biotechnol* 2023; 107: 2725-54.

Kerss S, Allen A, Garner A. 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. *Clin Sci (Lond)* 1982; 63: 187-95.

Kitagawa H, Shiraishi S, Imagawa T, Uehara M. Ultrastructural characteristics and lectin-binding properties of M cells in the follicle-associated epithelium of chicken caecal tonsils. *J Anat* 2000; 197 Pt 4: 607-16.

Koçak YR, Özyayın T. Histological and histochemical characteristics of the developing chicken (*Gallus gallus domesticus*) cecum. *Anat Histol Embryol* 2023; 52: 778-88.

Krüger A. Beiträge zur makro- und mikroskopischen Anatomie des Darms von Gallus domesticus unter besonderer Berücksichtigung der Darmzotten. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. 1926; 34: 112-3.

Kumar P, Shukla P, Kumari S, Dixit R, Narayan G, Dixit VK, Khanna AK. Expression of Mucoproteins in Gallbladder Cancer. Indian Journal of Surgery 2022; 84: 456-62.

Lamblin G, Aubert JP, Perini JM, Klein A, Porchet N, Degand P, Roussel P. Human respiratory mucins. Eur Respir J 1992; 5: 247-56.

Lan MS, Batra SK, Qi WN, Metzgar RS, Hollingsworth MA. Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA. J Biol Chem 1990; 265: 15294-9.

Lang T, Alexandersson M, Hansson GC, Samuelsson T. Bioinformatic identification of polymerizing and transmembrane mucins in the puffer fish Fugu rubripes. Glycobiology 2004; 14: 521-7.

Lang T, Hansson GC, Samuelsson T. An inventory of mucin genes in the chicken genome shows that the mucin domain of Muc13 is encoded by multiple exons and that ovomucin is part of a locus of related gel-forming mucins. BMC Genomics 2006; 7

Lang T, Hansson GC, Samuelsson T. Gel-forming mucins appeared early in metazoan evolution. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104: 16209-14.

Lang T, Klasson S, Larsson E, Johansson ME, Hansson GC, Samuelsson T. Searching the Evolutionary Origin of Epithelial Mucus Protein Components- Mucins and FCGBP. Mol Biol Evol 2016; 33: 1921-36.

Lang T, Pelaseyed T. Discovery of a MUC3B gene reconstructs the membrane mucin gene cluster on human chromosome 7. PLoS One 2022; 17: e0275671.

Larsson JM, Karlsson H, Sjövall H, Hansson GC. A complex, but uniform O-glycosylation of the human MUC2 mucin from colonic biopsies analyzed by nanoLC/MSn. *Glycobiology* 2009; 19: 756-66.

Leroy X, Copin MC, Devisme L, Buisine MP, Aubert JP, Gosselin B, Porchet N. Expression of human mucin genes in normal kidney and renal cell carcinoma. *Histopathology* 2002; 40: 450-7.

Lettmann S. Einfluss der intestinalen Mikroflora auf die Entwicklung des mukosalen Immunsystems des Hühnerdarms, 147. Diss. med. vet. 2015.

Lievin-Le Moal V, Servin AL. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 315-37.

Lis H, Sharon N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur J Biochem* 1993; 218: 1-27.

Liu K, Jia M, Wong EA. Delayed access to feed affects broiler small intestinal morphology and goblet cell ontogeny. *Poult Sci* 2020; 99: 5275-85.

Low KE, Smith SP, Abbott DW, Boraston AB. The glycoconjugate-degrading enzymes of *Clostridium perfringens*: Tailored catalysts for breaching the intestinal mucus barrier. *Glycobiology* 2020; 31: 681-90.

Luis AS, Hansson GC. Intestinal mucus and their glycans: A habitat for thriving microbiota. *Cell Host Microbe* 2023; 31: 1087-100.

Luis AS, Yates EA, Cartmell A. Functions and specificity of bacterial carbohydrate sulfatases targeting host glycans. *Essays Biochem* 2023; 67: 429-42.

Macedonia MC, Drewes JL, Markham NO, Simmons AJ, Roland JT, Vega PN, Scurrah CR, Coffey RJ, Shrubsole MJ, Sears CL, Lau KS. Clinically adaptable polymer enables simultaneous spatial analysis of colonic tissues and biofilms. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2020; 6: 33.

MacMillan JL, Vicaretti SD, Noyovitz B, Xing X, Low KE, Inglis GD, Zaytsoff SJM, Boraston AB, Smith SP, Uwiera RRE, Selinger LB, Zandberg WF, Abbott DW. Structural analysis of broiler chicken small intestinal mucin O-glycan modification by *Clostridium perfringens*. *Poult Sci* 2019; 98: 5074-88.

Malewitz TD, Calhoun ML. The Gross and Microscopic Anatomy of the Digestive Tract, Spleen, Kidney, Lungs and Heart of the Turkey. *Poultry Science* 1958; 37: 388-98.

Malmberg EK, Noaksson KA, Phillipson M, Johansson ME, Hinojosa-Kurtzberg M, Holm L, Gendler SJ, Hansson GC. Increased levels of mucins in the cystic fibrosis mouse small intestine, and modulator effects of the Muc1 mucin expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G203-10.

Mantani Y, Sakata N, Kubota N, Shimada A, Nakanishi S, Yokoyama T, Hoshi N. Diurnal changes in bacterial settlement on the Peyer's patch and surrounding mucosa in the rat ileum and its effect against the intestinal immune system. *Cell Tissue Res* 2023; 393: 83-95.

Marcolla CS, Ju T, Lantz HL, Willing BP. Investigating the cecal microbiota of broilers raised in extensive and intensive production systems. *Microbiol Spectr* 2023; 11: e0235223.

Martens EC, Roth R, Heuser JE, Gordon JI. Coordinate regulation of glycan degradation and polysaccharide capsule biosynthesis by a prominent human gut symbiont. *J Biol Chem* 2009; 284: 18445-57.

Matsumoto R, Hashimoto Y. Distribution and developmental change of lymphoid tissues in the chicken proventriculus. *J Vet Med Sci* 2000; 62: 161-7.

- Matsuo K, Ota H, Akamatsu T, Sugiyama A, T. K. Histochemistry of the surface mucous gel layer of the human colon. *Gut* 1997; 40: 782- 9.
- McDole JR, Wheeler LW, McDonald KG, Wang B, Konjufca V, Knoop KA, Newberry RD, Miller MJ. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature* 2012; 483: 345-9.
- McGuckin MA, Linden SK, Sutton P, Florin TH. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9: 265-78.
- McLelland J. Apparatus digestorius (Systema alimentarium). In: *Handbook of Avian Anatomy: Nomina Anatomica Avium*, 2 edn. Baumel JJ, King AS, Braezile JE, Evans EE, Vanden Berge C, eds. Cambridge, Massachusetts: Nuttall Ornithological Club 1993: 301- 27.
- McQueen S, Hutton D, Allen A, Garner A. Gastric and duodenal surface mucus gel thickness in rat: effects of prostaglandins and damaging agents. *Am J Physiol* 1983; 245: G388-93.
- Mehdizadeh Gohari I, M AN, Li J, Shrestha A, Uzal F, B AM. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. *Virulence* 2021; 12: 723-53.
- Mesa-Pineda C, Navarro-Ruíz JL, López-Osorio S, Chaparro-Gutiérrez JJ, Gómez-Osorio LM. Chicken Coccidiosis: From the Parasite Lifecycle to Control of the Disease. *Front Vet Sci* 2021; 8: 787653.
- Mezhibovsky E, Wu Y, Bawagan FG, Tveter KM, Szeto S, Roopchand D. Impact of grape polyphenols on *Akkermansia muciniphila* and the gut barrier. *AIMS Microbiol* 2022; 8: 544-65.
- Michel G, Gutte G. Zur mikroskopischen Anatomie und Histochemie des Darmkanals von Huhn und Ente. *Archiv für experimentelle Veterinärmedizin* 1971; 25: 601- 13.

Moncada DM, Kammanadiminti SJ, Chadee K. Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. *Trends Parasitol* 2003; 19: 305-11.

Morris GP, Harding RK, Wallace JL. A functional model for extracellular gastric mucus in the rat. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1984; 46: 239-51.

Nabi F, Arain MA, Fazlani SA, Khalid M, Bugti F, Ali S, Fareed SK, Liu J. Effect of In Ovo Trace Element Supplementation on Immune-Related Cells of the Small Intestine of Post-hatched Broiler Chicken. *Biol Trace Elem Res* 2022;

Nash TJ, Morris KM, Mabbott NA, Vervelde L. Inside-out chicken enteroids with leukocyte component as a model to study host-pathogen interactions. *Commun Biol* 2021; 4: 377.

Nazeer N, Uribe-Diaz S, Rodriguez-Lecompte JC, Ahmed M. Antimicrobial peptides as an alternative to relieve antimicrobial growth promoters in poultry. *Br Poult Sci* 2021; 62: 672-85.

Neutra MR, Grand RJ, Trier JS. Glycoprotein synthesis, transport, and secretion by epithelial cells of human rectal mucosa: normal and cystic fibrosis. *Lab Invest* 1977; 36: 535-46.

Nyström EEL, Martinez-Abad B, Arike L, Birchenough GMH, Nonnecke EB, Castillo PA, Svensson F, Bevins CL, Hansson GC, Johansson MEV. An intercrypt subpopulation of goblet cells is essential for colonic mucus barrier function. *Science* 2021; 372

Orr B, Sutton K, Christian S, Nash T, Niemann H, Hansen LL, McGrew MJ, Jensen SR, Vervelde L. Novel chicken two-dimensional intestinal model comprising all key epithelial cell types and a mesenchymal sub-layer. *Veterinary Research* 2021; 52: 142.

Osho SO, Wang T, Horn NL, Adeola O. Comparison of goblet cell staining methods in jejunal mucosa of turkey poult. *Poult Sci* 2017; 96: 556-9.

Ota H, Katsuyama T. Alternating laminated array of two types of mucin in the human gastric surface mucous layer. *Histochem J* 1992; 24: 86-92.

Owen R (1866) On the anatomy of vertebrates. Vol. II, Birds and Mammals. Longmans, Green and Co., London, p. 167

Pelaseyed T, Bergstrom JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GM, Schutte A, van der Post S, Svensson F, Rodriguez-Pineiro AM, Nystrom EE, Wising C, Johansson ME, Hansson GC. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev* 2014; 260: 8-20.

Pelaseyed T, Hansson GC. Membrane mucins of the intestine at a glance. *J Cell Sci* 2020; 133

Peralta MF, Danelli MGM, Vivas A. Rediscovering the importance of Mucosal Immune System (MIS) in poultry. *Academia Journal of Biotechnology* 2016; 4: 091-5.

Peralta MF, Magnoli A, Alustiza F, Nilson A, Miazzo R, Vivas A. Gut-Associated Lymphoid Tissue: A Key Tissue Inside the Mucosal Immune System of Hens Immunized with *Escherichia coli* F(4). *Front Immunol* 2017; 8: 568.

Perez-Vilar J, Hill RL. The Structure and Assembly of Secreted Mucins. *J Biol Chem* 1999; 274: 31751-4.

Pietrzak B, Tomela K, Olejnik-Schmidt A, Mackiewicz A, Schmidt M. Secretory IgA in Intestinal Mucosal Secretions as an Adaptive Barrier against Microbial Cells. *Int J Mol Sci* 2020; 21

Pigny P, Guyonnet-Duperat V, Hill AS, Pratt WS, Galiegue-Zouitina S, d'Hooge MC, Laine A, Van-Seuningen I, Degand P, Gum JR, Kim YS, Swallow DM, Aubert JP, Porchet N. Human mucin genes assigned to 11p15.5: identification and organization of a cluster of genes. *Genomics* 1996; 38: 340-52.

Pilz H. Artmerkmale am Darmkanal des Hausgeflügels (Gans, Ente, Huhn, Taube). *Gegenbaurs Morphol Jahrb* 1937; 79: 275-304.

Pohlmeyer I. Lektinhistochemische Untersuchungen am Hinterdarm des Haushuhnes unter besonderer Berücksichtigung ausgewählter immunrelevanter Darmbereiche. Diss. med. vet. 2002. Hannover, 56-111.

Proszkowiec-Weglarz M, Schreier LL, Kahl S, Miska KB, Russell B, Elsasser TH. Effect of delayed feeding post-hatch on expression of tight junction- and gut barrier-related genes in the small intestine of broiler chickens during neonatal development. *Poult Sci* 2020; 99: 4714-29.

Puchtler H, Waldrop FS, Meloan SN, Terry MS, Conner HM. Methacarn (methanol-Carnoy) fixation. Practical and theoretical considerations. *Histochemie* 1970; 21: 97-116.

Qu Y, Kahl S, Miska KB, Schreier LL, Russell B, Elsasser TH, Proszkowiec-Weglarz M. The effect of delayed feeding post-hatch on caeca development in broiler chickens. *Br Poult Sci* 2021; 62: 731-48.

Quintana-Hayashi MP, Padra M, Padra JT, Benktander J, Lindén SK. Mucus-Pathogen Interactions in the Gastrointestinal Tract of Farmed Animals. *Microorganisms* 2018; 6

Raba G, Luis AS. Mucin utilization by gut microbiota: recent advances on characterization of key enzymes. *Essays Biochem* 2023; 67: 345-53.

Reicher N, Uni Z. Intestinal brush border assembly during the peri-hatch period and its contribution to surface area expansion. *Poult Sci* 2021; 100: 101401.

Reynolds KL, Cloft SE, Wong EA. Changes with age in density of goblet cells in the small intestine of broiler chicks. *Poultry Science* 2020; 99: 2342-8.

Riedelsheimer B, Büchl-Zimmermann S. Färbungen. In: Romeis - Mikroskopische Technik. Mulisch M, Welsch U, eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2015: 171-282.

Rinttilä T, Apajalahti J. Intestinal microbiota and metabolites—Implications for broiler chicken health and performance. *J Appl Poult Res* 2013; 22: 647-58.

Robinson K, Xiao Y, Johnson TJ, Chen B, Yang Q, Lyu W, Wang J, Fansler N, Becker S, Liu J, Yang H, Zhang G. Chicken Intestinal Mycobiome: Initial Characterization and Its Response to Bacitracin Methylene Disalicylate. *Appl Environ Microbiol* 2020; 86

Sababi M, Nilsson E, Holm L. Mucus and alkali secretion in the rat duodenum: effects of indomethacin, N omega-nitro-L-arginine, and luminal acid. *Gastroenterology* 1995; 109: 1526-34.

Sacranie AI, P. A., Mikkelsen LL, Choct M. Occurrence of reverse peristalsis in broiler chickens. In: *Proceedings of the 19th Australian Poultry Science Symposium, 12-14 February 2007* Sydney, New South Wales, Australia,: 2007: 161-4.

Sakata N, Mantani Y, Nakanishi S, Morishita R, Yokoyama T, Hoshi N. Histological study of diurnal changes in bacterial settlement in the rat alimentary tract. *Cell Tissue Res* 2022; 389: 71-83.

Schokker D, Veninga G, Vastenhouw SA, Bossers A, de Bree FM, Kaal-Lansbergen LM, Rebel JM, Smits MA. Early life microbial colonization of the gut and intestinal development differ between genetically divergent broiler lines. *BMC Genomics* 2015; 16: 418.

Schütte A, Ermund A, Becker-Pauly C, Johansson ME, Rodriguez-Pineiro AM, Bäckhed F, Müller S, Lottaz D, Bond JS, Hansson GC. Microbial-induced meprin β cleavage in MUC2 mucin and a functional CFTR channel are required to release anchored small intestinal mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: 12396-401.

Sellers LA, Allen A, Bennett MK. Formation of a fibrin based gelatinous coat over repairing rat gastric epithelium after acute ethanol damage: interaction with adherent mucus. *Gut* 1987; 28: 835-43.

Smirnov A, Sklan D, Uni Z. Mucin Dynamics in the Chick Small Intestine Are Altered by Starvation. *J. Nutr.* 2004; 134: 736- 42.

Smith AL, Powers C, Beal RK. Chapter 13 - The Avian Enteric Immune System in Health and Disease. In: *Avian Immunology (Second Edition)*. Schat KA, Kaspers B, Kaiser P, eds. Boston: Academic Press 2014: 227-50.

Song C, Chai Z, Chen S, Zhang H, Zhang X, Zhou Y. Intestinal mucus components and secretion mechanisms: what we do and do not know. *Exp Mol Med* 2023; 55: 681-91.

Specian RD, Neutra MR. Mechanism of rapid mucus secretion in goblet cells stimulated by acetylcholine. *J Cell Biol* 1980; 85: 626-40.

Stamilla A, Ruiz-Ruiz S, Artacho A, Pons J, Messina A, Lucia Randazzo C, Caggia C, Lanza M, Moya A. Analysis of the Microbial Intestinal Tract in Broiler Chickens during the Rearing Period. *Biology (Basel)* 2021; 10

Stanley D, Hughes RJ, Moore RJ. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014; 98: 4301-10.

Struwe WB, Gough R, Gallagher ME, Kenny DT, Carrington SD, Karlsson NG, Rudd PM. Identification of O-glycan structures from chicken intestinal mucins provides insight into *Campylobacter jejuni* pathogenicity. *Mol Cell Proteomics* 2015;

Suriano F, Nyström EEL, Sergi D, Gustafsson JK. Diet, microbiota, and the mucus layer: The guardians of our health. *Front Immunol* 2022; 13: 953196.

Svihus B, Itani K. Intestinal Passage and Its Relation to Digestive Processes. *Journal of Applied Poultry Research* 2019; 28: 546-55.

Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3380-9.

Takeuchi K, Magee D, Critchlow J, Matthews J, Silen W. Studies of the pH gradient and thickness of frog gastric mucus gel. *Gastroenterology* 1983; 84: 331-40.

Thomas M, Wongkuna S, Ghimire S, Kumar R, Antony L, Doerner Kinchel C, Singery A, Nelson E, Woyengo T, Chankhamhaengdech S, Janvilisri T, Scaria J. Gut Microbial Dynamics during Conventionalization of Germfree Chicken. *mSphere* 2019; 4: 10.1128/msphere.00035-19.

Thornton DJ, Rousseau K, McGuckin MA. Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Annu Rev Physiol* 2008; 70: 459-86.

Tiedemann F (1810) *Anatomie und Naturgeschichte der Vögel*. Mohr und Zimmer, 444-456

Tierney JB, Matthews E, Carrington SD, Mulcahy G. Interaction of *Eimeria tenella* with intestinal mucin in vitro. *J Parasitol* 2007; 93: 634-8.

Tsirtsikos P, Fegeros K, Balaskas C, Kominakis A, Mountzouris KC. Dietary probiotic inclusion level modulates intestinal mucin composition and mucosal morphology in broilers. *Poult Sci* 2012a; 91: 1860-8.

Tsirtsikos P, Fegeros K, Kominakis A, Balaskas C, Mountzouris KC. Modulation of intestinal mucin composition and mucosal morphology by dietary phytogetic inclusion level in broilers. *Animal* 2012b; 6: 1049-57.

Turk DE. The anatomy of the avian digestive tract as related to feed utilization. *Poult Sci* 1982; 61: 1225-44.

Udumoh AF, Igwebuike UM, Nwaogu IC, Obidike IR. Morphological features of the late-embryo-stage gastrointestinal tract of free-roaming light ecotype Nigerian indigenous chicken. *Anat Histol Embryol* 2024; 53: e13007.

Uni Z, Smirnov A, Sklan D. Pre- and posthatch development of goblet cells in the broiler small intestine: effect of delayed access to feed. *Poult Sci* 2003; 82: 320-7.

Vaishnava S, Yamamoto M, Severson KM, Ruhn KA, Yu X, Koren O, Ley R, Wakeland EK, Hooper LV. The antibacterial lectin RegIII γ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* 2011; 334: 255-8.

van der Post S, Jabbar KS, Birchenough G, Arike L, Akhtar N, Sjovall H, Johansson MEV, Hansson GC. Structural weakening of the colonic mucus barrier is an early event in ulcerative colitis pathogenesis. *Gut* 2019; 68: 2142-51.

Van Klinken BJ, Dekker J, Buller HA, Einerhand AW. Mucin gene structure and expression: protection vs. adhesion. *Am J Physiol* 1995; 269: G613-27.

Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; 11: 821-34.

Volf J, Polansky O, Varmuzova K, Gerzova L, Sekelova Z, Faldynova M, Babak V, Medvecký M, Smith AL, Kaspers B, Velge P, Rychlík I. Transient and Prolonged Response of Chicken Cecum Mucosa to Colonization with Different Gut Microbiota. *PLoS One* 2016; 11: e0163932.

Volk JK, Nyström EEL, van der Post S, Abad BM, Schroeder BO, Johansson Å, Svensson F, Jäverfelt S, Johansson MEV, Hansson GC, Birchenough GMH. The Nlrp6 inflammasome is not required for baseline colonic inner mucus layer formation or function. *J Exp Med* 2019; 216: 2602-18.

Wang L, Li J, Li J, Jr., Li RX, Lv CF, Li S, Mi YL, Zhang CQ. Identification of the Paneth cells in chicken small intestine. *Poult Sci* 2016; 95: 1631-5.

Wang S, You L, Dai M, Zhao Y. Mucins in pancreatic cancer: A well-established but promising family for diagnosis, prognosis and therapy. *J Cell Mol Med* 2020; 24: 10279-89.

Wei S, Morrison M, Yu Z. Bacterial census of poultry intestinal microbiome. *Poult Sci* 2013; 92: 671-83.

Weng M, Walker WA. The role of gut microbiota in programming the immune phenotype. *J Dev Orig Health Dis* 2013; 4: 203-14.

Yamaguchi M, Yamamoto K. Mucin glycans and their degradation by gut microbiota. *Glycoconj J* 2023; 40: 493-512.

Yang H, Wang W, Wang Z, Wang J, Cao Y, Chen Y. Comparative study of intestine length, weight and digestibility on different body weight chickens. *African Journal of Biotechnology* 2013a; 12

Yang N, Garcia MA, Quinton PM. Normal mucus formation requires cAMP-dependent HCO₃⁻ secretion and Ca²⁺-mediated mucin exocytosis. *J Physiol* 2013b; 591: 4581-93.

Yang S, Yu M. Role of Goblet Cells in Intestinal Barrier and Mucosal Immunity. *J Inflamm Res* 2021; 14: 3171-83.

Yeoman CJ, Chia N, Jeraldo P, Sipos M, Goldenfeld ND, White BA. The microbiome of the chicken gastrointestinal tract. *Anim Health Res Rev* 2012; 13: 89-99.

Yildiz HM, Speciner L, Ozdemir C, Cohen DE, Carrier RL. Food-associated stimuli enhance barrier properties of gastrointestinal mucus. *Biomaterials* 2015; 54: 1-8.

Young KT, Davis LM, Dirita VJ. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 665-79.

Yu J, Hu G, Guo X, Cao H, Zhang C. Quercetin Alleviates Inflammation and Energy Deficiency Induced by Lipopolysaccharide in Chicken Embryos. *Animals (Basel)* 2023; 13

Yu L, Xie X, Jiang K, Hong Y, Zhou Z, Mi Y, Zhang C, Li J. Paneth cells mediated the response of intestinal stem cells at the early stage of intestinal inflammation in the chicken. *Poultry Science* 2021; 100: 615-22.

Yu Y, Wang Z, Cao J, Dong Y, Wang T, Chen Y. Effects of monochromatic light stimuli on the development and Muc2 expression of goblet cells in broiler small intestines during embryogenesis. *Poult Sci* 2014; 93: 1801-8.

Zenner C, Hitch TCA, Riedel T, Wortmann E, Tiede S, Buhl EM, Abt B, Neuhaus K, Velge P, Overmann J, Kaspers B, Clavel T. Early-Life Immune System Maturation in Chickens Using a Synthetic Community of Cultured Gut Bacteria. *mSystems* 2021; 6

Zhang G, Sunkara LT. Avian antimicrobial host defense peptides: from biology to therapeutic applications. *Pharmaceuticals (Basel)* 2014; 7: 220-47.

Zhang H, Li D, Liu L, Xu L, Zhu M, He X, Liu Y. Cellular Composition and Differentiation Signaling in Chicken Small Intestinal Epithelium. *Animals (Basel)* 2019; 9

Zhang Q, Eicher SD, Applegate TJ. Development of intestinal mucin 2, IgA, and polymeric Ig receptor expressions in broiler chickens and Pekin ducks. *Poult Sci* 2015;

Zhao Q, Maynard CL. Mucus, commensals, and the immune system. *Gut Microbes* 2022; 14: 2041342.

Zhu Q, Sun P, Zhang B, Kong L, Xiao C, Song Z. Progress on Gut Health Maintenance and Antibiotic Alternatives in Broiler Chicken Production. *Front Nutr* 2021; 8: 692839.

Zietzschmann O. Der Verdauungsapparat der Vögel. In: *Handbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie der Haustiere*, Dritter Band. Ellenberger W, ed. Berlin: Paul Perey 1911: 377- 416.

IX. ANHANG

1. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Schematische Zeichnung des ausgebreiteten Magen-Darm-Trakts des Haushuhns aus PILZ (1937), von links nach rechts (1) Pylorus, (2) Duodenum, dazwischen (3) Pankreas, (4) Jejunum, nach dem Meckelschen Divertikel (5) Ileum,</i>	<i>4</i>
<i>Abbildung 2: Schleimhaut mit aufgelagerten Schleimschicht, mit zwei parallel verlaufenden Schichten unterschiedlicher Musterung im menschlichen Kolon transversum</i>	<i>24</i>
<i>Abbildung 3: Normale Schleimschicht des menschlichen Kolon ascendens mit deutlich zu unterscheidender innerer und äußerer Schleimschicht oberhalb der Epithelzellschicht</i>	<i>24</i>
<i>Abbildung 4: Schematische Darstellung der in vivo gemessenen Dicke und Anhaftung der inneren und äußeren Schleimschicht im Verlauf des Darms, aus ATUMA et al. (2001)</i>	<i>25</i>
<i>Abbildung 5: Dünner strangartiger Schleim im Duodenum Maus.....</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 6: Zweischichtige Schleimschicht im Kolon, wobei die innere Schleimschicht bakterienfrei ist, Maus.....</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 7: Darstellung der Schleimschicht im Jejunum als bakterielles Habitat, Jejunum Maus, aus BIRCHENOUGH et al. (2023), rechts in Vergrößerung,.....</i>	<i>30</i>
<i>Abbildung 8: Lokalisation der Bakterien in der Schleimschicht im Jejunum, Ileum und distales Kolon, aus BIRCHENOUGH et al. (2023)</i>	<i>32</i>
<i>Abbildung 9: Grafische Darstellung des Modells der Schleimschicht im Dünndarm und Dickdarm, aus LUIS und HANSSON (2023)</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 10: Verhältnis neutraler, sulfatierter, sialylierter und gemischt sulfatierter/sialylierter Muzine beim Huhn und dem Menschen in verschiedenen Darmbereichen aus STRUWE et al. (2015).....</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 11: Menge der Expression von MUC2-Transkripten beim Huhn, in der Embryonalphase (E) und nach dem Schlupf (H), im Duodenum (oben), im Jejunum (Mitte) und im Ileum (unten) aus JIANG et al. (2013)</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 12: Relative MUC2-mRNA-Expressionsniveaus beim Huhn</i>	

<i>Embryonaltag (E), nach dem Schlupf (PH), im Ileum (oben), Zäkum (Mitte) und Zäkaltonsillen (unten) aus ZHANG et al. (2015)</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 13: Schleim zwischen den Zotten, links im Jejunum strangartig, rechts im Kolon wabenartig , links: Jejunum, konv., 3 Tage alt, rechts: Kolon, konv., 14 Tage alt, AB 1.0.....</i>	<i>71</i>
<i>Abbildung 14: Farbveränderung des Schleims auf Krypt-Zotten-Achse im konv. Jejunum Jejunum, konv.,.....</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 15: Farbveränderung des Schleims auf Krypt-Zotten-Achse im konv. Kolon</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 16: Altersvergleich der linienförmigen luminalen Schleimschicht im Jejunum der konv. Gruppe, A: 3 Tage, B: 7 Tage, C: 14 Tage, D: 21 Tage, E: 28 Tage, F: 55 Tage nach dem Schlupf, AB 2.5 -Gram-Färbung.....</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 17: Altersvergleich der immer breiter werdenden luminalen Schleimschicht im Kolon der konv. Gruppe, A: 3 Tage, B: 7 Tage, C: 14 Tage, D: 21 Tage, E: 28 Tage, F: 55 Tage nach dem Schlupf, AB 2.5 -Gram-Färbung</i>	<i>76</i>
<i>Abbildung 18: Grafische Gegenüberstellung der Dicke der luminalen Schleimschicht im Jejunum und Kolon der konv. Gruppe (alle Messergebnisse einbezogen)</i>	<i>77</i>
<i>Abbildung 19: Grafische Gegenüberstellung der Messergebnisse von Jejunum und Kolon der konv. Gruppe in den verschiedenen Altersgruppen (alle Messergebnisse</i>	<i>78</i>
<i>Abbildung 20: Grafische Darstellung der Altersunabhängigkeit der luminalen Schleimschichtdicke im Jejunum der konv. Gruppe.....</i>	<i>79</i>
<i>Abbildung 21: Grafische Gegenüberstellung des Einflusses der Färbung auf die luminale Schleimschichtdicken-Messungen im Jejunum der konv. Gruppe bei 3, 7, 14, 21, 28 und 55 Tage alten Hühnern.....</i>	<i>80</i>
<i>Abbildung 22: Grafische Darstellung der Altersabhängigkeit der luminalen Schleimschichtdicke im Kolon(3, 7, 14, 21, 28 und 55Tage alte Hühner)</i>	<i>81</i>
<i>Abbildung 23: Grafische Darstellung der Unabhängigkeit der Färbung von den luminalen Schleimschichtdicken-Messungen im Kolon,.....</i>	<i>82</i>
<i>Abbildung 24: Linienförmige luminale Schleimschicht mit Ablösung vom Epithel im Jejunum, konv., 3 Tage alt, Orangene Doppelpfeile: Ablösung der Schleimschicht vom</i>	<i>83</i>
<i>Abbildung 25: Luminale Schleimschicht im Kolon, vom Epithel abgelös,</i>	

<i>Orange Pfeile markieren die Ablösung des Schleims vom Epithel, schwarze Pfeile kennzeichnen die</i>	<i>84</i>
<i>Abbildung 26: Luminale Schleimschicht direkt am Epithel anhaftend, Kolon, 55 Tage nach dem Schlupf, Schwarze Doppelpfeile markieren die luminale Schleimschicht,</i>	<i>85</i>
<i>Abbildung 27: Feine lückenhafte linienförmige luminale Schleimschicht im Jejunum, konv., 21 Tage alt, Gelbe Pfeile markieren die luminale Schleimschicht, lückenhaft und</i>	<i>86</i>
<i>Abbildung 28: Luminale Schleimschicht im Kolon, kontinuierlich, konv., 3 Tage alt, gestrichelte Linie = Grenze zwischen Schleimschicht und Ingesta</i>	<i>86</i>
<i>Abbildung 29: Bakterien in der luminalen Schleimschicht, nicht in den tieferen Bereichen des Schleims zwischen den Zotten, Jejunum, konv., 3 Tage alt, blauer Pfeil: luminale Schleimschicht; dunkle Punkte und Stäbchen in der Schleimschicht entsprechen durch Gram-Färbung gefärbten Bakterien rote Pfeile: Schleim zwischen den Zotten schwarze Doppelpfeile: Ablösung der Schleimschicht von den Zottenspitzen-Epithelien, Gram- AB 2.5 -Färbung....</i>	<i>88</i>
<i>Abbildung 30: Bakterien in der luminalen Schleimschicht, Jejunum, konv , 28 Tage alt Schwarze Doppelpfeile: luminale Schleimschicht mit eingemischten Bakterien, roter Doppelpfeil: Ablösung der luminaler Schleimschicht vom Epithel, Gram-AB; pH 2,5-Färbung</i>	<i>89</i>
<i>Abbildung 31: Dünne luminale Schleimschicht bei drei Tage alten Huhn trennt Epithel vom bakteriendurchsetzten Darminhalt, Zottenzwischenräume bakterienfrei, Kolon, konv., unten: in Vergrößerung, Gestrichelte Linie: Grenze der luminalen Schleimschicht zum Darminhalt, gelbe Pfeile: Bakterien im Darminhalt nahe Schleimschicht, AB 2.5--Gram-Färbung</i>	<i>91</i>
<i>Abbildung 32: Breite, zottenspitzenzugewandte bakterienarme Schleimschicht mit angrenzender bakteriendichter feingranulierter Schicht, Kolon, konv., 28 Tage alt, Unterer Bildabschnitt: vergrößerte Ansicht des oberen Bildabschnitts; schwarzer Doppelpfeile: luminale Schleimschicht; mit wenigen Bakterien (weiße Pfeile), roter Doppelpfeile: bakteriendichte feingranulierte Schicht, AB 2.5–Gram-Färbung.....</i>	<i>93</i>
<i>Abbildung 33: Dicke Schleimschicht umhüllt komplette Schleimhautfalte im Kolon konv., 55 Tage alt, Grenze zwischen Schleimschicht (leuchtend blau) und Darminhalt (lila), Färbung: AB 2.5–Gram-Färbung</i>	<i>94</i>
<i>Abbildung 34: Bakterien V-förmig im Spitzenbereich des Zwischenzottenspalt</i>	

<i>Kolon konv.</i>	<i>95</i>
<i>Abbildung 35: sichtbarer Farbverlauf im Jejunum GF und SPF in der AB-PAS-Färbung blau-violett im unteren Zottenbereich bis rot-violett im oberen Zottenbereich, sichtbar im Jejunum: links GF, rechts SPF</i>	<i>96</i>
<i>Abbildung 36: leichter bis kein Farbverlauf im Kolon GF und SPF in der AB-PAS-Färbung, GF (links) nur schwach, SPF (rechts) nicht sichtbar.....</i>	<i>97</i>
<i>Abbildung 37: kein Farbverlauf im Zäkum in der AB-PAS-Färbung, links: GF, rechts: SPF</i>	<i>98</i>
<i>Abbildung 38: Vergleich der luminalen Schleimschichtdicke zwischen GF und SPF Gruppe in den drei Darmabschnitten, Kolon: höchste Werte; Jejunum: mittlere Werte; Zäkum: niedrigste Werte, GF Gruppe zeigt in allen drei Abschnitten signifikant geringfügig höhere Werte als die SPF-Gruppe (p<0,001)</i>	<i>99</i>
<i>Abbildung 39: Dicht am Epithel anliegende Schleimschicht, Jejunum, SPF , 55 Tage alt, Schwarze Pfeile: Lumen-nahe Schleimschicht mit Streifung parallel zum Epithel, links nicht mehr nachverfolgbar; AB 1.0</i>	<i>100</i>
<i>Abbildung 40: Schleimschicht mit parallel zum Epithel verlaufender Streifung im Jejunum; SPF , 55 Tage alt, weißer Doppelpfeil: fein laminierte luminale Schleimschicht,</i>	<i>101</i>
<i>Abbildung 41: Grafische Gegenüberstellung der Schleimschichtdicke im Jejunum in den.....</i>	<i>102</i>
<i>Abbildung 42: Grafische Gegenüberstellung des Einflusses der Färbung auf die luminale Schleimschichtdicken-Messungen im Jejunum. Vergleich zwischen GF, SPF und konv. Haltung Untersuchte Tiere: 55 Tage alt. Färbungen: 1) PAS, 2) AB 1.0, 3) AB 2.5,</i>	<i>103</i>
<i>Abbildung 43: Vergleich Schleimhautfalten mit Schleimschicht Kolon bei konv., GF und SPF, alle 55 Tage alt; AB 1,0-Färbung, A. konv. Haltung, hellblaue Schleimschicht ragt knapp über Zottenspitzen hinaus B. SPF Haltung, dünner Saum an Schleim an den Zottenspitzen, blasig aufgeworfen C. GF Haltung, blasiges Aussehen des Schleims mit.....</i>	<i>104</i>
<i>Abbildung 44: Grafische Gegenüberstellung der Schleimschichtdicken im Kolon, Haltungsformen im Vergleich.....</i>	<i>104</i>
<i>Abbildung 45: Grafische Gegenüberstellung des Einflusses der Färbungen auf die Messergebnisse im Kolon bei der GF, SPF und konv. Gruppe, Färbungen: 1) PAS,</i>	<i>105</i>

<i>Abbildung 46: Dünne, blasig-aufgeworfene Schleimschicht umhüllt mehrere Zotten, im</i>	106
<i>Abbildung 47: Grafische Gegenüberstellung der Schleimschichtdicken im Zäkum: Vergleich der SPF und GF Gruppe- geringe Anzahl an Messungen</i>	107
<i>Abbildung 48: Grafische Gegenüberstellung des Einflusses der Färbungen auf die Messergebnisse im Zäkum bei der GF und SPF Tieren, Färbungen:</i> 1) PAS, 2) AB 1.0,.....	107
<i>Abbildung 49: Vergleich der luminalen Schleimschicht im Jejunum zwischen den drei Haltungsformen, 55 Tage alt, links): konv., abgelöst vom Epithel mit Bakterien, mittig) SPF, anhaftend am Epithel einzelne Keime im Darminhalt, rechts) GF, geschichtet ohne Bakterien, rote Doppelpfeile: luminale Schleimschicht,</i>	110
<i>Abbildung 50: Vergleich der luminalen Schleimschicht im Kolon durch die Gram-Färbung zwischen den drei Haltungsformen , 55 Tage alt, Links: konv. mit vielen Bakterien,.....</i>	111
<i>Abbildung 51: Vergleich der luminalen Schleimschicht im Zäkum durch die Gram-Färbung zwischen den zwei Haltungsformen, 55 Tage alt, AB-Gram-Färbung,</i>	112
<i>Abbildung 52: Bakterienhaltiger Darminhalt am Epithel oberhalb eines Lymphzentrums; keine Schleimschicht vorhanden. Zäkum, SPF , 55 Tage alt, AB 2.5.....</i>	113

2. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Zuweisung der Hühner in Versuchsgruppen und zugehörigem Probenmaterial.....</i>	55
<i>Tabelle 2: Materialien und Substanzen für die Fertigstellung der histologischen Präparate</i>	56
<i>Tabelle 3: Benötigte Chemikalien für die PAS-Färbung.....</i>	57
<i>Tabelle 4: Benötigte Chemikalien für die PAS-Färbung nach Diastase-Vorverdauung</i>	57
<i>Tabelle 5. Benötigte Chemikalien für die Färbung Alcianblau pH 2,5:</i>	58
<i>Tabelle 6: Benötigte Chemikalien für die Färbung Alcianblau pH 1,0</i>	58

<i>Tabelle 7: Benötigte Chemikalien für die kombinierte AB 2,5- und Gram-Färbung</i>	<i>58</i>
<i>Tabelle 8: Benötigte Chemikalien für die kombinierte PAS-AB 2,5-Färbung nach Diastase-Vorbehandlung und anschließenden Gram-Färbung</i>	<i>59</i>
<i>Tabelle 9: Messparameter zur Bestimmung der Dicke der luminalen Schleimschicht</i>	<i>68</i>
<i>Tabelle 10: Vermessungsdaten – Erfasst per Excel-Tabelle</i>	<i>68</i>

X. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Fertigstellung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Sven Reese für die Überlassung dieses spannenden Dissertationsthemas, das mir große Freude bereitet hat. Die stetige, geduldige Unterstützung war herausragend; die analytische Vorgehensweise sowie die inspirierenden Forschungsimpulse waren für das Gelingen dieser Arbeit von unschätzbarem Wert.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Bernd Kaspers für die Bereitstellung der Proben; ohne seine Unterstützung hätten die Proben aus München und Frankreich nicht zur Verfügung gestanden

.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Silvia Mitterer, die mich bei der praktischen Durchführung der Laborarbeit unterstützt hat. Ihre jahrelange Erfahrung war eine hervorragende fachliche Stütze, die die Arbeit durch wertvolle Ideen voranbrachte; menschlich war ihre Unterstützung ebenfalls großartig. In schwierigen Abschnitten war ihre aufmunternde Motivation besonders hilfreich.

Meinem Mann Mika sage ich meinen herzlichen Dank für seine langjährige Unterstützung meines Vorhabens. Sein wachsendes Interesse an meiner Forschung bedeutet mir viel.

Meinen lieben Kindern danke ich für ihre aufheiternde Zuneigung.

Ohne meine Mutter wäre meine gesamte Laufbahn nicht möglich gewesen; ihr Ehrgeiz und ihre Selbstständigkeit sind mir stets ein Vorbild.