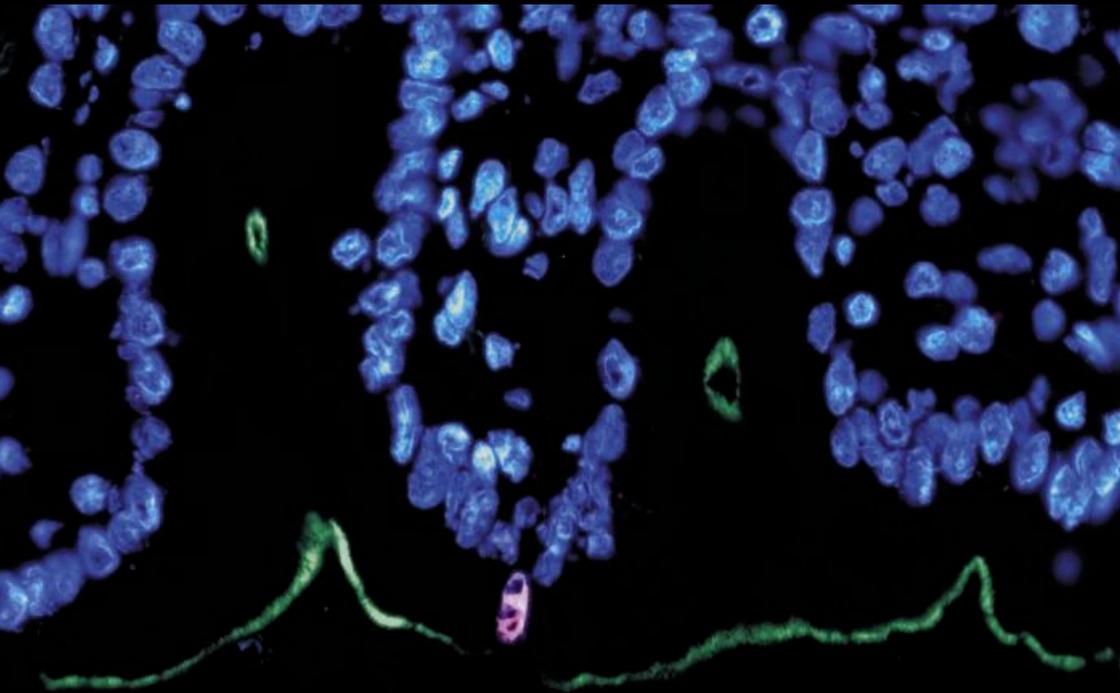


Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Nachweis von Apoptose am Magen- und Darmepithel des Pferdes mittels TUNEL-Methode und Immunhistochemie



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Karen Bodié

Gießen 2006

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2006

© 2006 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen
Printed in Germany

ISBN 3-938026-68-5

Verlag: DVG Service GmbH
Frankfurter Straße 89
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuerin: Prof. Dr. M. Kressin

**Nachweis von Apoptose am Magen-
und Darmepithel des Pferdes
mittels TUNEL-Methode und
Immunhistochemie**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Karen Bodié

Tierärztin aus Karlsruhe

Gießen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. M. Kressin

2. Berichterstatter: Prof. Dr. J. P. Teifke

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Januar 2006

*„Die Natur verbirgt ihr Geheimnis durch die Erhabenheit ihres Wesens,
aber nicht durch List.“*

Albert Einstein, 1923

Meinen Eltern und meinem Bruder gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. LITERATURÜBERSICHT	2
1. Magen-Darm-Trakt des Pferdes	2
1.1. Magen	2
1.2. Dünndarm	5
1.3. Dickdarm	7
2. Magen-Darm-Erkrankungen des Pferdes	10
3. Apoptose	18
3.1. Definition und Vorkommen	18
3.2. Ablauf und Morphologie	19
3.2.1. Die Einleitungsphase der Apoptose	19
3.2.2. Die Ausführungsphase der Apoptose	21
3.2.3. Die Degradationsphase der Apoptose	25
3.3. Regulation und Hemmung der Apoptose	26
3.4. Die Rolle von Adenosin-Triphosphat (ATP) bei der Apoptose	28
4. Apoptose-relevante Proteine	29
4.1. Die Bcl-2 Familie	29
4.2. Cytochrom C	29
4.3. Apoptose-verhindernde Proteine	30
5. Apoptose im Magen-Darm-Trakt	31
5.1. Physiologisches Vorkommen von Apoptose im Magen-Darm-Trakt	32
5.2. Apoptose bei pathologischen Zuständen des Magen-Darm-Traktes	35
5.3. Ischämie-Reperfusion als Auslöser von Apoptose im Magen-Darm-Trakt	36
5.4. Krebs des Magen-Darm-Traktes und die Rolle der Bcl-2 Proteine bei fehlgesteuerter Apoptose	38
5.5. Apoptose und entzündliche Magen-Darm-Erkrankungen	39
5.6. Infektionen und Apoptose	40

5.6.1.	Virale Infektionen und Apoptose	41
5.6.2.	Bakterielle Infektionen und Apoptose	42
5.6.3.	Endoparasiten und Apoptose	44
5.7.	Apoptose ausgelöst durch Toxine	46
5.8.	Apoptose ausgelöst durch Medikamente	46
5.9.	Apoptose im Magen-Darm-Trakt ausgelöst durch Bestrahlung	47
5.10.	Stickstoffmonoxid (NO) und Apoptose im Magen-Darm-Trakt	47
5.11.	„Apoptotic colonic disease“	48
5.12.	Apoptose im Zusammenhang mit Darmresektion	48
6.	Nachweis der Apoptose	49
6.1.	Nachweis der morphologischen Merkmale	49
6.2.	Nachweis der biochemischen Merkmale	49
6.2.1.	TUNEL-Methode	49
6.2.2.	Immunhistochemie	51
7.	Nekrose	52
7.1.	Definition	52
7.2.	Ablauf und Morphologie	52
III.	MATERIAL UND METHODEN	54
1.	Material	54
1.1.	Entnahme und Aufbereitung der Gewebeproben	56
2.	Methoden	56
2.1.	Herstellung der beschichteten Objektträger	56
2.2.	Bearbeitung der Proben und Herstellung der Gefrierschnitte	57
2.3.	Hämatoxilin-Eosin Färbung	58
3.	TUNEL-Methode	59
3.1.	Material	59
3.1.1.	Gewebe	59
3.1.2.	Kit	59
3.1.3.	Phalloidin	59

3.1.4.	Kernfarbstoffe	60
3.1.5.	Verbrauchsmaterialien	60
3.1.6.	Mikroskope	61
3.2.	Methode	61
3.2.1.	Arbeitsprotokoll der TUNEL-Methode	61
3.2.2.	Quantifizierung der TUNEL-positiven Epithelzellkerne	64
4.	Immunhistochemie	66
4.1.	Material	66
4.1.1.	Gewebe	66
4.1.2.	Antikörper	66
4.1.2.1.	Primäre Antikörper	66
4.1.2.2.	Sekundäre Antikörper	67
4.1.2.3.	Detektionssystem	68
4.1.3.	Kernfarbstoffe	69
4.1.4.	Verbrauchsmaterialien	69
4.1.5.	Mikroskope	69
4.2.	Methoden	70
4.2.1.	Färbeprotokoll	71
4.2.2.	Quantifizierung der Lamin A-negativen Epithelzellen	73
5.	Auswertung und Statistik	74
IV.	ERGEBNISSE	75
1.	TUNEL-Methode	76
1.1.	Magen	78
1.1.1.	Margo plicatus	78
1.1.2.	Fundus	80
1.1.3.	Pylorus	82
1.2.	Dünndarm	85
1.2.1.	Duodenum	85
1.2.2.	Jejunum	87
1.2.3.	Ileum	89
1.3.	Dickdarm	92

1.3.1.	Caecum	92
1.3.2.	Colon ascendens	94
1.3.3.	Colon descendens	96
2.	Immunhistochemie	101
2.1.	Lamin A	101
2.1.1.	Magen	103
2.1.1.1.	Margo plicatus	103
2.1.1.2.	Fundus	103
2.1.1.3.	Pylorus	104
2.1.2.	Dünndarm	106
2.1.2.1.	Duodenum	106
2.1.2.2.	Jejunum	106
2.1.2.3.	Ileum	107
2.1.3.	Dickdarm	109
2.1.3.1.	Caecum	109
2.1.3.2.	Colon ascendens	109
2.1.3.3.	Colon descendens	110
2.2.	PARP	113
2.3.	Weitere Antikörper	113
3.	Zusammenfassung der Ergebnisse	114
V.	DISKUSSION	115
1.	Material	115
1.1.	Adulte Pferde	115
1.2.	Fohlen	115
2.	Methoden	116
2.1.	TUNEL-Methode	116
2.2.	Lamin A-Färbung	117
2.3.	Auswertung der Methoden	118
3.	Ergebnisse	119
3.1.	TUNEL-Methode	119

3.1.1.	Magen	120
3.1.2.	Dünndarm	121
3.1.3.	Dickdarm	122
3.1.4.	Vergleich der Altersgruppen (Adultes Pferd/Fohlen)	123
3.1.5.	Bedeutung der Apoptose für pathophysiologische Veränderungen am Magen-Darm-Trakt	125
3.2.	Lamin A	129
3.2.1.	Magen	130
3.2.2.	Dünndarm	130
3.2.3.	Dickdarm	131
3.3.	Vergleich der Ergebnisse der TUNEL-Methode mit den Ergebnissen der Lamin A-Färbung	131
4.	Schlussfolgerungen und Zukunftsperspektiven	132
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	134
VII.	SUMMARY	136
VIII.	ANHANG	138
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	152
X.	DANKSAGUNG	174

Abkürzungsverzeichnis

A 1.1.	Adultes Pferd 1.1.
Abb.	Abbildung
AIF	„Apoptosis inducing factor“
Apaf-1	„Apoptotic protease activating factor-1“
Apaf-2	„Apoptotic protease activating factor-2“ (= Cytochrom C)
APUD	„Amine and precursor uptake decarboxylation“
ATP	Adenosintriphosphat
BH1-4	Bcl-2 homologe Domäne 1-4
BIR	„Baculovirus IAP repeat“
Bp	Basenpaare
BVDV	Bovine Virus Diarrhoe Viren
CAD	Caspasen aktivierte Deoxyribonuclease
CARD	„Caspase-recruiting-domain“
Caspase	„Cytosolic-aspartate-specific-cystein-protease“
<i>C. elegans</i>	Caenorhabditis elegans
<i>CED</i>	„ <i>C. Elegans</i> death domain“
CD95	Fas/Apo-1 Rezeptor
<i>Cl. difficile</i>	Clostridium difficile
<i>Cl. perfringens</i>	Clostridium perfringens
<i>C. parvum</i>	Cryptosporidium parvum
CPP32	Kaspase-3
C-terminal	Carboxy-terminal
Da	Dalton
DAPI	6,6-Diamidino-2-phenylindole-dilactate
DED	„Death effector domain“
DFF	DNA-Fragmentierungs-Faktor
DISC	„Death-inducing signaling complex“
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dUTP	Desoxy-Uridintriphosphat
EAV	Equines Arteritis Virus
EC-Zellen	Enterochromaffine Zellen
<i>E. coli</i>	Escherichia coli

EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGT	„Epidermal growth factor“
EIV	Equine Influenza Viren
et al.	et alteri
F 1	Fohlen 1
F-Aktin	Filament-Aktin
FADD	„Fas-associated death domain“
FasL	Fas-Ligand
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLICE/MACH	Kaspase-8
Geom. Mittelwert	Geometrischer Mittelwert
GEP	Gastroentero-pankreatisch-endokrines System
GTP	Guanosintriphosphat
<i>H. pylori</i>	Helicobacter pylori
IAPs	“Inhibitor of apoptosis proteins”
ICE	Kaspase-1
ICE1	Kaspase-2
ICE2/ICH2	Kaspase-4
ICE3	Kaspase-5
ICELAP6	Kaspase-9
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
IF-Proteine	Intermediärfilament-Proteine
IFN-gamma	Anti-gamma Interferon
kDA	Kilodalton
KW	Körpergewicht
M	Mittelwert
MCH2	Kaspase-6
MCH3	Kaspase-7
MCH4	Kaspase-10
MDT	Magen-Darm-Trakt
MM	Mikrosatelliten-Mutation
MPT	Mitochondriale „permeability transition“
MPT-P	MPT-Pore
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidierte Form)

Na ⁺ -Transport	Natrium-Transport
NIAP	„Neuronal apoptosis inhibitory protein“
NO	Stickstoffmonoxid
NSAIDs	Nichtsteroidale Antiphlogistika
PARP	Polyadenylribosepolymerase
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PTP	„Permeability transition“-Pore
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SF	Streufaktor
Tab.	Tabelle
TdT	Terminale Deoxynucleotidyl-Transferase
TGF-alpha	„Transforming growth factor-alpha“
TGF-beta	„Transforming growth factor-beta“
TGEV	Porcines Transmissible Gastroenteritis Virus
<i>T. gondii</i>	Toxoplasma gondii
TMR (red)	Tetramethyl-rhodamine (red)
TNF-alpha	Tumor Nekrose Faktor alpha
TNF-R1	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1
TRADD	„TNF-receptor-associated death domain“
TRAIL-R1	„TNF-related apoptosis-inducing ligand Rezeptor 1“
TRAIL-R2	„TNF-related apoptosis-inducing ligand Rezeptor 2“
TRAMP	„TNF-receptor-related apoptosis-mediated protein“
TUNEL	„Terminal-deoxy-nucleotidyl-transferase mediated d-UTP nick-end-labeling“
UK	Ulzerative Dickdarmentzündung
VIP	Vasoaktive intestinale Polypeptide
ZK	Zellkern

I. Einleitung

Magen-Darm-Erkrankungen des Pferdes stellen ein weit gefächertes Teilgebiet der klinischen Problematik in der Pferdemedizin dar. Sie kommen bei Fohlen ebenso wie bei adulten Pferden relativ häufig vor. Zum Beispiel ist heute bekannt, dass viele Fohlen und auch adulte Pferde an Ulzera des Magens und des Duodenums erkranken, und dass diese Ulzera zu intermittierenden Koliken und Diarrhoe führen können. Die sogenannte „Fohlenrosse-Diarrhoe“ ist eine Diarrhoe, die um den 10. Tag nach der Geburt auftritt, unterschiedlich lange anhält und in der Regel nur mit wenig gestörtem Allgemeinbefinden einhergeht. Die Ätiologie dieser „Fohlenrosse-Diarrhoe“ ist weitgehend ungeklärt. Eine hauptsächlich beim adulten Pferd vorkommende Diarrhoe, die mit stark gestörtem Allgemeinbefinden einhergeht, ist die als „Colitis X“ bezeichnete Erkrankung des Dickdarmes.

Trotz des häufigen Vorkommens von Magen-Darm-Erkrankungen ist der Magen-Darm-Trakt des Pferdes bis heute noch wenig erforscht. Immer wieder stellt sich die Frage nach Ursachen und Wirkungen bestimmter Krankheiten und auch bestimmter Therapien auf die einzelnen Abschnitte und die einzelnen Schichten des Magen-Darm-Traktes.

Veränderungen und Schädigungen von Epithelzellen des Magen-Darm-Traktes können verschiedene klinische Auswirkungen haben. Der programmierte Zelltod (Apoptose) spielt im physiologischen ebenso wie im pathologischen Magen-Darm-Trakt eine große Rolle. Um Veränderungen auf zellulärer Ebene und Veränderungen der Apoptose deuten zu können, müssen Kenntnisse über die physiologischen Gegebenheiten vorliegen. Aus diesem Grund soll in dieser Studie die Apoptose von Epithelzellen der verschiedenen Abschnitte des klinisch unauffälligen Magen-Darm-Traktes von Pferden verschiedener Altersklassen untersucht werden.

Die Apoptose von Epithelzellen des Magen-Darm-Traktes adulter Pferde und Fohlen wurde mit der TUNEL-Methode und mit immunhistochemischen Methoden nachgewiesen und quantifiziert. Zugleich wurde dabei untersucht, ob Unterschiede in der Apoptose-Rate des Magen- und Darmepithels adulter Pferde und Fohlen vorhanden sind. Ziel dieser Arbeit war es auch festzustellen, ob sich eine Aussage über die Lokalisation der apoptotischen Zellen und die Höhe der Apoptose-Rate bezüglich der Lokalisation im Magen-Darmepithel und bezüglich der verschiedenen Altersstufen treffen lässt und ob diese Ergebnisse mit den Ergebnissen aus Untersuchungen bei anderen Säugetieren und dem Menschen vergleichbar sind. Weiterhin stellt sich die Frage, ob bei Fohlen mit sogenannter „Fohlenrosse-Diarrhoe“ vermehrt apoptotische Zellen im Epithel des Magen-Darm-Traktes zu finden sind.

II. Literaturübersicht

1. Der Magen-Darm-Trakt des Pferdes

1.1. Magen

Das Pferd besitzt einen einhöhligen Magen. Die Grundform des einhöhligen Magens ist die eines gekrümmten Sackes. Als Charakteristikum des Pferdemagens überragt der Mageneingang (Kardia) den Blindsack des Magens (Saccus caecus ventriculi). Der Magen wird in zwei weitere Bereiche unterteilt, den Magenkörper (Corpus ventriculi) und den Übergang zum Magenpförtner (Antrum pyloricum), welcher dann in den Magenausgang (Pylorus) führt. Der Magen des Pferdes ist in Bezug auf seine Körpergröße relativ klein und hat ein Fassungsvermögen von nur 8-15 Litern (Nickel, 1995).

Entsprechend seiner Innenauskleidung wird er als zusammengesetzter Magen bezeichnet. Kardina-nah findet sich drüsenlose, kutane Schleimhaut (Pars nonglandularis). Diese Pars nonglandularis geht in einer markanten Linie (Margo plicatus) in den mit Drüsen Schleimhaut ausgekleideten Teil (Pars glandularis) über. Die Zone mit den Eigendrüsen des Magens wird auch als Fundus bezeichnet (Nickel, 1995).

Die Magenwand besteht von innen nach außen aus einer Schleimhaut, Tunica mucosa mit ihrer Tela submucosa, einer Muskelhaut, Tunica muscularis und dem Bauchfellüberzug, der Tunica serosa.

Die Tunica mucosa lässt sich wiederum in drei Schichten unterteilen: das Oberflächenepithel, Lamina epithelialis mucosae, eine lockere Bindegewebsschicht, die Lamina propria mucosae und eine Muskelschicht, die Lamina muscularis mucosae. Das Oberflächenepithel wird in der Pars nonglandularis von einem mehrschichtigen Plattenepithel gebildet, in dem keine Drüsen vorkommen. Am Margo plicatus geht dieses mehrschichtige Plattenepithel abrupt in ein einschichtig-hochprismatisches Epithel über. Im Bereich des einschichtig-hochprismatischen Epithels befinden sich die Magendrüsen, die in der Lamina propria mucosae liegen (Mosimann & Kohler, 1990). Die Magendrüsen werden nach ihrer Lage benannt. Beim Pferd befinden sich die Kardiadrüsen (Glandulae cardiae) direkt entlang des Margo plicatus. Die Kardiadrüsen sind verästelte und stark geknäulte tubuläre Drüsen mit kurzen Halsstücken. Die Epithelzelle der Drüsenwand ist iso- bis hochprismatisch und produziert ein exokrines, alkalisches, schleimiges Sekret, das das Enzym Lysozym enthält. Zum Teil sind auch schon

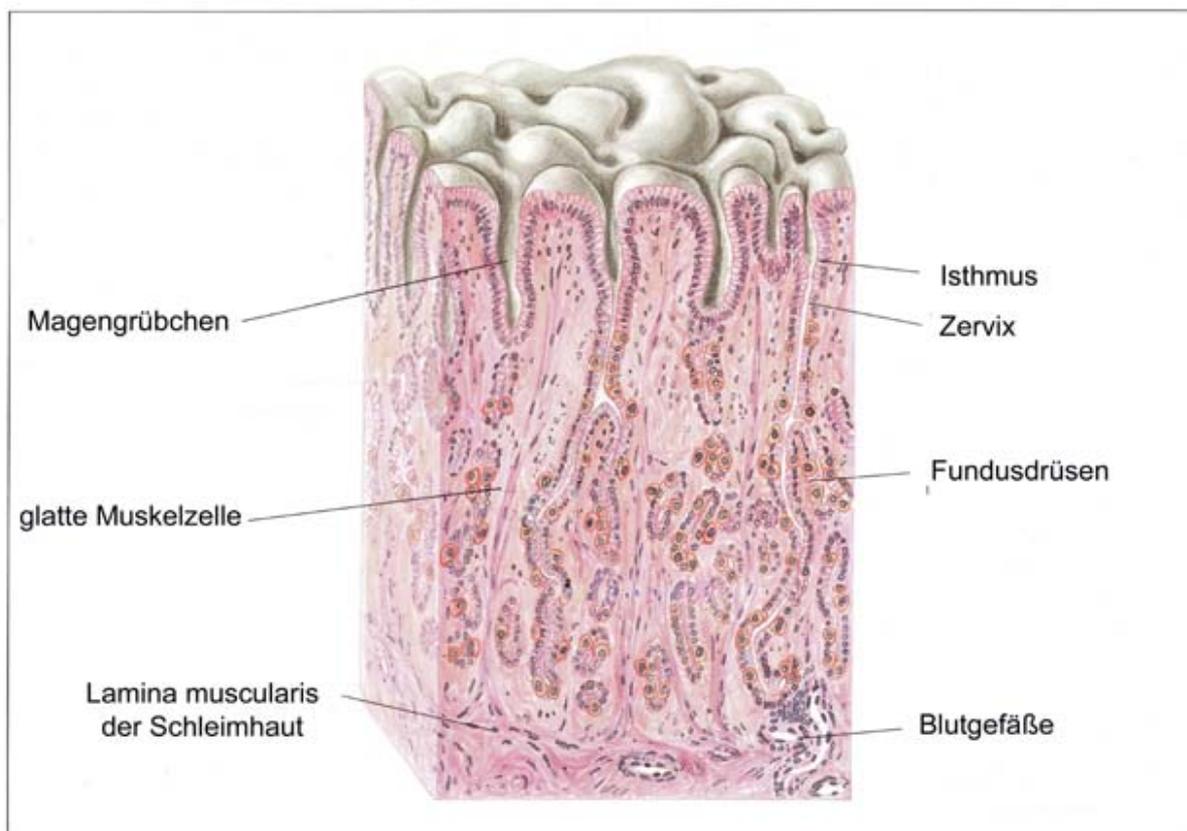
endokrine Drüsenzellen in der Kardiadrüsenzzone vorhanden. Der Fundus und der Magenkörper sind mit Eigendrüsen, auch Fundusdrüsen (*Glandulae gastricae propriae*) genannt, besetzt. Die Eigendrüsen sind dicht gelagerte, gestreckte Schlauchdrüsen, die länger und weniger verzweigt sind als die Kardiadrüsen. Die Schlauchdrüsen durchziehen die gesamte *Lamina propria mucosae* und lassen sich in strukturell und funktionell unterschiedliche Abschnitte mit charakteristischen Zellen unterteilen. Der Isthmus schließt direkt an die Magengrübchen an. Die Isthmuszellen sind flach isoprismatische Wandzellen. Sie dienen wie die Epithelzellen der Magengrübchen der Schleimproduktion, als Ersatzzellen oberflächlich abgeschilfter Deckzellen oder auch der Erneuerung der tiefer gelegenen Drüsenzellen. In der Zervix, dem Halsabschnitt der Schlauchdrüsen, befinden sich neben den Belegzellen sogenannte Nebenzellen. Diese sind iso- bis geringgradig hochprismatisch. Sie geben als Vorläuferzellen der Hauptzellen einen sauren, weniger viskösen Schleim ab, der die Magenschleimhaut zusammen mit dem Schleim der Isthmuszellen und der epithelialen Deckzellen vor den Proteasen und H-Ionen der Belegzellen schützt. Die *Pars principalis*, das Mittelstück und der Drüsengrund, schließt in großer Zahl exokrin sezernierende Hauptzellen und Belegzellen und in geringerer Häufigkeit endokrine Zellen ein. Die Hauptzelle ist hochprismatisch und besitzt Zymogengranula. Zymogengranula enthalten Pepsinogen als Vorstufe des Pepsins, Lipase und Labferment (Chymosin, Rennin). Belegzellen treten häufig in den mittleren Abschnitten der Schlauchdrüsen auf. Sie sind rundlich bis birnenförmig und ihr Zytoplasma ist reich an Mitochondrien. Sie verfügen über intrazelluläre Canaliculi über die sie ihre Salzsäure und einen Intrinsic-Faktor zur Resorption von Vitamin B12 abgeben. In den mittleren Zonen und in den Endabschnitten der Schlauchdrüsen befinden sich auch endokrine Zellen, die im Zusammenwirken mit endokrinen Zellen der Pylorus- und Dünndarmschleimhaut und mit Zellen des Pankreas zum gastroentero-pankreatisch-endokrinen System (GEP) gehören. Dazu gehören enterochromaffine Zellen (Serotonin), D-Zellen (Somatostatin) und G-Zellen (Gastrin). Die Pylorusdrüsen (*Glandulae pyloricae*) öffnen sich in meist verlängerte und erweiterte Magengrübchen. Diese Schlauchdrüsen sind stark verästelt, geschlängelt und geknäuel. Die Einzelzelle ist iso- bis hochprismatisch. Sie sezerniert hauptsächlich ein schleimiges Sekret, das zusätzlich Lysozym enthält. Weiterhin treten auch hier endokrine G-Zellen auf (Liebich, 1993).

Zwischen der *Tunica mucosa* und der *Tunica muscularis* befindet sich die *Tela submucosa*, eine Schicht aus Fettgewebe, stellenweise mit lymphatischen Einlagerungen, die Gefäße und Nerven mit einschließt. Sie dient zusätzlich als Verschiebeschicht.

Die Tunica muscularis ist eine deutlich zweischichtige Muskelschicht aus einer inneren, zirkulären und einer äußeren, longitudinalen, glatten Muskelschicht. Die innere Zirkulärmuskelschicht nimmt zum Magenausgang an Stärke zu und bildet den Musculus sphincter pylori, der beim Pferd doppelt entwickelt ist. Am Mageneingang des Pferdes entwickelt sich als Schleifenmuskel aus schräg verlaufenden Muskelfaserbündeln der Musculus sphincter cardiaes.

Außen schließt sich dann die Tunica serosa an, die von einem Mesothel überzogen ist (Liebich, 1993).

Abb. 1: Schematische Darstellung der Region der Mageneigendrüsen (Fundusdrüsen, *Glandulae gastricae propriae*) modifiziert nach Liebich (1993).



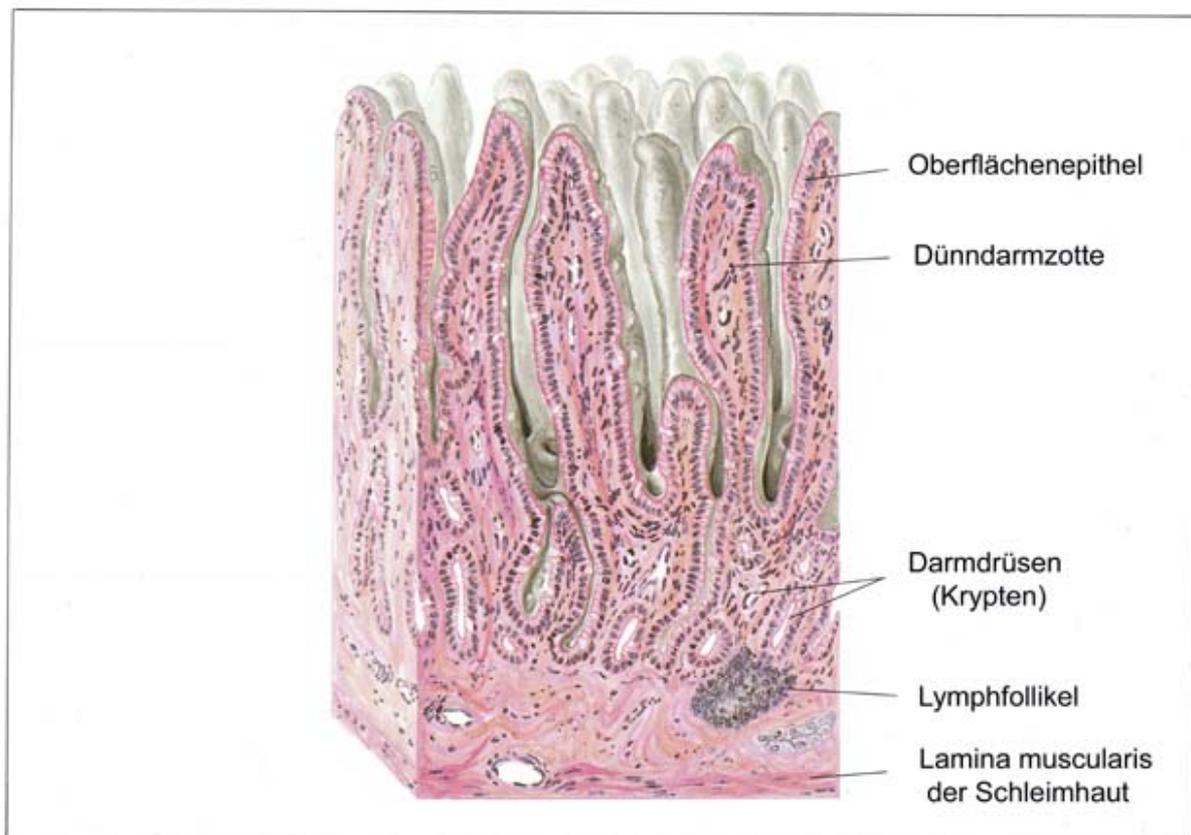
Lamina epithelialis mucosae, die von einem einschichtig-hochprismatischen Epithel gebildet wird, die Lamina propria mucosae, die die Dünndarmzotten bildet, und die Lamina muscularis mucosae, die von glatten Muskelzellen gebildet wird. Eine Dünndarmzotte hat eine Länge zwischen 0,5 und 1,5 mm. Das Epithel des Dünndarmes setzt sich aus verschiedenen Zelltypen zusammen. Die Enterozyten, auch Saumzellen genannt, machen den Hauptanteil der Epithelzellpopulation aus. Die Enterozyten sind hochprismatisch, stehen in engem Kontakt zur Basalmembran und bilden an ihrer Oberfläche Mikrovilli aus, einen Bürstensaum, der die Oberfläche weiter vergrößert. Die Mikrovilli schließen längsverlaufende Aktinfilamente ein, die durch horizontale Quervernetzung mit Myosinfilamenten des Zytoskeletts in Verbindung treten. Die Enterozyten sind an der Hydrolyse und der Resorption der Spaltprodukte maßgeblich beteiligt. Die Becherzellen bilden zusammen mit den Enterozyten die epitheliale Deckschicht der Zottenoberfläche und der Krypten. Sie nehmen in ihrer Zahl vom Duodenum über das Jejunum bis zum Ileum zu. Becherzellen sind monozelluläre Drüsen, die einen glykoprotein- und glykolipidreichen Schleim synthetisieren, der zytoprotektiv und aufgrund des enthaltenen Lysozym auch bakterizid wirkt. Endokrine Zellen treten in den Drüsenschläuchen des vorderen Dünndarmes auf und synthetisieren Peptidhormone und Serotonin. Auch sie sind ein Teil des GEP. Die endokrinen Zellen liegen in der Wand der Krypten und enthalten bestimmte Inhaltsstoffe, wie Polypeptidhormone und biogene Amine, in ihren Sekretgranula. Alle endokrinen Zellen, die Aminosäuredekarboxylasen einschließen, werden als APUD-Zellen (Amine and Precursor Uptake Decarboxylation) zusammengefasst. Es sind eine Reihe hormonproduzierender Zellen in den Dünndarmdrüsen lokalisiert. Die D-Zellen bilden Somatostatin, die G-Zellen bilden Gastrin und die F-Zellen geben Polypeptide ab, die als vasoaktive intestinale Polypeptide (VIP) oder als Cholezystokinin-(CCK-) Pankreozymin auf die Leber wirken. S-Zellen stellen eine Sonderform dar, sie bilden Sekretin. Die Granula der Enterochromaffinen Zellen (EC-Zellen) enthalten Serotonin. Beim Pferd befinden sich weiterhin Paneth-Zellen am Grund der Dünndarmdrüsen. Sie geben exokrin ein seröses, glykoproteinreiches Sekret ab, das auch das bakterizide Lysozym enthält (Liebich, 1993).

Die Lamina propria mucosae besteht aus lockerem Bindegewebe und einigen von der Lamina muscularis mucosae abgespaltenen glatten Muskelzellen. In der Lamina propria mucosae liegen die Darmdrüsen, auch Krypten oder Lieberkühn'sche Drüsen genannt. Die Lamina propria mucosae schließt in hoher Dichte lymphoretikuläres Gewebe ein, das reich an T- und B-Lymphozyten, Plasmazellen, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, sowie neutrophilen und eosinophilen Granulozyten ist.

Die Tela submucosa bildet wie beim Magen eine Schicht lockeren, kollagenfaserreichen Gewebes. Neben Fettgewebe, Gefäßen und Nerven befinden sich auch Lymphfollikel, bzw. die Peyer'schen Platten in der Tela submucosa. Weiterhin befinden sich, vor allem im Duodenum, die Brunner-Drüsen (Glandulae submucosae) in der Tela submucosa. Die Peyer'schen Platten sind vermehrt in der Tela submucosa des Ileum eingelagert.

Die Tunica muscularis besteht wie beim Magen aus zirkulär und longitudinal verlaufenden Muskelbündeln, wobei diese Muskelschichten am Ileum des Pferdes auffallend verstärkt sind. Die Tunica serosa ist wie schon beim Magen beschrieben vorhanden (Liebich, 1993).

Abb. 3: Schematische Darstellung der jejunalen Darmschleimhaut modifiziert nach Liebich (1993).



1.3. Dickdarm

Der Dickdarm hat beim Pferd Besonderheiten aufzuweisen. Der Blinddarm und das mächtige große Kolon nehmen als am stärksten entwickelte Darmabschnitte eine beherrschende Stellung ein. Diese Darmabschnitte stellen beim Pferd umfangreiche „Gärkammern“ dar, welche für die Zelluloseverdauung unverzichtbar sind. Die Mündungsstelle des Ileums am

Blinddarmkopf (Basis caeci) wird als Ostium ileale bezeichnet. Der Blinddarm (Caecum) erreicht besondere Ausmaße, ist bis zu 1 Meter lang und hat ein Fassungsvermögen von durchschnittlich 33 Litern. Das Caecum wird unterteilt in Blinddarmkopf (Basis caeci), Blinddarmkörper (Corpus caeci) und Blinddarmspitze (Apex caeci). Anschließend folgt der Grimmdarm (Colon). Hier wird das große Kolon (Colon ascendens), das Querkolon (Colon transversum) und das kleine Kolon (Colon descendens) unterschieden. Das Colon ascendens beginnt am Ostium caecocolicum. Es hat eine Länge von 3-4 Metern und ein Fassungsvermögen von durchschnittlich 80 Litern. Wegen seiner Weite wird es auch als großes Kolon bezeichnet. Es beginnt mit der rechten ventralen Längslage (Colon ventrale dextrum) und geht in die ventrale Zwerchfellkrümmung (Flexura diaphragmatica ventralis) über, der sich, zur linken Körperseite laufend, die linke ventrale Längslage (Colon ventrale sinistrum) anschließt. Am Beckeneingang bildet es die Flexura pelvina und geht über in die linke dorsale Längslage (Colon dorsale sinistrum). Diese liegt der linken Bauchwand an und bildet am Zwerchfell die dorsale Zwerchfellkrümmung (Flexura diaphragmatica dorsalis), die dann in die rechte dorsale Längslage (Colon dorsale dextrum) übergeht. Dieses Colon dorsale dextrum besitzt eine erhebliche Weite und wird als „magenähnliche Erweiterung“ (Ampulla coli) bezeichnet. Es folgt das kurze und sehr enge Colon transversum als Verbindung vom Colon ascendens zum Colon descendens. Das kleine Kolon (Colon descendens) erreicht eine beträchtliche Länge von 2,5-4 Metern und ist im Vergleich zum Colon ascendens eng. Der Enddarm (Rektum) schließt sich an das kleine Kolon an. Er hat eine Länge von 0,2-0,3 Metern und erweitert sich flaschenförmig zur stark muskulösen und sehr geräumigen Mastdarmampulle (Ampulla recti), die dann in den Afterkanal übergeht (Nickel, 1995).

Insgesamt gesehen besitzt das Pferd einen sehr kleinen Magen, im Gegensatz zu seinem sehr umfangreichen Dün- und Dickdarm, welcher den größten Anteil des Bauchraumes in Anspruch nimmt. Beim Pferd beträgt die Darmlänge etwa das 10fache der Körperlänge.

An dieser Stelle soll noch einmal auf die baulichen und funktionellen Besonderheiten des Kolon eingegangen werden. Das Colon ascendens ist an seinem Anfang, der rechten ventralen Längslage, direkt im Anschluss an das Ostium caecocolicum sehr eng und stark muskulös, erweitert sich kurz und weist dann nochmals eine Engstelle auf (1. Engstelle), bevor sich dann der sehr weite Hauptteil dieser Lage anschließt. Die Weite beträgt hier 0,25-0,3 Meter im Durchmesser, die sich erst im Übergang von links ventral zu links dorsal an der Beckenflexur wieder auf 60-100 mm im Durchmesser verringert (2. Engstelle). Danach wird das Kolon wieder weiter, bis es in der rechten dorsalen Längslage seinen größten Durchmesser von 0,3-0,5 Metern erreicht und dann in das Querkolon übergeht, welches wieder sehr eng ist (3.

Engstelle). Diese drei Engstellen können durch Behinderung der Passage des Darminhaltes zu Verstopfungen bzw. zur Anschoppung von Darminhalt in den proximal dieser Stellen gelegenen Darmabschnitten führen (Verstopfungskolik) (Nickel, 1995).

Auch beim Dickdarm lassen sich von innen nach außen vier Hauptschichten unterscheiden: Die Schleimhaut, Tunica mucosa mit ihrer Tela submucosa, die Muskelhaut, Tunica muscularis und die Tunica serosa bzw. Tunica adventitia.

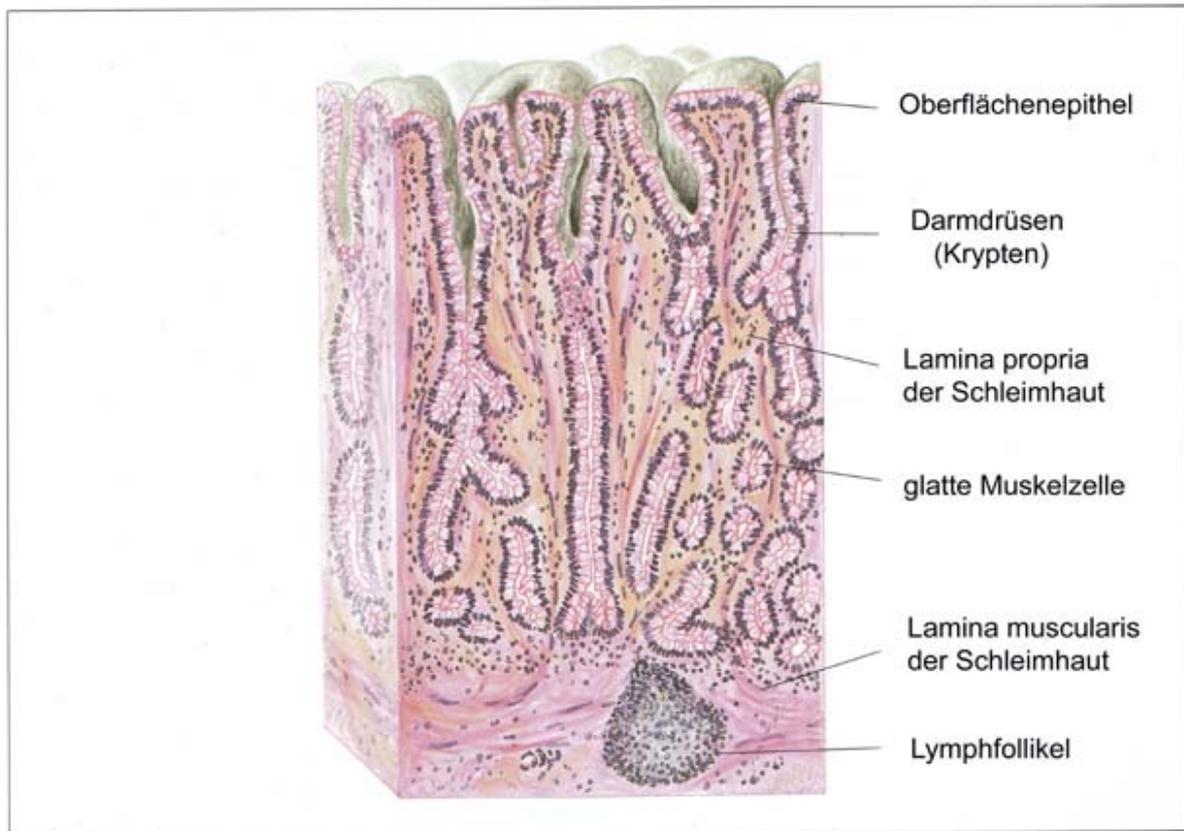
Die Tunica mucosa lässt sich wiederum von innen nach außen in drei Schichten unterteilen: die Lamina epithelialis mucosae, das Oberflächenepithel, dann die Lamina propria mucosae, eine lockere Bindegewebsschicht und schließlich die Lamina muscularis mucosae, eine Muskelgewebsschicht. Der unterschiedliche Bau der Schleimhaut ist ein sicheres Kriterium den Dünndarm vom Dickdarm zu unterscheiden. Die Schleimhaut des Dünndarmes trägt neben den vorhandenen Krypten auch Zotten, wohingegen diese an der Dickdarmschleimhaut fehlen, dort sind nur Krypten vorhanden.

Die Lamina epithelialis mucosae wird von einem einschichtig-hochprismatischen Epithel gebildet. Die Zellen sind auch hier Enterozyten, die ihre Oberfläche durch Mikrovilli vergrößern. Im Verlauf der Darmdrüsen (Krypten), die lumenwärts von einschichtig-hochprismatischen Enterozyten ausgekleidet sind, werden die Enterozyten nach distal durch Becherzellen ersetzt. Die Population der Becherzellen nimmt vom Caecum bis zum Colon descendens als vorherrschende Epithelzelle der Drüsenschläuche in ihrer Anzahl stetig zu. Die Lamina propria mucosae und die Lamina muscularis mucosae sind entsprechend genauso aufgebaut wie im Dünndarm. Gleiches gilt für die Tela submucosa, wobei die Einlagerung von Lymphfollikeln hauptsächlich im Caecum auffällt (Liebich, 1993).

Die Tunica muscularis weist beim Pferd eine besondere Schichtung auf. Die inneren, zirkulären Muskelfasern bilden eine geschlossene Schicht, wohingegen die äußeren Längsmuskellagen zu Bandstreifen (Taenien) bzw. zu dicken Muskelbündeln zusammengefasst sind.

Die Tunica serosa ist genauso aufgebaut wie beim Dünndarm und beim Magen (Liebich, 1993).

Abb. 4: Schematische Darstellung der Darmschleimhaut des Kolon modifiziert nach Liebich (1993).



2. Magen-Darm-Erkrankungen des Pferdes

Die Magen-Darm-Erkrankungen des Pferdes lassen sich nach ihrer Lokalisation, ihrer Ursache, der Dauer und dem Ausmaß der klinischen Erscheinung einteilen.

Beginnend am Magen kommt der Magenkatarrh, bzw. die Magenschleimhautentzündung (Akute oder Chronische Gastritis) und die Magenerweiterung als primäre (alimentäre) oder sekundäre Magenüberladung im akuten Geschehen (Rückstau bei Obstipationen oder Ileuszuständen), sowie als chronische Magendilatation, in deren Folge es zur Magenruptur kommen kann, vor (Dietz & Huskamp, 1999).

Weiterhin treten bei Sport- und Rennpferden (van den Wollenberg et al., 2000) und bei Fohlen relativ häufig Magenulzera auf (Murray, 1989; Murray et al., 1990). Zu 10 bis 50% treten die Magenulzera, auch ulzerative Gastropathie genannt, bei Fohlen unter einem Jahr auf (Murray et al., 1990). Die Läsionen sind hierbei vorwiegend auf die Pars nonglandularis, und zwar am Übergang der drüsenlosen kutanen Schleimhaut zur Pars glandularis, also in der Gegend des Margo plicatus, konzentriert (Murray, 1989; Murray et al., 1989; Murray et al.,

1990). Auch am Pylorus und proximalen Duodenum können sich Ulzera befinden. Dies wird auch als Komplex der ulzerativen Magen- und Darmentzündungen bezeichnet. Auslöser dieser Läsionen sind beim adulten Pferd Stress, der aus den Haltungs- und Trainingsbedingungen entsteht, oder die Gabe nichtsteroidaler Antiphlogistika (NSAIDs), wie Phenylbutazon, Flunixin Meglumin oder Ketoprofen (MacAllister et al., 1993). Beim Fohlen werden die Ulzera ebenfalls durch Stress ausgelöst (Furr et al., 1992), häufig in Verbindung mit anderen Erkrankungen, die den Fohlen Schmerzen bereiten, oder ebenfalls durch die Gabe von NSAIDs. Auch die duodenalen Ulzera entstehen bei Fohlen häufig in Zusammenhang mit Stresssituationen oder der Gabe von NSAIDs (Acland et al., 1983). Eine Beteiligung von Parasiten, Fremdkörpern und Missbildungen wird vermutet. Auch eine Infektion mit *Helicobacter* (*Helicobacter pylori*) oder *Campylobacter* wird als weiterer Faktor diskutiert. Die klinischen Anzeichen variieren von akuter und rezidivierender Kolik, vermindertem Appetit über schlechte körperliche Verfassung mit Gewichtsverlust bis zu chronischer Diarrhoe (Murray et al., 1989; Murray et al., 1990; van den Wollenberg et al., 2000). Sowohl Magen- als auch Darm-Ulzera stehen in Zusammenhang mit dem Auftreten von veränderten Apoptose-Raten an den ulzerierten Stellen (siehe Kapitel II., Punkt 5.5.)

Dagegen kommen Magentumoren nur bei erwachsenen Pferden vor und sind eher selten. Es handelt sich dabei meist um ein Plattenepithelkarzinom, das am Margo plicatus, Fundus oder aber auch im Bereich der Kardia lokalisiert ist (Dietz & Huskamp, 1999).

Beim Darm treten katarrhalische und entzündliche Erkrankungen im Allgemeinen mit vielfältigen Erscheinungsbildern auf. Dazu gehört auch die Gastroduodenojejunitis, eine massive Entzündung der Magen- und proximalen Darmschleimhaut, bei der ein funktioneller Ileus (Darmverschluss) infolge der Paralyse des magennahen Dünndarmes vorliegt und es zu einer sekundären Magenüberladung kommt (Dietz & Huskamp, 1999). Weiterhin kommt die Typhlokolitis, auch Colitis X genannt, vor, die eine besonders schwere Form der katarrhalisch-hämorrhagischen Entzündung des Caecum und des Colon ascendens darstellt. Bereits 1963 beschrieb Rooney diese Colitis X. Seit Mitte der 80er Jahre wird das Colitis-X-Syndrom im deutschsprachigen Raum immer häufiger beobachtet und als Equine idiopathische Typhlokolitis bezeichnet. Die Erkrankung zeigt einen akuten Verlauf und es sind vornehmlich Clostridien und deren Toxine am Geschehen beteiligt. Dabei handelt es sich um *Clostridium perfringens* (Herholz et al., 1999; Weese et al., 2001) und *Clostridium difficile* (Weese et al., 2001). Häufig wurden die Tiere mit Antibiotika oder NSAIDs vorbehandelt, bevor dann plötzlich schwere Koliksymptomatik und profuse Diarrhoe einsetzen (Schiefer, 1981; Whitlock, 1986). Es ist bekannt, dass Antibiotikagaben bei Pferden

zu Veränderungen ihrer normalen Darmflora und zu unterschiedlich ausgeprägter Diarrhoe führen können (Wilson et al., 1996). In schweren Fällen kann es dann zu einer Colitis X kommen. Die Gabe von NSAIDs kann zu einer Entzündung mit Erosionen des Dün- und Dickdarmes führen (Meschter et al., 1990), die sich klinisch ebenfalls in einer Colitis X zeigen kann. Das Auftreten dieser Diarrhoe steht in Zusammenhang mit veränderten Apoptose-Raten bei den Zellen des Oberflächenepithels (siehe Kapitel II., Punkt 5.8.).

Eine der häufigsten „Kolikerkrankungen“ ist die „Spastische Kolik“. Hierbei handelt es sich um eine funktionelle Darmstörung, die nur selten mit einer histologisch nachweisbaren Schleimhautveränderung einhergeht (Dietz & Huskamp, 1999).

Weiterhin ist der Meteorismus zu nennen, der auch „Gaskolik“ genannt wird. Da es sich hierbei um eine Aufblähung von Magen, Dün- und Dickdarm infolge übermäßiger Gasentwicklung handelt, kommt es zu einer Überdehnung des Darmrohres und im Spätstadium zur Paralyse des Darmes bis hin zu Darmrupturen. Es wird zwischen dem primären Meteorismus, der alimentär bedingt ist, und dem sekundären Meteorismus, der sich bei allen Ileuszuständen im prästenotischen Darmteil sowie beim paralytischen Ileus entwickelt, unterschieden (Dietz & Huskamp, 1999).

Das Gebiet der Obstipationen ist ein weites Feld. Im Allgemeinen wird darunter eine unphysiologische Ansammlung von eingetrocknetem Darminhalt und/oder Sand, der das Darmlumen vorübergehend oder andauernd verschließt und eine Dilatation des Darmrohres bewirkt, verstanden. Die Obstipationen werden in Dün- und Dickdarmobstipationen eingeteilt. Häufig entstehen Obstipationen an disponierten Stellen, die als anatomisch-physiologische (siehe Punkt 1.3.) oder als pathologische Darmeinengungen vorgegeben sind. Primäre Obstipationen sind alimentär oder neurogen bedingt, sekundäre Obstipationen entstehen vor Stenosen oder infolge mechanischer Hindernisse. Als pathologische Darmeinengungen können im Dünndarmbereich Strikturen, Adhäsionen und Tumoren auftreten. Diesen Stenosen folgt eine prästenotische Arbeitshypertrophie und später dann eine Dilatation. Dünndarmobstipationen gehen vornehmlich vom Ileum oder seltener vom Jejunum aus und sind wiederum primärer oder sekundärer Natur, wobei die sekundären Obstipationen immer mit histologischen Veränderungen einhergehen. Die Dünndarmobstipationen kommen in allen Altersklassen vor. Eine Sonderform der Dünndarmobstipation stellt die Verstopfung durch Spulwürmer (*Parascaris equorum*) beim Fohlen dar. Bei massivem Befall der Fohlen mit Spulwürmern kann es nach Gabe von Wurmkuren zur Bildung von „Wurmknäuel“ aus abgestorbenen Würmern und dadurch zu Obstipationen des Dünndarmes kommen (Dietz & Huskamp, 1999).

Die Dickdarmobstipationen lassen sich ihrer Lokalisation nach in Blinddarmobstipationen, Obstipationen des großen Kolons und Obstipationen des kleinen Kolons unterteilen.

Bei der Blinddarmobstipation unterscheidet man zwischen einer akuten und einer chronisch-rezidivierenden Form, wobei die chronisch-rezidivierende Form lange unauffällig sein kann. Die funktionelle Stenose des Ostium caecocolicum führt zu einer Hypertrophie der Blinddarmwandmuskulatur gefolgt von chronisch-rezidivierender Blinddarmobstipation. Die Erkrankung zeigt sich vor allem durch rezidivierende oder chronische Diarrhoe und kommt bei erwachsenen Pferden verschiedenen Alters vor (Dietz & Huskamp, 1999).

Akute Krankheitsbilder infolge von Stenosen erscheinen im Bereich der rechten dorsalen Kolonlage am Übergang zum Colon transversum und im kleinen Kolon am Übergang zum Rektum. Obstipationen des großen Kolons kommen bei Saugfohlen nur ausnahmsweise, sonst bei allen Altersklassen vor.

Weiterhin können Ödeme (entzündlicher oder anderer Ursache) und Hämatome das Lumen einengen und somit zu Stenosen bzw. zu Obstipationen führen (Dietz & Huskamp, 1999).

Auch innere Hernien können Auslöser von Darmproblemen sein. Innere Hernien (Herniae intraabdominales) sind äußerlich nicht sichtbar, da sich Bruchpforte und Bruchinhalt und – wenn vorhanden – der Bruchsack in der Bauch- oder Brusthöhle befinden. Am häufigsten werden Dünndarmteile eingeklemmt (Vachon & Fischer, 1995), aber auch Dickdarminkarzerationen sind nicht selten. Die Bruchpforten der inneren Hernien können angeboren oder erworben sein. Hernien treten vornehmlich bei erwachsenen Pferden auf. Zwei häufig vorkommende und typische Darmeinklemmungen unter den inneren Hernien sind die Dünndarminkarzeration in das Foramen omentale (Foramen epiploicum) (Vachon & Fischer, 1995) und die Einklemmung des Colon ascendens in den Milz-Nieren-Raum (Spatium renolienale). Die erworbenen Lücken gehen auf innere Verletzungen zurück, die durch physiologische Invaginationen in Verbindung mit Hyperperistaltik entstehen können. Klinisch manifestieren sich solche Läsionen erst dann, wenn der Darm inkarzeriert wird und es zum Ileus kommt (Dietz & Huskamp, 1999). Die Inkarzerationen oder Strangulationen führen zu mehr oder weniger starken Durchblutungsstörungen des betroffenen Darmteiles und häufig kommt es im weiteren Verlauf zur hämorrhagischen Infarzierung durch die Unterbrechung des venösen Blutflusses. Länger andauernde Inkarzerationen können schließlich zum Absterben des betroffenen Darmabschnittes führen. Komplikationen nach der operativen Behandlung solcher Inkarzerationen sind nach Überstehen der Anästhesie ein postoperativer paralytischer Ileus, Adhäsionen zwischen den Darmteilen, Magenulzera, Lebererkrankungen und Diarrhoe (Vachon & Fischer, 1995).

Darmverlagerungen und/oder Verdrehungen führen meist zu sehr heftigen „Kolik“en. Auch hier können verschiedene Abschnitte des Darmes (Dünn- und Dickdarm) betroffen sein (Dietz & Huskamp, 1999). Durch die Verlagerung der verschiedenen Darmanteile stranguliert sich der Darm selbst und oft kommt es dabei zu einer Verdrehung oder zumindest Abknickung oder Quetschung des Gekröses und somit zu einer mehr oder weniger starken Unterbrechung des venösen Blutflusses mit hämorrhagischer Infarzierung der betroffenen Darmteile. Auch hier kann es bei Fortschreiten der Erkrankung zum Absterben dieser Darmteile kommen.

Die Hauptproblematik der durch Hernien und Darmverlagerungen inkarzierten Darmanteile stellt deren gestörte Durchblutung dar. Die hämorrhagische Infarzierung führt letztendlich zur Sauerstoffverarmung des Gewebes ebenso wie eine Ischämie und steht damit mit der Apoptose der Enterozyten in Zusammenhang (siehe Kapitel II., Punkt 5.3.). Bei einer Kolik-Operation werden diese inkarzierten und/oder schon abgestorbenen Darmanteile entfernt. Eine Resektion von Darmanteilen hat wiederum Effekte auf die Zellen des verbleibenden Darmes (siehe Kapitel II., Punkt 5.12.).

Darminvaginationen allgemein (Invaginatio intestini) sind Lageveränderungen einer Darmschlinge in Richtung ihrer Längsachse, bei der sich ein Teil des Darmrohres umstülpt und in Richtung der Peristaltik nach kaudal weiterbewegt. Dadurch werden drei Darmrohre teleskopartig zusammengeschoben, wobei zwischen dem mittleren und inneren Darmrohr das miteingestülpte Gekröse liegt und es zu Durchblutungsstörungen kommt. Die Erkrankung ist relativ selten, sie tritt eher bei Fohlen auf. Sie ist häufig Folge übermäßiger Darmperistaltik und daher nicht selten begleitende Problematik bei Erkrankungen, die mit Diarrhoe einhergehen.

Eine „Thrombotisch-embolische Kolik“ entsteht als Folge akuter Mangeldurchblutung einzelner oder mehrerer Darmabschnitte durch Verschluss der Darmarterien, ausnahmsweise auch der Darmvenen. Es kommt dadurch zur Ischämie des betroffenen Darmabschnittes und dies steht mit der Apoptose von Enterozyten in Zusammenhang (siehe Kapitel II., Punkt 5.3.). Der Verschluss von Darmgefäßen ist als Folge von Parasitenbefall zu sehen (Larven des *Strongylus vulgaris*). Dennoch tritt die „Thrombotisch-embolische Kolik“ nicht sehr häufig auf (Dietz & Huskamp, 1999).

Beim Fohlen gibt es noch andere Erkrankungen, die explizit in den ersten postnatalen Tagen vorkommen. Auch hier tritt das Symptom „Kolik“ auf und wird als „Akutes Abdomen“ beim Neugeborenen oder einige Tage alten Fohlen bezeichnet. Es kommen eine Reihe von Ursachen in Betracht, die z.T. besonders mit dem Alter des Patienten in Zusammenhang

stehen. Diese haben je nach Lebensalter eine unterschiedliche Bedeutung, so dass zwischen Fohlen mit „Akutem Abdomen“ unter 24 Stunden und über 24 Stunden differenziert werden muss. Bei unter 24 Stunden alten Fohlen (1. Adaptationsperiode bedeutet 1 bis 24 Stunden) kommen Mekoniumverhaltung, Atresia ani, Atresia coli, Agangliose des Ileum und Kolon, Leberruptur und Milzruptur in Frage. Bei Fohlen, die zwischen 2 und 5 Tagen alt sind (= Anfang der 2. Adaptationsperiode; 2. Adaptationsperiode bedeutet 2 bis 14 Tage), muss zwischen Uroperitonäum, Mekoniumverhaltung, Magenulcus, Darminvagination, Volvulus, Gastroenteritis, Sepsis, Peritonitis, Nabelentzündung, Leberentzündung, Lebernekrose (Tyzzer Disease) und Nierenmissbildung unterschieden werden (Robinson & Furr, 1997; Dietz & Huskamp, 1999).

Die Mekoniumverhaltung betrifft in erster Linie männliche Fohlen, aber auch unreif geborene Tiere oder Neugeborene nach schwerer prä- bzw. intrapartaler Störung. Mekonium sammelt sich im Verlauf der fetalen Entwicklungsperiode im Enddarm an. Der Mekoniumabsatz hängt offenbar von zwei Faktoren ab: Zum einen ist es der postnatale Beginn einer geregelten Darmtätigkeit, zum anderen hat die Aufnahme kolostraler Milch eine Bedeutung, da in ihr darmmotilitätsanregende Stoffe enthalten sind. Physiologischerweise sollte das Mekonium bis 6 Stunden nach der Geburt abgegangen sein (Dietz & Huskamp, 1999).

Einen weiteren großen Erkrankungskomplex bei Fohlen stellt die Neonatale Diarrhoe dar. Es ist eine der häufigsten Erkrankungen bei Fohlen bis zur Vollendung der 2. Adaptationsperiode. Bis zu 80% aller Fohlen erkranken bis zur Vollendung des 1. Lebenshalbjahres an einer Diarrhoe (Traub-Dargatz et al., 1988). Dabei wird zwischen einer Diarrhoe aufgrund einer viralen und/oder einer bakteriellen Infektion, Diarrhoe aufgrund einer parasitären Invasion, Diarrhoe aufgrund diätetischer Fehler und Diarrhoe aufgrund von Veränderungen in der Resorptions- und Digestionsfunktion der Darmschleimhaut ohne Beteiligung von Mikroorganismen unterschieden. Die begleitende klinische Symptomatik kann von leicht bis schwer und sogar tödlich endend variieren (Robinson & Cohen, 1997; Dietz & Huskamp, 1999).

Zu den auslösenden Erregern für eine Diarrhoe gehören bei der viralen Gruppe Rotaviren (Otha et al., 1990; Legrottalgie & Agrimi, 1992; Netherwood et al., 1996; Robinson & Cohen, 1997), Coronaviren (Davis et al., 2000; Guy et al., 2000), Adenoviren (Robinson & Cohen, 1997), Arteritisviren und virusähnliche Partikel. Bei den Bakterien sind es *Escherichia coli* (vor allem *E. coli* variatio haemolytica) (Holland et al., 1996; Robinson & Cohen, 1997), Klebsiellen, *Rhodococcus equi* (Robinson & Cohen, 1997), Salmonellen (Smith, 1981; Robinson & Cohen, 1997), Clostridien (*Clostridium perfringens* und *Clostridium difficile*)

(Jones, 2000; Netherwood et al., 1998; East et al., 1998; Netherwood et al., 1996; Robinson & Cohen, 1997), *Campylobacter* (Robinson & Cohen, 1997) und selten auch *Lawsonia intracellularis* (Lavoie et al., 2000). Als parasitäre Erreger kommen *Cryptosporidien* (Robinson & Cohen, 1997), *Strongyloides westeri* (Netherwood et al., 1996), *Parascaris equorum* und *Strongylus vulgaris* in Frage.

Aber auch Diarrhoen ohne Beteiligung von Erregern entstehen bei Fohlen nicht selten. Ursache hierfür sind übermäßige Wasseraufnahme (durch Spieltrieb), alimentäre Ursachen wie zu hoher Fett- und Lactosegehalt in der Stutenmilch und eine übermäßige Laktationsleistung. Ungünstige thermische Verhältnisse (in den Stallungen) können ebenfalls zu Darmschleimhautreizungen führen. Darüber hinaus können auch Dysbiosen der Darmflora oder Dyspepsien einen profusen Durchfall auslösen, besonders bei raschem Futterwechsel (Dietz & Huskamp, 1999).

Im Verlauf einer Diarrhoe kann es durch die begleitende oft stark vermehrte Peristaltik zu Darminvaginationen (siehe oben) kommen, die das Krankheitsgeschehen verschlechtern.

Weiterhin gibt es eine Diarrhoe im Zusammenhang mit einer Colitis ulcerosa, deren Ursache noch nicht vollständig geklärt ist. Verdachtsweise kommen autoimmune Prozesse in Betracht. Bei älteren Fohlen kommt auch eine regionale Enteritis vor, die ebenfalls immunopathogenetische Ursachen haben soll, eventuell auf Grundlage bakterieller Lipopolysaccharide. Dabei entstehen eine granulomatöse Entzündung der Darmwand und ein obstruktives Lymphödem, in deren Folge es zu einer Obstruktion des Darmabschnittes (Ileitis terminalis, u.U. auch in Kombination mit dem Kolon) kommt (Dietz & Huskamp, 1999).

Die wichtigste und am häufigsten vorkommende, nicht infektiös bedingte Diarrhoe stellt der Durchfall während der Zeit der ersten Rosse der Stute post partum dar. Die als sogenannte „Fohlenrosse-Diarrhoe“ bezeichnete Erscheinung wurde und wird vielfältig diskutiert.

Die „Fohlenrosse-Diarrhoe“ tritt zwischen dem 8. und 12. Tag post natum auf und dauert in der Regel nur einige Tage (Gianini et al., 2000). Meist ist das Allgemeinbefinden wenig gestört und nur bei längerem Diarrhoe geschehen zeigen sich klinische Probleme (Dietz & Huskamp, 1999).

Folgende Zusammenhänge werden damit in Verbindung gebracht: Änderungen in der fermentativen Aufbereitung der Milch im Gastrointestinaltrakt, physiologische Änderungen des immaturren Neugeborenenendarmes als Vorbereitung für die Festfutteraufnahme, Änderung der Ernährungsgewohnheiten (von reiner Milchnahrung Übergang zur Festfutteraufnahme) (Robinson & Cohen, 1997; Dietz & Huskamp, 1999). Dagegen sind Änderungen der Zusammensetzung der Milch und die Ausscheidung von rossebegleitenden oder -bedingten

Hormonen über die Milch nicht maßgebend an der Entwicklung einer Diarrhoe bei Fohlen beteiligt (Robinson & Cohen, 1997). Gianini et al. (2000) haben nachgewiesen, dass die „Fohlenrosse-Diarrhoe“ in keinem Zusammenhang mit der Anwesenheit viraler, bakterieller oder parasitärer Pathogene steht. Weiterhin traten bei den Fohlen keine Änderungen in der Laktoseverdauung und in der Gasproduktion des Darmes auf, d.h. es konnten keine Änderungen in der Funktion des Dün- oder Dickdarmes festgestellt werden (Gianini et al., 2000). Gianini et al. (2000) stellten jedoch fest, dass die Aldosteron-Konzentrationen bei Fohlen höher sind als bei adulten Pferden. Es gab auch eine Tendenz zum Anstieg der Aldosteron-Konzentrationen während der „Fohlenrosse-Diarrhoe“.

Die Zusammensetzung des Kotes lässt auf eine Diarrhoe vom sekretorischen Typ schließen (Masri et al., 1986; Robinson & Cohen, 1997). Die Diarrhoe ist also wahrscheinlich durch Hypersekretion der Dünndarmschleimhaut ausgelöst, welche das immature Kolon überlastet, das unfähig ist, diese ansteigende Flüssigkeitsmenge zu kompensieren und die Elektrolyte zu absorbieren (Masri et al., 1986). Schon 1986 vermuteten Masri et al., dass die „Fohlenrosse-Diarrhoe“ durch entwicklungsbedingte Änderungen des Magen-Darm-Traktes hervorgerufen wird.

Missbildungen im Darmbereich können zwei Abschnitte betreffen: den After und das Rektum (Atresia ani, Atresia recti), sowie den Bereich des Kolons (Atresia coli). Die Atresien kommen relativ selten vor. Bei der Atresia ani fehlt die Anusöffnung. Bei der Atresia ani et recti fehlen sowohl Anus als auch das Rektum. Bei der Atresia coli ist ein Teil des Kolons nicht entwickelt und endet sackartig. Von diesem blind endenden Darmteil lässt sich ein bindegewebiger Strang verfolgen, der dann zum normal entwickelten Endstück des Darmes führt. Auch der Anus ist ausgebildet und zeigt keine Anomalie. Als Ursache der Atresien werden genetische Faktoren angenommen und es sind z.T. rezessive Erbgänge bei bestimmten Rassen nachgewiesen (Dietz & Huskamp, 1999).

3. Apoptose

3.1. Definition und Vorkommen

Zellen in lebenden Organismen wie auch Zellen in Kultur unterliegen einem kontrollierten und genetisch determinierten Prozess, der zu ihrem Absterben führt. Dieser programmierte Zelltod (Apoptose) betrifft entweder gealterte Einzelzellen, die durch neue Zellen ersetzt werden (Regeneration) oder solche Zellen, die vom Körper als schädlich erkannt werden, z.B. Abwehrzellen, die sich gegen körpereigene Zellen richten oder schließlich solche Zellen, die im Gesamtgefüge funktionslos werden, z.B. Nervenzellen ohne Muskelkontakt. Es handelt sich hierbei um einen von der Zelle selbst ausgelösten aktiven Zelltod. Dieser physiologisch bedeutsame Prozess wurde erstmalig 1885 von Flemming an Säugetierfollikeln beobachtet. 1971 konnten Kerr et al. mit ihren Experimenten an Rattenlebern das Verschwinden von Zellen beweisen, einen Vorgang, der als Apoptose bezeichnet wurde (Kerr et al., 1972). Das Wort Apoptose setzt sich aus den griechischen Worten *apo*, das soviel wie ab oder los heißt und *ptosis*, das übersetzt Senkung heißt, zusammen. Dies soll ein Abfallen von welken Blättern symbolisieren (Duke et al., 1997). Der programmierte Zelltod ist für die Entwicklung und Homöostase höherer Organismen von zentraler Bedeutung. Physiologisch fungiert die Apoptose als Gegenspieler der Proliferation und spielt schon während der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle. Beispielsweise führt die Apoptose zur Einschmelzung der Schwimmhäute zwischen den Fingern des menschlichen Embryos und auch an den Gliedmaßenknospen von Hühnerembryonen (Hurle et al., 1995; Hurle et al., 1996), wie auch des Schwanzes der Kaulquappen während der Metamorphose zum Frosch (Duke et al., 1997).

Die Apoptose gehört zu den physiologischen Vorgängen bei der Differenzierung von Geweben und zu den Schutzmechanismen, mit denen stark geschädigte Zellen aus dem Gewebe entfernt werden. Sie dient dadurch der Resorption nicht mehr benötigter Zellen. Die Bruchstücke apoptotischer Zellen werden dann von Zellen des Immunsystems aufgenommen und abgebaut, sodass Schädigungen für den Organismus vermieden werden.

Aber auch bei verschiedenen pathologischen Zuständen ist die Apoptose von herausragender Bedeutung. Dazu zählen unter anderem Karzinome, AIDS, kardiovaskuläre Erkrankungen oder bestimmte entzündliche Veränderungen des Darmes wie z.B. Morbus Crohn (siehe Kapitel II., Punkt 5.5.).

Unter physiologischen Bedingungen ist das mikroskopisch-morphologisch nachweisbare Auftreten von Apoptose selbst in Gewebe mit hohem Zellumsatz, wie dem Darm, allerdings ein seltenes Ereignis. Folglich ist zu jedem beliebigen Zeitpunkt nur eine kleine Anzahl apoptotischer Zellen zu finden (Saraste & Pulkki, 2000).

3.2. Ablauf und Morphologie

Die Apoptose ist mit morphologischen und biochemischen Veränderungen verbunden und ist die Form des Zelltodes bei verschiedenen physiologischen Vorgängen (siehe Kapitel II., Punkt 3.1.). Die ausgeglichene Balance zwischen intra- und/oder extrazellulären Signalen kann den Ausschlag geben, ob eine Zelle überlebt oder entfernt wird (Kidd, 1998). Apoptose kann durch verschiedene „Tod-auslösende“ Stimuli, wie z.B. den Verlust von Wachstumsfaktoren oder generell von überlebenswichtigen Faktoren, Sauerstoffdefizit (Ischämie/oxidativer Stress), metabolische Defekte, physikalische (Gamma-Strahlung) und chemische Schädigungen und/oder das Anlagern bestimmter Liganden an Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche auftreten (Buttke & Sandstrom, 1994; Buttke & Sandstrom, 1995; Nagata & Golstein, 1995). Sie ist vom nekrotischen Zelltod (Nekrose), der durch unphysiologische Bedingungen, u.a. pH-Wert-Veränderungen und Nährstoffmangel hervorgerufen wird und dem die Onkose vorausgeht, zu unterscheiden (Wyllie, 1981; Majno & Joris, 1995; Van Cruchten & Van den Broeck, 2002).

Der Verlauf der Apoptose ist energieabhängig und wird in drei Phasen unterteilt. Die Einleitungsphase, auch signalgebende Phase genannt, die Ausführungsphase, auch Effektorphase oder Exekutionsphase genannt und die Degradationsphase (Saraste & Pulkki, 2000).

3.2.1. Die Einleitungsphase der Apoptose

In der Einleitungsphase lösen pro-apoptotische Stimuli die Aktivierung der molekularen Apoptose-Kaskade aus. Das asynchrone Erscheinungsbild des apoptotischen Todes in Zellpopulationen ist hauptsächlich in der höchst variablen Dauer der Einleitungsphase begründet (Saraste & Pulkki, 2000). Lichtmikroskopische Studien von Zellen *in vitro* zeigen, dass die morphologischen Veränderungen immer in weniger als 2 Stunden ablaufen (Messam & Pittman, 1998). *In vivo* dauert der apoptotische Zelltod schätzungsweise zwischen 1 und 24

Stunden, wobei die Zeit in Abhängigkeit vom Zelltyp variiert. Häufig ist die Apoptose jedoch innerhalb von 1 bis 3 Stunden abgelaufen (Kerr et al., 1987; Gavrieli et al., 1992). Aufgrund der kurzen Zeitdauer der Apoptose, sind jeweils nur wenige apoptotische Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt vorhanden, sodass die quantitative Bedeutung der Apoptose leicht unterschätzt werden kann (Saraste & Pulkki, 2000).

In der Einleitungsphase kann die Apoptose-Kaskade auf zellulärer Ebene durch zwei verschiedene Mechanismen ausgelöst werden: Durch die in der Zellmembran vorhandenen Todes-Rezeptoren und durch die Aktivierung des mitochondrialen Pfades. Der erste Mechanismus erfolgt über membran-gebundene Todes-Rezeptoren, die direkt die Kaspase-8 und/oder die Kaspase-10 aktivieren (Kidd, 1998). Der zweite Mechanismus führt über einen komplizierten mitochondrialen Weg zur typischen Spaltung der DNA (Kroemer et al., 1998). Sowohl die Bindung bestimmter Liganden an die Todesrezeptoren als auch die Cytochrom C-Abgabe aus den Mitochondrien können die Kaspasen-Kaskade auslösen und somit die Ausführungsphase einleiten (Melino & Piacentini, 1998; Saraste & Pulkki, 2000; Gavriescu & Denkers, 2003).

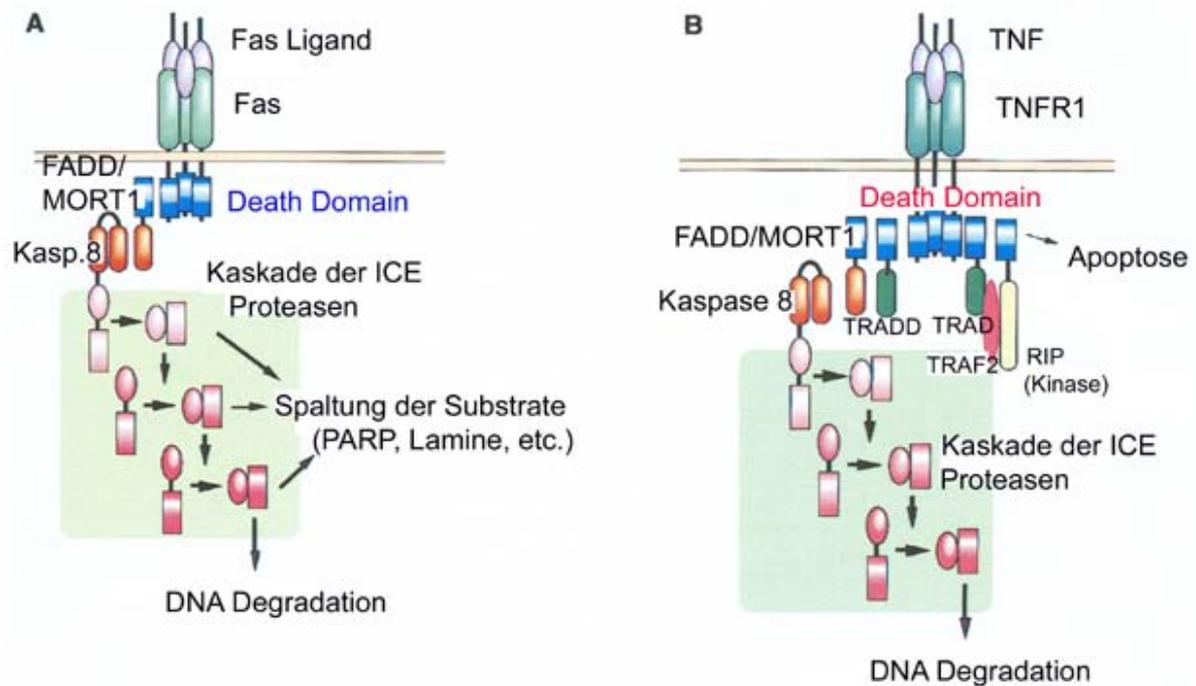
Der rezeptorvermittelte Weg wird durch die Anlagerung von dem Fas-Liganden oder dem Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-alpha) an die entsprechenden transmembranösen Fas-(CD95) oder TNF-Rezeptorproteine eingeleitet (Kliche et al., 1999). Die Todesrezeptoren sind als eine Untergruppe der TNF-Rezeptor Superfamilie, die die Apoptose einleiten, identifiziert worden. Insgesamt sind mittlerweile 5 verschiedene Todesrezeptoren bekannt. Das sind der Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1 (TNF-R1), der CD95 (Fas/Apo-1), das TNF-receptor-related apoptosis-mediated protein (TRAMP) und der „TNF-related apoptosis-inducing ligand Rezeptor-1 und-2“ (TRAIL-R1 und-2) (Schulze-Osthoff et al., 1998).

Die Anlagerung des Liganden bewirkt eine Trimerisation des Rezeptors mit nachfolgender Rekrutierung des „Fas-associated death domain“ (FADD) Proteins. Anschließend trimerisiert der Komplex mit der Prodomäne der Prokaspase-8, wobei die aktivierte Kaspase-8 entsteht. Im Falle einer Aktivierung des TNF-Rezeptors weicht der Weg etwas ab, da dieser Rezeptor FADD nicht direkt sondern nur über ein als „TNF-receptor-associated death domain“ (TRADD) bezeichnetes Verbindungsprotein binden kann. Die dementsprechend aktivierte Kaspase-8 gehört zu den Exekutoren der Apoptose (siehe Ausführungsphase Kapitel II., Punkt 3.2.2.).

Die „Todesrezeptoren“ wie z.B. der Fas-Rezeptor bilden mit ihren Domänen, den angelagerten Proteinen wie z.B. FADD und der nachfolgend angeknüpften Prokaspase-8 zusammen den „death-induced signaling complex“ (DISC) (Muzio et al., 1996). Auch die

Kaspase-10 kann als Initiator-Kaspase dienen (Miller, 1997), denn die Effektor-Todes-Domäne („death effektor domain“ (DED)) kommt bei beiden, Kaspase-8 und -10, vor (Earnshaw et al., 1999).

Abb. 5: Schematische Darstellung der Rezeptoren modifiziert nach Nagata (1997).



3.2.2. Die Ausführungsphase der Apoptose

In der Ausführungsphase der Apoptose wird die auf molekularer Ebene befindliche Apoptose-Kaskade vollständig aktiviert. Daher verursachen Zytosolextrakte von Zellen, die sich in der apoptotischen Initialphase befinden apoptotische Veränderungen bei isolierten Zellkernen (Lazebnik et al., 1993; Solary et al., 1993). Die aktivierte Apoptose-Kaskade greift dabei an vielen zellulären Zielpunkten an. Die Kaspasen sind letztendlich die Exekutoren der Apoptose, die während der Apoptose in fast allen Zelltypen sukzessive aktiviert werden (Kidd, 1998) als sogenannte Kaspasen-Kaskade. In den letzten Jahren wurden 10 Cysteinproteasen (Kaspasen) in Anlehnung an die Interleukin-1 β -converting Enzyme (ICE) als essentielle Komponenten vieler apoptotischer signalgebender Mechanismen identifiziert (Martins & Earnshaw, 1997; Kidd, 1998). Deren Namen setzt sich aus ihrem zentral gelegenen Cysteinmolekül und der Aspartat-spezifischen Substratspaltung zusammen: „cytosolic-aspartat-specific-cystein-protease“ = Caspase (Kliche et al., 1999).

Die Kaspasen liegen im Zytosol immer als Prokaspasen vor, die bei der Aktivierung in eine 20 kDa und eine 10 kDa Untereinheit gespalten werden. Erst nachdem die beiden zusammengelagerten Fragmente ein Heterotetramer gebildet haben, ist das Enzym voll funktionsfähig (Kidd, 1998; Miller, 1997). Bei Säugern, einschließlich des Menschen, sind in Anlehnung an CED-3, der Kaspase des *C. elegans*, mittlerweile 12 Kaspasen bekannt. Dies sind die Kaspase-1 (ICE), Kaspase-2 (ICE1), Kaspase-3 (CPP32), Kaspase-4 (ICE2/ICH2), Kaspase-5 (ICE3), Kaspase-6 (MCH2), Kaspase-7 (MCH3), Kaspase-8 (FLICE/MACH), Kaspase-9 (ICELAP6), Kaspase-10 (MCH4), mICH3 und mICH4 (Miller, 1997). Die Kaspasen spalten ihre Substrate in einer Aspartat spezifischen Art und Weise. Bisher sind relativ wenige dieser Substrate identifiziert. Diese kann man in drei Kategorien einteilen, erstens andere Kaspasen (Kaspase-Proteasen), zweitens zelluläre Proteine, die inaktiviert werden müssen, um den Tod der Zelle zu bewirken, und drittens zelluläre Proteine, deren Aktivierung für die Ausführung des Zelltodes benötigt werden (Kidd, 1998). Beispiele für die Proteine der ersten Gruppe schließen viele der Pro-Enzymformen der Kaspasen mit ein (Kidd, 1998), das sind die Prokaspase-1, Prokaspase-3, Prokaspase-8 und Prokaspase-10 (Muzio et al., 1996; Srinivasula et al., 1996; Miller, 1997). Diese Proteasen, die in der Zelle als Pro-Enzyme hergestellt werden, werden durch proteolytische Spaltung während der Apoptose aktiviert (Kidd, 1998). Erst die aktivierten Kaspasen degradieren dann ihrerseits wieder andere Proteine (Casiano et al., 1996). Diese Proteine stellen die zweite Gruppe der Kaspasen-Substrate dar. Es handelt sich um Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP), Aktin, die Lamine und DNA-Topoisomerase 1 und 2 (Lazebnik et al., 1994; Casiano et al., 1996; Takahashi et al., 1996; Kidd, 1998). Die Spaltung dieser Proteine durch Kaspasen resultiert in ihrer funktionellen Inaktivierung, was für das Fortschreiten des Zelltodes von Bedeutung ist (Kidd, 1998). Schlussendlich sind Aktin und die Lamine wichtige strukturelle Bestandteile, die für die Aufrechterhaltung der Zellform und die Unversehrtheit der Zelle benötigt werden. Die Zerstörung des Zytoskelettes und der Kernhülle (Kernmembran) sind Ereignisse, die bei den meisten Formen der Apoptose vorkommen (Rao et al., 1996). Die dritte Gruppe der Proteine, die als „flussabwärts“ gelegene Effektoren bei Kaspase-vermittelter Apoptose dienen, beinhaltet verschiedene Protein-Kinasen und den DNA-Fragmentierungs-Faktor (DFF) (Liu et al., 1997; Earnshaw et al., 1999).

Die aktivierte Initiator-Kaspase-8 oder -10 besitzt wiederum das Potential zur Spaltung der am weitesten terminal gelegenen Kaspase-3 (Miller, 1997; Kliche et al., 1999; Yaoita et al., 2000). Vor allem von der Kaspase-3 ist bekannt, dass sie eine in der Apoptose-Kaskade häufig aktivierte Protease darstellt, die spezifische Spaltungen vieler zellulärer „Schlüssel-

Proteine“ katalysiert (Porter & Janicke, 1999). Die Kaspase-3 aktiviert außerdem den DFF (Liu et al., 1997; Liu et al., 1998), der die typischen apoptotischen Kernveränderungen hervorruft.

Bei PARP handelt es sich um ein DNA-Reparaturenzym, dessen Einsatz im Zuge der Apoptose durch Spaltung verhindert wird. PARP dient als Substrat für die Kaspase-3 und die Kaspase-6 (Takahashi A et al. 1996). Die Spaltung von PARP stellt ein frühes Kennzeichen der Apoptose einer Zelle dar (Lindahl et al., 1995).

Die Kernhülle von Eukaryontenzellen besteht aus der äußeren und der inneren Kernmembran. Relativ ungeordnete Intermediärfilamente bilden die Außenmembran, auf der Innenseite befindet sich eine dünne, geordnete Schicht von Intermediärfilamenten, die Kern-Lamina. Die Kern-Lamina ist ein Gitter aus Intermediärfilamenten (= IF-Proteine), die sich bei Säugern aus drei IF-Proteinen zusammensetzen, den Laminen A, B und C (Nigg, 1992).

Als Folge der Apoptose-Kaskade wird Lamin A und C von Kaspase-6 (= Mch 2a) gespalten (Takahashi et al., 1996; Rao et al., 1996). Lamin B ist auch ein Substrat für Kaspase-6, kann aber auch von einer Calcium-abhängigen Protease gespalten werden (Zhivotovsky et al., 1997). Die Lamine dienen der Organisation des Chromatins an der Kernperipherie. Daher ermöglicht die Proteolyse der Lamine die Kondensation des Chromatins zu Aggregaten, die dann wiederum schnell in membrangebundene apoptotische Körperchen gepackt werden (Rao et al., 1996). Weiterhin kann die Spaltung der Lamine den Untergang des Zellkernes weiter vorantreiben, indem der Kern geöffnet und damit die Möglichkeit zur Degradation weiterer Kernsubstrate gegeben wird (Oberhammer et al., 1994; Lazebnik et al., 1995a; Rao et al., 1996). DNA Topoisomerase-1 und -2 sind Proteine, die für die Modifikation der DNA-Anordnung zuständig sind, wobei die DNA Topoisomerase-2 zusätzlich das Chromatin in der Kernmatrix verankert (Casiano et al., 1996).

Die Kaspase-8 und auch die Kaspase-10 haben, wenn sie erst einmal über die Rezeptoren in dem Multi-Protein DISC aktiviert sind, zwei Hauptfunktionen. Beide können direkt weitere „flussabwärts“ gelegene Kaspasen aktivieren (Srinivasula et al., 1996), die die endgültigen morphologischen Besonderheiten der Apoptose zustande bringen (Martin & Green, 1995; Porter & Janicke, 1999). Die Kaspase-8 kann weiterhin die Abgabe von Cytochrom C aus den Mitochondrien veranlassen (Kuwana et al., 1998).

Die Kaspasen bringen demgemäß den Abbau der zellulären Bestandteile zustande und aktivieren eine spezifische Endonuklease, und zwar eine Caspasen-aktiviert Deoxyribonuclease (CAD), welche die DNA spaltet (Enari et al., 1998; Wyllie, 1980), was in einem Abbau des Chromatins resultiert.

Bei der Induktion der Apoptose über den mitochondrialen Weg verursacht eine Vielzahl von Induktoren z.B. Onkogene, p53, Mitglieder der Bcl-2 Familie und andere Pathogene, wie Ischämie, die Aktivierung zweier Mitochondrien-abhängiger Mechanismen. Beide Mechanismen sind möglicherweise von der „mitochondrial permeability transition“ (MPT) - Pore abhängig, die ihrerseits von Bcl-2 reguliert wird (Kroemer et al., 1998; Susin et al., 1999). Normalerweise sind die meisten MPT-Poren geschlossen. Das Öffnen der Poren hat bestimmte Konsequenzen für die mitochondriale Physiologie, einschließlich des Zusammenbruches des mitochondrialen transmembranösen Potentials (Zoratti & Szabo, 1995; Kroemer et al., 1998). Dieser Zusammenbruch ist ein frühes Ereignis in der Apoptose-Kaskade. Hinzu kommen weitere Veränderungen, die die mitochondriale PT beeinflussen. So ist z.B. Cytochrom C, das sonst nur in dem mitochondrialen intermembranösen Spalt zu finden ist, dann im Zytosol vorhanden (Kroemer et al., 1998). Ob die Cytochrom C-Abgabe eine Ursache oder eine Konsequenz des Öffnens der MPT-Pore ist, bleibt weiterhin unklar.

Einer dieser Mechanismen führt nach Freisetzung von Cytochrom C zur Aktivierung der Kaspase-9 (Cory & Adams, 1998), die wiederum die Kaspase-3 spaltet. Das freigesetzte Cytochrom C bindet dabei an einen „apoptotic protease-activating factor-1“ (Apaf-1), welcher in Anwesenheit von dATP der Reihe nach die Kaspase-9 aktiviert und die proteolytische Kaskade weiterlaufen lässt (Cory & Adams, 1998). Bcl-2 könnte hier ebenfalls eine Rolle spielen, indem es Apaf-1 reguliert und die Aktivierung der „flussabwärts“ gelegenen Kaspasen verhindert (Cory & Adams, 1998). Gleichzeitig wird der „apoptosis-inducing-factor“ (AIF) aus den Mitochondrien freigesetzt. Dieser AIF ist ein weiteres intermembranös gelegenes mitochondriales Protein, das Kaspasen-unabhängige apoptotische Veränderungen im Zellkern und an den Membranen verursacht (Susin et al., 1999).

Der Zusammenhang zwischen diesen beiden Mechanismen ist trotz intensiver Forschung noch weitgehend ungeklärt. Die Aktivierung von Todesrezeptoren wie dem Fas-Rezeptor an der Zellmembran durch den Fas-Liganden resultiert in einer Aktivierung der Kaspase-8, wobei bei hohen Konzentrationen der Kaspase-8 die „flussabwärts“ gelegenen Kaspasen unabhängig von den Mitochondrien aktiviert werden. Bei niedrigen Konzentrationen von Kaspase-8 ist die Aktivierung weiterer Kaspasen Cytochrom C abhängig (Kuwana et al., 1998). Es wurde vermutet, dass die Kaspase-8 den Rezeptor-Weg mit dem mitochondrialen Weg über einen im Zytosol gelegenen Mediator verbindet. Dieser Mediator wurde nun identifiziert. Es handelt sich um ein Protein, das *in vitro* direkt die Cytochrom C-Abgabe aus den Mitochondrien veranlasst, nachdem es von Kaspase-8 gespalten wurde. Dieses Protein heisst Bid und besitzt wie andere Proteine der Bcl-2 Familie eine BH3 Domäne (Luo et al.,

1998). Durch die Spaltung von Bid kann das COOH-terminale Ende sich an die Mitochondrien anlagern und ist dann fähig, die Cytochrom C-Abgabe zu veranlassen. Auch hier spielt Bcl-2 eine Rolle, da hohe Bcl-2 Spiegel die Cytochrom C-Abgabe durch Bid blockieren (Luo et al., 1998).

3.2.3. Die Degradationsphase der Apoptose

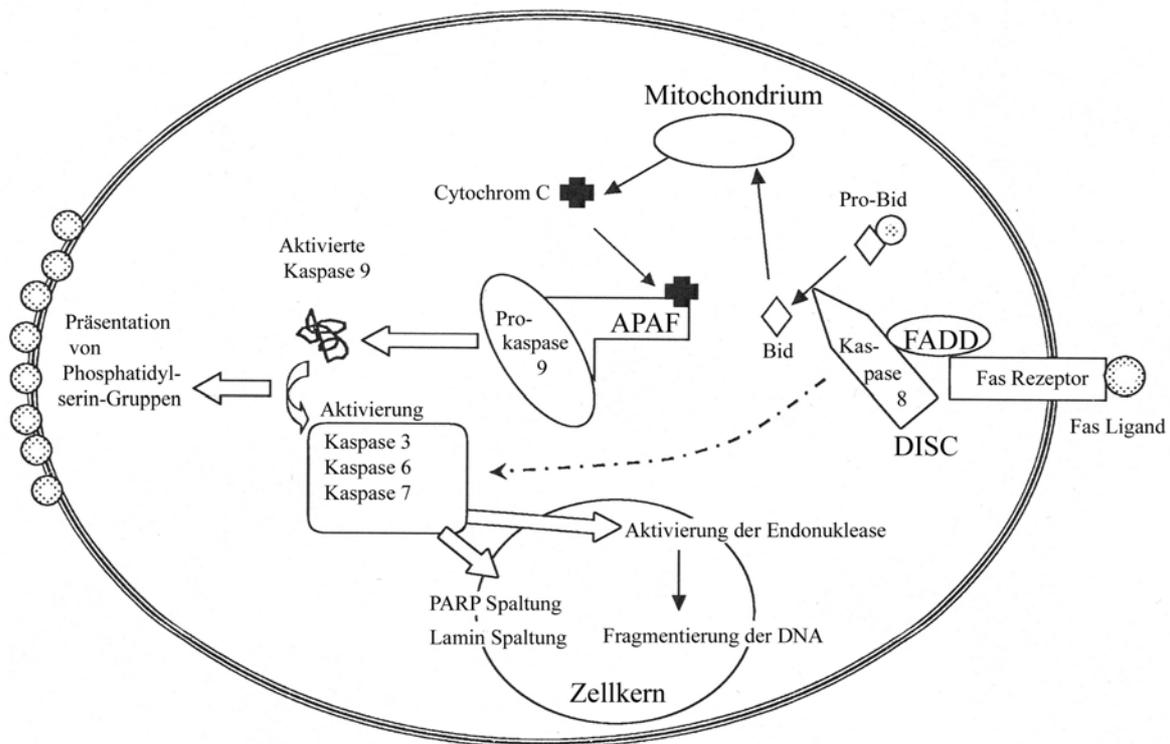
In der Degradationsphase treten die unverwechselbaren Anzeichen der Apoptose in Erscheinung. Diese beinhalten eindeutige morphologische Veränderungen der Zellen und die internukleosomale Fragmentierung der DNA (Kerr et al., 1987; Saraste & Pulkki, 2000).

Morphologische Kennzeichen der Apoptose sind Zellschrumpfung, Erhöhung der Zytoplasmadichte, Chromatinkondensation und Ausstülpungen an der Kernmembran (Sgonc & Wick, 1994; Sgonc & Gruber, 1998). Dabei lagert sich das Chromatin, welches aus DNA und gebundenen Proteinen besteht, zu deutlich begrenzten Klümpchen von innen an die intakte Kernmembran an. Im weiteren Verlauf löst sich die Zelle aus ihrer Umgebung und der Kern bricht auseinander (Karyorrhexis). Schließlich zerfällt die Zelle in eine Vielzahl kleiner apoptotischer Körperchen („apoptotic bodies“). Diese membranumhüllten Strukturen bestehen aus dicht gepackten Zellorganellen und Kernbruchstücken. Besonders auffällig ist dabei, dass die Mitochondrien und die Zellmembran, im Gegensatz zur Nekrose, kaum Veränderungen zeigen (Bellamy et al., 1995).

Die Quervernetzung von Proteinen durch Transglutaminase, einem Enzym dessen Aktivität durch Calciumionen (Ca^{2+}), Guanosintriphosphat (GTP), S-Nitrosylierung und Polyamine moduliert wird (Melino & Piacentini, 1998; Bernassola et al., 1999), hält während des Zerfalls der Zelle die apoptotischen Körperchen intakt (Fesus et al., 1987). Nachfolgend lösen sich die Interaktionen der einzelnen Zelle zu ihrer Nachbarzelle auf (Ueda & Shah, 1994) und es beginnen Veränderungen am Plasmalemm (Kroemer et al., 1995; Casiano et al., 1996). Dies ermöglicht den Makrophagen oder auch den nicht-phagozytierenden Nachbarzellen, die apoptotische Zelle zu erkennen und zu phagozytieren (Kroemer et al., 1995). Normale Plasmamembranen zeigen eine deutliche Asymmetrie der Phospholipide, wobei Phosphatidylcholin und Sphingomyelin die hauptsächlichen Phospholipide des äußeren Blattes und Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin die meisten Phospholipide des inneren Blattes darstellen. Apoptose ist mit einem Verlust dieser Asymmetrie der Phospholipide verbunden, wobei das negativ geladene Phosphatidylserin an dem äußeren Blatt der Plasmamembran ausgestellt wird. Makrophagen können so die apoptotische Zelle

erkennen (Fadok et al., 1992). Das Präsentieren von Phosphatidylserin-Gruppen, die normalerweise an der inneren Membran gelegen sind, erlaubt auch das Erkennen und Eliminieren apoptotischer Zellen durch ihre gesunden Nachbarzellen (Kroemer et al., 1998). Bei der Apoptose bleiben, bis auf das Endoplasmatische Retikulum, die Zellorganellen so gut wie intakt und auch die zellulären Makromoleküle bleiben innerhalb der Plasmamembran, wenn auch z.T. in apoptotischen Körperchen (Bellamy et al., 1995) und somit kommt es nicht zur Entzündungsreaktion in der Umgebung dieser apoptotischen Zelle (Bellamy et al., 1995; Kroemer et al., 1995; Davies, 1997).

Abb. 6: Schematische Darstellung der Apoptose-Kaskade in einer Zelle modifiziert nach Ramachandran et al. (2000).



3.3. Regulation und Hemmung der Apoptose

Die Mitochondrien spielen in der Regulation der Apoptose bei Säugetierzellen und menschlichen Zellen eine zentrale Rolle (Kroemer et al., 1998; Susin et al., 1998). Dies zeigt sich unter anderem darin, dass sich die Mitochondrien während der Apoptose charakteristischen Veränderungen einschließlich eines nicht-spezifischen Anstieges der Membranpermeabilität unterziehen. Die Veränderungen der Membranpermeabilität („mitochondrial permeability transition“ = MPT) entwickeln sich allmählich (Lemasters et al.,

1998). Die obligatorisch folgende Öffnung der MPT-Pore (MPT-P) verursacht die Freisetzung der Apoptose-Induktoren (Zamzami et al., 1996). Hinzu kommt eine Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials (Zamzami et al., 1995), die eine Begleiterscheinung oxidativen Stresses darstellt (Backway et al., 1997). Die Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials tritt bei Zellen auf, die irreversibel programmierten Zelltod begehen (Zamzami et al., 1995). Diesen beiden weitreichenden Veränderungen an den Membranen der Mitochondrien folgen dann andere, klassisch apoptotische Veränderungen wie DNA-Fragmentierung, Reduktion des Zellmembranpotentials und Ruptur der Kernmembran (Zamzami et al., 1995; Susin et al., 1998). Weiterhin zeigen zellfreie Systeme, dass Produkte der Mitochondrien die Aktivierung von Kaspasen und Endonukleasen limitieren und bestimmte Arzneimittel, die die mitochondriale Membran stabilisieren, können Apoptose verhindern. Mitochondrien mit PT induzieren Kondensation des Chromatins und DNA-Fragmentierung, wohingegen Mitochondrien, die durch bestimmte pharmakologische Stoffe vor der PT geschützt werden *in vivo* und *in vitro* keine Apoptosezeichen an den Kernen aufweisen (Zamzami et al., 1996). Auch die Proteine der Bcl-2 Familie regulieren die Apoptose über Beeinflussung der Mitochondrien, indem sie auf die Membranen Einfluss nehmen (Susin et al., 1998).

Cytochrom C, ein Bestandteil der mitochondrialen Atemkette, der sich ausschließlich im intermembranösen Spalt der Mitochondrien befindet, wird während der Apoptose in das Zytosol abgegeben (Yang et al., 1997; Luo et al., 1998; Kim et al., 1998). Es herrscht allerdings Uneinigkeit über die genauen Mechanismen der Freisetzung. Insbesondere der nahezu vollständige Erhalt der Mitochondrienmorphologie während der Freisetzung von Cytochrom C bietet reichlich Diskussionsstoff (Saraste & Pulkki, 2000). Einerseits könnte ein Anstieg der mitochondrialen Membranpermeabilität die Abgabe von Cytochrom C möglich machen, andererseits zeigen Studien, dass auch hier Kaspasen in den Mechanismus eingreifen. Bei Rezeptor-vermittelter Apoptose wird Kaspase-8 aktiviert, die wiederum über einen indirekten Mechanismus die Cytochrom C-Abgabe veranlasst, indem sie ein bestimmtes zytosolisches Substrat spaltet (Kuwana et al., 1998). Dieses Substrat heisst Bid, ein Kaspase-8 abhängiger Cytochrom C-Abgabefaktor (Luo et al., 1998) (siehe auch Kapitel II., Punkt 3.2.2.). Die Cytochrom C-Abgabe aus den Mitochondrien kann von Bcl-2 blockiert werden (Zamzami et al., 1996; Yang et al., 1997), einem anti-apoptotischen Protein (Cory & Adams, 1998), das in der äußeren Membran der Mitochondrien lokalisiert ist (Yang et al., 1997), indem es wahrscheinlich die MPT an der Mitochondrienmembran verhindert (Zamzami et al., 1996). An dieser Stelle greifen auch wieder die Kaspasen in die Apoptose-Kaskade ein, da die

Kaspase-3 das Bcl-2 Protein spalten und somit die Cytochrom C-Abgabe unterstützen kann (Kirsch et al., 1999). Bcl-2 kann auch über Interaktion mit Bid in die Regulation der Cytochrom C-Abgabe eingreifen. Der Mechanismus ist zwar noch unklar, doch Bcl-2 blockiert die durch Bid induzierte Cytochrom C-Abgabe aus den Mitochondrien (Luo et al., 1998).

Im Gegensatz dazu steht Bax, ein pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie, das während der Apoptose vom Zytosol zu den Mitochondrien überwechselt (Wolter et al., 1997) und die Cytochrom C-Abgabe induziert (Jurgensmeier et al., 1998; Eskes et al., 1998). Diese Cytochrom C-Abgabe durch Bax ist jedoch unabhängig von der MPT und läuft über einen anderen Mechanismus, an dem Magnesium-Ionen maßgeblich beteiligt sind (Eskes et al., 1998).

Schließlich wurde ein Apoptose-auslösender Faktor (apoptosis inducing factor = AIF), der während der Apoptose von den Mitochondrien zum Zellkern überwechselt, charakterisiert. Dieser AIF ist in der Lage die Apoptose von Zellkernen *in vitro* auszulösen, wie z.B. deren Chromatin-Kondensation und -Fragmentation. Auch die Abgabe von AIF aus den Mitochondrien kann von Bcl-2 blockiert werden, es kann jedoch die Auswirkungen des schon abgegebenen AIF nicht verhindern (Susin et al., 1999).

3.4. Die Rolle von Adenosin-Triphosphat (ATP) bei der Apoptose

Die Apoptose ist ein aktiver und damit Energie verbrauchender Prozess. Leist et al. (1997) konnten zeigen, dass Zellen *in vitro*, bei denen Apoptose ausgelöst wurde, bei Fehlen von ATP von apoptotischem Zelltod zu nekrotischem Zelltod überwechselten. Die Anwesenheit von ATP verhinderte dabei die Nekrose und befähigte die Zellen zur Apoptose. ATP wird für die aktive Ausführung der Endphase der Apoptose, die Kernkondensation und DNA-Degradation miteinschließt, benötigt (Leist et al., 1997).

Cytochrom C aus den Mitochondrien und Apaf-1 agieren in einer ATP-abhängigen Art und Weise (Li et al., 1997; Ferrari et al., 1998). Dabei binden Kaspase-9 und Apaf-1 in Anwesenheit von Cytochrom C und dATP aneinander, was in einer Aktivierung von Kaspase-9 resultiert (Li et al., 1997). Aber auch die über die Todesrezeptoren aktivierte Kaspase-8 benötigt in bestimmten Fällen ATP, der genaue Mechanismus ist allerdings noch unklar (Ferrari et al., 1998).

4. Apoptose-relevante Proteine

4.1. Die Bcl-2 Familie

In den letzten Jahren wurden 15 Mitglieder der Bcl-2 Familie identifiziert (Desagher & Martinou, 2000). Allen ist gemeinsam, dass sie mindestens eine der vier konservierten Bcl-2 homologen Domäne (BH1 bis BH4) besitzen (Gross et al., 1999; Desagher & Martinou, 2000). Hierbei handelt es sich um alpha-Helix Proteinregionen, die eine Homo- oder Heterodimerisation zwischen den einzelnen Mitgliedern ermöglichen, was auf eine neutralisierende Wirkung der Proteine untereinander hindeutet (Gross et al., 1999). Man kann grundsätzlich zwischen anti- und pro-apoptotischen Mitgliedern unterscheiden, wobei eine Unterteilung in drei Unterfamilien vorgenommen wird (Tsujimoto, 1998; Gross et al., 1999).

Die erste Unterfamilie besteht aus den anti-apoptotischen Mitgliedern, deren Sequenzen in allen vier Regionen (BH1 bis BH4) übereinstimmen (Gross et al., 1999). Auch das Bcl-2 und das Bcl-x_L gehören zu dieser aus fünf Proteinen bestehenden Gruppe.

Die beiden anderen Unterfamilien beinhalten die pro-apoptotischen Mitglieder. Die durch Bax, Bak und Bok repräsentierte Unterfamilie zeigt dabei eine Übereinstimmung in den BH1-bis BH3-Domänen, wohingegen die übrigen sieben Mitglieder der dritten Unterfamilie, einschließlich Bid, nur die kurze zentrale BH3-Domäne besitzen (Gross et al., 1999).

Die hydrophobe Carboxy(C)-terminale Transmembrandomäne stellt eine weitere Besonderheit der Bcl-2 Familie dar, welche den Proteinen eine Verankerung in den Organellenmembranen ermöglicht (Goping et al., 1998). Die anti-apoptotischen Mitglieder sind in erster Linie integrale Membranproteine, die sich vor allem an den Membranen der Mitochondrien, des Endoplasmatischen Retikulums und des Kernes befinden (Tsujimoto, 1998; Gross et al., 1999). Im Gegensatz dazu ist die größte Gruppe der pro-apoptotischen Mitglieder vor dem Todes-Signal im Zytosol oder Zytoskelett lokalisiert (Gross et al., 1999). So kommt Bax im Zytosol, aber auch in den Mitochondrien vor (Tsujimoto, 1998; Goping et al., 1998).

4.2. Cytochrom C

Cytochrom C ist ein aus 104 Aminosäuren bestehendes, sehr stabiles Hämoprotein der Atmungskette, das in allen Zellen aerober Organismen vorkommt. Die Sequenz, die dreidimensionale Struktur sowie die Lokalisation von Cytochrom C an der äußeren

Oberfläche der inneren Mitochondrienmembran sind seit vielen Jahren bekannt. Dort fungiert es als Elektronentransporter zwischen Cytochrom C1 und Cytochromoxidase. Da bei diesem Schritt keine Energie frei wird, beschränkt sich die Funktion des Proteins auf einen reinen Elektronentransfer zwischen zwei energiegewinnenden Systemen der Atmungskette (Gonzales & Neupert, 1990; Skulachev, 1998)

Cytochrom C entsteht an den Ribosomen des Zytoplasmas und folgt einem einheitlichen Weg zu den Mitochondrien, bei dem es weder eine signalgebende Sequenz, noch ein elektrochemisches Potential noch eine generelle Protein-Translokation benötigt (Mayer et al., 1995).

Erst 1996 entdeckten Liu et al. eine weitere wichtige Funktion des Cytochrom C als einen Teil des mitochondrialen Pfades der Apoptose-Kaskade. Dabei stellten sie fest, dass eines der Apoptose auslösenden Proteine der „apoptosis activating factor-2“ (Apaf-2) mit Cytochrom C identisch ist. Cytochrom C ist dabei in der Lage bei Anwesenheit von ATP Apoptose in Zellkernen auszulösen (Liu et al., 1996).

4.3. Apoptose-verhindernde Proteine

Bei diesen Proteinen handelt es sich um eine Familie genannt „Inhibitor of apoptosis proteins“ (IAPs), die die Apoptose blockieren können. Die IAPs bilden eine Familie in der Evolution gut erhaltener Moleküle, die ursprünglich beim Baculovirus gefunden wurden (Roy et al., 1995). Das erste menschliche IAP, das identifiziert wurde, war das neuronale Apoptose-verhindernde Protein („neural apoptosis inhibitory protein“ = NIAP), das basierend auf seiner Mitwirkung an der neurodegenerativen spinalen Muskelatrophie isoliert wurde (Roy et al., 1995). Danach wurden vier weitere menschliche IAPs, genannt c-IAP1, c-IAP2, X-IAP und Survivin, isoliert und ihre hemmende Wirkung auf den Zelltod konnte nachgewiesen werden (Rothe et al., 1995; Duckett et al., 1996; Ambrosi et al., 1997; Deveraux et al., 1997).

Das gemeinsame strukturelle Kennzeichen aller IAP Familien-Mitglieder ist ein Cystein/Histamin-reiches „Leitmotiv“, genannt das Baculovirus IAP Wiederholungsmuster („baculovirus IAP repeat“ = BIR), das jeweils in 1 bis 3 Wiederholungen vorhanden ist (Schulze-Osthoff et al., 1998). Man nimmt an, dass BIR, da es bei allen Mitgliedern vorhanden ist, eine zentrale Rolle in ihrer Funktion spielt (Schulze-Osthoff et al., 1998). Weiterhin besitzen die meisten IAPs eine Carboxyl(C)-terminale RING-Finger-Domäne (Rothe et al., 1995; Duckett et al., 1996; Schulze-Osthoff et al., 1998). Bei Survivin und NIAP

fehlt allerdings diese C-terminale RING-Finger-Domäne (Ambrosini et al., 1997; Schulze-Osthoff et al., 1998). Deveraux et al. (1997) konnten zeigen, dass einige IAPs, einschließlich X-IAP, sich an bestimmte Kaspasen, wie Kaspase-3 und Kaspase-7, anlagern und sie blockieren können. Die Rolle der IAPs bezüglich der Todes-Rezeptoren ist unbekannt (Schulze-Osthoff et al., 1998).

5. Apoptose im Magen-Darm-Trakt

Die Apoptose stellt den zellulären „Selbstmord“ dar, der für die Erhaltung des zellulären Gleichgewichtes zwischen Zellproliferation und Zelltod verantwortlich ist. Obwohl die Apoptose von einer Vielzahl verschiedener Signale ausgelöst werden kann, handelt es sich um einen sehr kontrollierten Prozess mit einem genauestens festgelegten Ablauf (Ramachandran et al., 2000).

Die Apoptose ist für den Magen-Darm-Trakt von großer Bedeutung, da die Schleimhaut einen Prozess kontinuierlichen Zellumsatzes durchmacht, welcher für die Aufrechterhaltung der normalen Funktionen essentiell ist. Die Größe der sich kontinuierlich erneuernden Zellpopulation der Magenschleimhaut wird von der Rate der Zellproduktion und von der Rate des Zellverlustes bestimmt (Hirasawa et al., 1999). Beim Rind befindet sich die Proliferationszone im Isthmus. Von dort aus wandern die Zellen entweder in Richtung des Lumens oder in Richtung des Drüsengrundes und erfahren eine weitere Differenzierung (Sommer & Kressin, 2001). Im Magen werden die Zellen des Oberflächenepithels in das Lumen abgeschilfert. Über die Morphologie dieses Prozesses ist noch relativ wenig bekannt, doch ein Großteil der Zellen wird dem Prozess der Apoptose unterzogen und macht auf diese Weise Platz für jüngere Zellen (Stachura et al., 1993; Sterle & Pipan, 1994).

Im Darm findet die Zellproliferation in den Krypten statt, wohingegen die Differenzierung während einer schnellen und planmäßigen Wanderung in Richtung der Zottenspitze abläuft. Das Zottenepithel besteht aus differenzierten absorbierenden Zellen, deren Ursprung in den Stammzellen der Darmkrypten liegt. Die Epithelzellen wandern in Richtung des Lumens und proliferieren noch einige Male, bevor sie die Zottenspitze als differenzierte Epithelzellen erreichen. Die differenzierten Enterozyten, welche den Großteil der Zellen ausmachen, werden dann der Apoptose unterzogen (Ramachandran et al., 2000).

Epithelzellen des Magen-Darm-Traktes haben einen hohen Umsatz und da es essentiell ist, ein normales Zellgleichgewicht beizubehalten, ist der Zelltod und im Besonderen die Apoptose der entscheidende Punkt, die physiologische Morphologie und Funktion

aufrechtzuerhalten. Obwohl die Apoptose in histologischem Material eher unauffällig erscheint, ist sie wahrscheinlich für den Großteil des Zellverlustes im adulten Darm verantwortlich und ein Hauptregulator der Zellzahl (Hall et al., 1994). Bei Betrachtung der absoluten Zahl der apoptotischen Körperchen, ihres schnellen Abbaus und der Dimensionen der Zotten des Dünndarmes und der Krypten des Dickdarmes wird klar, dass der Zellverlust im normalen murinen Darm weitgehend auf der Basis der beobachteten Apoptose erklärt werden kann (Hall et al., 1994).

Die Wichtigkeit der Apoptose für den Magen-Darm-Trakt wird auch deutlich durch die Auswirkung defekter Apoptose: Bei Ausbleiben des Zelltodes persistieren prämaligne geschädigte Zellen, die das Fortschreiten einer Krankheit erlauben. Daher liegt das Interesse darin, die Mechanismen und die zahlreichen physiologischen Auslöser der Apoptose ebenso wie die Rolle der Apoptose in pathologischen Stadien des Magen-Darm-Traktes zu kennen (Ramachandran et al., 2000).

5.1. Physiologisches Vorkommen von Apoptose im Magen-Darm-Trakt

Das Schleimhautepithel des Magen-Darm-Traktes von Säugetieren erneuert sich ungefähr alle drei bis fünf Tage (Moss et al., 1996a; Grant & Specian, 2001).

Die Darmschleimhaut besitzt Zellen in vielen Stadien der Differenzierung, von den unreifen Stammzellen der Krypten bis hin zu den differenzierten Zellen der Zottenspitze. Nachdem sie die proliferative Phase abgeschlossen haben, differenzieren sich die Darmepithelzellen, sie reifen und übernehmen ihre Funktionen bezüglich der Absorption, der Sekretion und der Erhaltung der selektiv durchgängigen Barriere (Hall et al., 1994). Feedback-Signale von den Zellen der Zotten zu den Zellen der Krypten regulieren die Proliferation, die über Wachstumsfaktoren, wie „epidermal growth factor“ (EGF) und „transforming growth factor alpha“ und „beta“ (TGF- α und - β), vermittelt zu sein scheint (Ruifrok et al., 1997). Der EGF scheint daran indirekt beteiligt zu sein, da er in der Magenschleimhaut von Ratten die Apoptose der Epithelzellen hemmt (Konturek et al., 2001). TGF- α dagegen ist an der Stimulation der Proliferation beteiligt, TGF- β verhindert die Proliferation der Zellen (Ruifrok et al., 1997).

Obwohl Apoptose auch Stammzellen der Krypten betrifft (Potten & Loeffler, 1990; Potten et al., 1997), findet die Apoptose vornehmlich an den Zellen der Zottenspitze statt (Hall et al., 1994; Benard et al., 1999; Ramachandran et al., 2000). Westcarr et al. (1999) konnten zeigen, dass Apoptose im Dünndarm von Ratten hauptsächlich an der Zottenspitze vorkommt, an der

sich eine „auffällige Manschette“ aus Zellen bildet, während alle Zellen der Krypten Bcl-2 Aktivität zeigen. In Blinddarmepithel von Hühnern fallen an der Kryptenoberfläche apoptotische Zellen mit intensiver DNA-Aufspaltung auf, was darauf schließen lässt, dass diese Zellen nach der Induktion der Apoptose in das Lumen abgeschilfert werden. Dies ist ein Prozess, welcher wahrscheinlich durch Lymphozyten vermittelt abläuft (Takeuchi et al., 1999). Auch im Dünndarm von Rindern befinden sich die allgemein zahlreichen Lymphozyten hauptsächlich an der Zottenspitze, was nahe legt, dass die Lymphozyten an der Apoptose von Epithelzellen des Rinderdarmes beteiligt sind (Suzuki et al., 1997).

Makrophagen und Lymphozyten sind mit dem Abtransport apoptotischer Zellen von der Zottenspitze in Zusammenhang gebracht worden (Iwanaga, 1995). Im Dünndarm von Meerschweinchen und Affen sind Makrophagen in der Lamina propria der Zottenspitze angesiedelt und tatkräftig an der Phagozytose verbrauchter Epithelzellen beteiligt. Intraepithelial gelegene Lymphozyten (IEL) mit zytoplasmischen Granula nehmen möglicherweise an zytotoxischer Eigenschaft zu und liegen in direkter Nachbarschaft der sterbenden Enterozyten, was lymphozytenvermitteltes Auslösen der Apoptose-Kaskade vermuten lässt. Bei Maus und Ratte werden die gealterten Enterozyten allerdings komplett von der Zottenspitze in das Darmlumen abgeschilfert, Makrophagen zeigen bei dieser Spezies weniger Phagozytose-Aktivität (Iwanaga et al., 1994; Iwanaga, 1995).

Eine elektronenmikroskopische Studie hat gezeigt, dass Enterozyten an der Zottenspitze hervorstehen und Kondensation des nukleären Chromatins zeigen, unmittelbar bevor sie in das Lumen abgegeben werden (Shibahara et al., 1995). Die Interzellularräume zwischen diesen prominenten Zellen werden häufig von großen Lymphozyten besetzt, die wahrscheinlich die älteren Enterozyten nicht phagozytieren, aber ihre Apoptose veranlassen (Iwanaga, 1995).

Ein Zytokin, das hierbei eine wichtige Rolle spielt, ist der „tumor necrosis factor“ (TNF). Er wird von den im Dünndarm zahlreich vorhandenen, aktivierten IEL abgegeben. Unter TNF-Einfluss werden viele Enterozyten der Zotten sehr schnell apoptotisch. Der Prozess startet an der Zottenspitze und breitet sich dann entlang der Zottenachse aus. Dabei werden die apoptotischen Zellen ins Lumen abgestoßen, gefolgt von einer schnellen Reepithelisierung. Im Epithel des Dickdarmes befinden sich nur wenige IEL, so dass hier diese TNF-vermittelte Apoptose selten vorkommt (Guy-Grand et al., 1998). Zusammenfassend wurde gezeigt, dass der TNF Apoptose und Ablösung der Enterozyten an der Zottenspitze von Mäusen veranlasst (Guy-Grand et al., 1998), und zwar wahrscheinlich durch Induktion der Kaspasen-Aktivität (Piguet et al., 1999).

Mehrheitlich stammen die Daten über Mechanismen und Auslöser von Apoptose aus Arbeiten an Zelllinien und es gibt nur wenig Information über Initiation und Ablauf der Apoptose von Enterozyten *in vivo*. Möglicherweise spielt oxidativer Stress bei der Apoptose normaler Epithelzellen der Dünndarmzotte beim Affen eine Rolle. Intrazelluläre „Oxidationsmittel“ sind an der Induktion der Apoptose beteiligt und diese Art des Zelltodes kann durch eine Reihe von Antioxidantien verhindert werden (Madesh et al., 1999).

Durch Abtrennung aus dem Zellverband ausgelöster Zelltod kann in einer Reihe von Zelltypen auftauchen und obwohl festgestellt wurde, dass es auch eine Form der Apoptose bei Epithelzellen des Darmes ist (Grossman et al., 1997; Groos et al., 2001), gibt es nach wie vor gegensätzliche Meinungen, ob die Zellen sich ablösen, bevor sie dann tatsächlich absterben. 90 Minuten nach Ablösung wurde bei menschlichen Darmepithelzellen DNA Spaltung, der eine aufeinanderfolgende Aktivierung der Prokaspasen der CPP 32 Familie vorausging, beobachtet (Grossman et al., 1998). Ablösung aus dem Zellverband ist eine Möglichkeit für Darmepithelzellen, Apoptose zu begehen. Dabei wurde zuerst Kaspase-6 Aktivierung beobachtet, der eine Spaltung von PARP folgte, die 15 Minuten nach Ablösung aus dem Zellverband begann. Die Spaltung von Lamin A startete erst eine Stunde nach Ablösung aus dem Zellverband, nachdem PARP schon vollständig gespalten vorlag (Grossman et al., 1998). Auch in Darmzellen von Mäusen wurde 90 Minuten nach Ablösung aus dem Zellverband Apoptose beobachtet. Dabei waren vor allem die Epithelzellen von einer schnellen Zunahme der Apoptose betroffen. Dieser Vorgang wurde von Kaspase-Inhibitoren verhindert (Scheving et al., 1998), was nahe legt, dass die Aktivierung der Kaspasen bei der Apoptose dieser Zellen eine Rolle spielt. Apoptose von Darmepithelzellen wird *in vitro* durch die Loslösung aus dem Zellverband ausgelöst, sie führt zu einem deutlichen Absterben von über 90% der Zellen innerhalb von drei Stunden (Grossman et al., 1998). *In vivo* zeigen die Darmepithelzellen typische Anzeichen der Apoptose, sobald sie die lumenwärts gelegene Oberfläche der Zottenspitzen erreicht haben, an der ihre kurze Lebensdauer durch Abschilferung begrenzt wird (Gavrieli et al., 1992; Shibahara et al., 1995). Pompeiano et al. (1998) beschrieben, dass in den Zotten des Dünndarmes die DNA Aufspaltung der Zell-Elimination um Tage vorausgehen kann. Grossman et al. (2002) konnten zeigen, dass menschliche Darmepithelzellen *in vivo* mit ihrer Apoptose starten, sobald sie die am weitesten zum Lumen gelegene Oberfläche bzw. die Zottenspitze erreichen, aber noch bevor sie abgeschilfert werden.

Ein anderer Apoptose-auslösender Faktor im Magen-Darm-Trakt ist ein Mangel an Nährstoffen des zellulären Stoffwechsels. Glutamin ist eine im Blut reichlich vorhandene

Aminosäure und bevorzugter oxidativer Brennstoff der Darmepithelzellen. Glutamin-Entzug löst Apoptose in Darmepithelzellen aus (Papaconstantinou et al., 1998). Dies deutet darauf hin, dass Glutamin den Enterozyten als ein spezifischer Überlebensfaktor dient.

Butyrat ist der bevorzugte Brennstoff der Epithelzellen des Dickdarmes und das Fehlen von Butyrat löst eine ansteigende Expression des Bax-Proteins und parallel dazu eine schnelle Apoptose von Dickdarmzellen *in vitro* aus. Die Zellen zeigen dabei eine signifikante Fragmentierung ihrer DNA (Hass et al., 1997). Weiterhin konnten Mentschel & Claus (2003) zeigen, dass das Vorhandensein von Butyrat die Apoptose von Dickdarm-Epithelzellen *in vivo* verhindert. So ist die Apoptose-Rate im Dickdarm von Schweinen bei hohem Butyratangebot um 34% verringert (Mentschel & Claus, 2003).

Auch die Nahrungsaufnahme hat einen Einfluss auf die Apoptose-Rate der Darmepithelzellen. Ratten zeigen nach 24 Stunden Fasten eine signifikant höhere Apoptose-Rate als gefütterte Tiere. Aber auch nach der Fütterung steigt die Apoptose-Rate an. Dies lässt einen zyklischen Ablauf der Apoptose im Darm vermuten (Iwakiri et al., 2001). Schon 1977 beschrieben Potten et al. das Auftreten von Mitose und Apoptose am Darmepithel von Mäusen in einem zyklischen Rhythmus. Dieses zyklische Muster zeigt sich auch im Dünndarm von Ratten in einer Änderung der Zottenlänge und der Zellzahl und wird vom Fütterungsschema maßgebend beeinflusst (Stevenson et al., 1979). Gardner & Steele (1989) jedoch stellten bei ihren Untersuchungen des Dünndarms von Ratten keine Unterschiede in der Zottenlänge in Abhängigkeit von der Fütterung fest.

5.2. Apoptose bei pathologischen Zuständen des Magen-Darm-Traktes

Die Apoptose spielt eine wichtige Rolle in einer Reihe pathologischer Zustände des Magen-Darm-Traktes. Dies kann einen Anstieg oder Abfall in der Rate des Zelltodes zur Folge haben. Zum Beispiel wurde ein sehr starker Anstieg der Apoptose von Enterozyten bei „*Coeliac disease*“ (Zöliakie = chronische Verdauungsinsuffizienz) gefunden, was darauf hinweist, dass ein Anstieg der Apoptose eventuell für die Zottenatrophie verantwortlich ist, die bei dieser Erkrankung vorkommt (Moss et al., 1996b).

Der Verlust von Epithelzellen bei aktiver „*Ulzerativer Kolitis*“ (UK = Ulzerative Dickdarmentzündung) zeigt sich hauptsächlich in der Apoptose der Krypten und zwar in betroffenen wie auch in benachbarten, nicht betroffenen Gebieten (Iwamoto et al., 1996). Diese nicht-planmäßige Apoptose in den Krypten bei UK ist wahrscheinlich durch auto- oder parakrine Fas zu Fas Liganden (FasL)-Wechselwirkung vermittelt (Iwamoto et al., 1996).

Im physiologischen Kolonepithel exprimieren FasL lediglich einige mononukleäre Zellen, die wie zufällig verstreut in der Lamina propria liegen. Bei UK dagegen steigt die Zahl der interstitiellen FasL-positiven Zellen und die Häufigkeit der Apoptose in der Lamina propria wie auch im Epithel erheblich an. FasL-vermittelte Apoptose der Epithelzellen bei UK führt eventuell auch zum Zusammenbruch der epithelialen Barrierefunktion und ermöglicht die Invasion von pathogenen Mikroorganismen (Strater et al., 1997) (siehe Kapitel II., Punkt 5.5.). Dieses Phänomen kommt auch bei durch Doxorubicin ausgelöster Apoptose vor, bei der ein Anstieg der Apoptose gleichzeitig mit einem Anstieg der Durchlässigkeit der Darmbarriere zu beiden Seiten auftritt (Sun et al., 1998b).

5.3. Ischämie-Reperfusion als Auslöser von Apoptose im Magen-Darm-Trakt

Ischämie gefolgt von Reperfusion ist ein gut charakterisierter klinischer Aspekt, von dem man weiss, dass er, vor allem unter bestimmten Bedingungen wie z.B. Transplantationen, die Zerstörung von Gewebe auslösen kann. Beim Pferd spielt die Pathogenese der Ischämie-Reperfusion eine bedeutende Rolle, da bei fast allen Kolikerkrankungen letztendlich Durchblutungsstörungen des jeweiligen Magen- oder Darmabschnittes vorkommen und die klinischen Erscheinungen prägen (siehe Kapitel II., Punkt 2.). Ischämie tritt bei „Thrombotisch-embolischen Koliken“ auf, hämorrhagische Infarzierung tritt bei spezifischen Erkrankungen wie Obstipationen, Inkarzerationen und Strangulationen durch Verlagerungen von Darmteilen auf. In beiden Fällen kommt es zur Sauerstoffverarmung des Gewebes. Auch bei chirurgisch behandelten Pferden mit Dünndarmstrangulationen treten postoperative Komplikationen als Folge von Schädigungen durch Ischämie-Reperfusion auf (Gerard et al., 1999). Ischämie-Reperfusion kann postoperative Adhäsionen des Dünndarmes bei Fohlen auslösen, die medikamentell beeinflussbar sind (Sullins et al., 2004). Nach Ischämie-Reperfusion weist bei adulten Pferden das Jejunum mehr Schleimhautschäden auf als das Colon ascendens (Dabareiner et al., 2001). Obwohl beim Pferd das Auftreten der Ischämie-Reperfusion in Zusammenhang mit Koliken hinreichend bekannt ist, wurden histologische Untersuchungen ischämischer Darmteile relativ wenig durchgeführt.

Ischämie-Reperfusion hat auch einen Effekt auf die Durchlässigkeit des Schleimhautepithels des Jejunums adulter Pferde. Dabei stellte man einen Anstieg der Durchlässigkeit proportional zur Dauer der Ischämie-Reperfusion fest (Vatistas et al., 2003). Es existieren kaum Studien, die die Apoptose bzw. die Apoptose-Rate bei verschiedenen Kolikerkrankungen im

Zusammenhang mit Ischämie-Reperfusion untersuchen. Daher muss hier hauptsächlich auf Studien bei anderen Spezies, einschließlich des Menschen, zurückgegriffen werden.

Die Schleimhaut des Magens ist nicht sehr empfindlich für Apoptose ausgelöst durch Ischämie-Reperfusion (Fukuyama et al., 2001). Der Dünndarm dagegen ist sehr empfindlich gegenüber Ischämie-Reperfusion (Madesh et al., 1997). Die Schichten des Darmepithels spielen für den Organismus eine große Rolle, indem sie vor Eindringen giftiger Substanzen und Mikroorganismen über den Darm schützen. Die Durchlässigkeit des Darmepithels von Ratten steigt nach 1 bis 6 Stunden Reperfusion im Anschluss an 20 Minuten Ischämie deutlich an. Die Apoptose-Rate der Darmepithelzellen zeigt nach 20 Minuten Ischämie gefolgt von 12 Stunden Reperfusion ebenfalls einen deutlichen Anstieg (Sun et al., 1998a). Auch eine Studie von Noda et al. (1998) hat gezeigt, dass die Apoptose im Dünndarm von Ratten durch Ischämie des Darmes ausgelöst wird und dieser Prozess durch Reperfusion verschlimmert wird. Das Ausmaß der Schleimhautschädigung und die Höhe der Apoptoserate sind proportional zur Dauer der Ischämie und steigen zu Beginn der Reperfusion noch weiter an. Nach 6 Stunden Reperfusion ging die Anzahl der DNA-Spaltungen zu den Ausgangswerten zurück. Dies zeigt, dass Apoptose im Darm ausgelöst durch Ischämie-Reperfusion und die Erholung der Schleimhaut von den Schädigungen ein schneller Prozess ist (Noda et al., 1998). Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien, nach denen apoptotische Zellen innerhalb von wenigen Minuten nach einem Stimulus auftreten können (Ogura et al., 1999) und die ganze Apoptosekaskade oft innerhalb von 1 bis 4 Stunden abgeschlossen ist (Hall et al., 1994; Benard et al., 1999). Auch Ikeda et al. (1998) und Shah et al. (1997) zeigten, dass die Apoptose die vorrangige Form des Zelltodes bei Ischämie gefolgt von Reperfusion darstellt. Dabei trat eine Ablösung der Ratten-Enterozyten aus dem Zellverband auf und diese Zellen zeigten charakteristische morphologische Kennzeichen der Apoptose (Ikeda et al., 1998). Auch sekundäre Nekrose trat bei den apoptotischen Zellen auf, wohingegen primäre, durch Ischämie ausgelöste Nekrose nur sehr selten vorkam (Shah et al., 1997).

Vor allem differenzierte Enterozyten *in vivo* reagieren empfindlich auf Ischämie, was in einem Zottenverlust resultiert. Die differenzierten Enterozyten sterben *in vitro* durch Ischämie-induzierte Apoptose ab (Hinnebusch et al., 2002).

Eine klinische Studie von Hotchkiss et al. (2000) berichtete über ansteigende Apoptose-Raten des Darmepithels bei Menschen mit Polytrauma, Schock und Schädigung durch Ischämie-Reperfusion nach Autounfällen und Schussverletzungen.

5.4. Krebs des Magen-Darm-Traktes und die Rolle der Bcl-2 Proteine bei fehlgesteuerter Apoptose

Die Erhaltung der physiologischen Zellzahlen im Gewebe erfordert ein Gleichgewicht zwischen der Anzahl der Zellteilungen (Proliferations-Rate) und der Anzahl an Apoptosen (Apoptose-Rate). Die Apoptose ist ein kritisches Ereignis in der Homöostase von Gewebe und es wurde herausgefunden, dass die Apoptose eine Schlüsselrolle in der Entwicklung von Tumoren darstellt. Die Apoptose-Rate der Darmepithelzellen variiert an den verschiedenen Stellen des Darmes, was möglicherweise ihre Empfänglichkeit bezüglich der Entwicklung von Neoplasien erklärt (Grossman et al., 2002). Ob die Zellen überleben oder absterben ist hauptsächlich durch die Proteine der Bcl-2 Familie, bestehend aus den anti- und proapoptotischen Regulatoren, bestimmt (Cory et al., 2003). Unkontrollierte Zellproliferation, wie sie bei malignen Entartungen vorkommt, kann das Ergebnis zunehmender Proliferation und/oder abnehmender Apoptose sein (Okuno et al., 1998). Bcl-2 ist ein wichtiges anti-apoptotisches Protein, welches Kaspasen-abhängigen und sogar Kaspasen-unabhängigen Zelltod verhindern kann. Im Gegenzug dazu kann Bax, ein pro-apoptotisches Protein, die Apoptose über einen Kaspasen-abhängigen und einen Kaspasen-unabhängigen Weg auslösen (Okuno et al., 1998).

Ein Abfall der Apoptose wurde mit der Pathogenese von Magenkarzinomen in Verbindung gebracht, da herausgefunden wurde, dass eine Mikrosatelliten-Mutation (MM) des Bax-Genes im Allgemeinen bei Menschen mit Magenkarzinomen vorkommt, was darauf schließen lässt, dass Bax vermutlich einen wichtigen Auslöser der Apoptose und damit einen Tumor-Supressor im Magen darstellt (Yamamoto et al., 1997). Die Rolle von Bax als Tumor-Supressor wird auch dadurch bekräftigt, dass man andere somatische Bax-Mutationen gefunden hat und zwar nicht nur bei Tumoren mit MM, sondern auch bei Tumoren ohne MM und diese waren unabhängig von Mutationen des Onkoproteins p53 (Yamamoto et al., 1997; Rampino et al., 1997).

In physiologischer Dickdarmschleimhaut sind die Bcl-2-positiven Epithelzellen tendentiell an der Kryptenbasis gelegen, wohingegen die Bax- oder Bak-positiven Epithelzellen an der Oberfläche zum Lumen hin gelegen sind (Ogura et al., 1999).

Bei Adenokarzinomen des Dick- und Enddarmes korreliert die Bax Expression mit geringerer Lymphgefäßversorgung und mit geringerer Gewebeinvasion. Patienten mit Bax-positiven Tumoren hatten eine signifikant bessere Prognose in Bezug auf die Überlebenszeit als Patienten mit Bax-negativen Tumoren. Die Expression des Bax Proteins könnte somit ein

weiterer prognostischer Marker für Karzinome des Dick- und Enddarmes sein (Ogura et al., 1999).

5.5. Apoptose und entzündliche Magen-Darm-Erkrankungen

Magenulzera und auch duodenale Ulzera stellen beim Pferd einen wichtigen Erkrankungskomplex dar. Wie schon in Kapitel II., Punkt 2. erwähnt, kommen Magenulzera beim adulten Pferd wie auch beim Fohlen relativ häufig vor. Als Auslöser der Magenulzera kommen Stress, Medikamentengaben wie NSAIDs (siehe Kapitel II., Punkt 2. und Punkt 5.8.) und Infektionen mit *Helicobacter pylori* (siehe Kapitel II., Punkt 5.6.2.) in Frage.

Die Läsionen der Magenschleimhaut bis hin zu Magenulzera stehen im Zusammenhang mit einem gestörten Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Apoptose. Auch hier sind beim Pferd die Zusammenhänge der ulzerativen Erkrankungen mit der Apoptose kaum untersucht, so dass hauptsächlich Studien anderer Spezies genannt werden. Ratten wurden einem definierten Stress ausgesetzt, was in einem starken Anstieg der Apoptose-Rate in der Magenschleimhaut resultierte. Diese Apoptose ging mit einem signifikanten Anstieg des Bax Proteins einher (Konturek et al., 1999 und 2001; Liu et al., 2003). Die Heilung solcher stress-induzierten Magenulzera wird durch epidermale Wachstumsfaktoren gefördert, indem sie Apoptose verhindern (Konturek et al., 2001). Kong und Schusser (2005) fanden heraus, dass unterschiedliche Futterzusammensetzungen und Futterentzug einen Einfluss auf die Apoptose-Rate der Pars nonglandularis des Pferdemagens haben und an der Entstehung von Magenulzera beteiligt sein könnten. Bei Futterentzug von 72 Stunden kam es zu einem signifikanten Anstieg der Apoptose-Rate.

Eine Reihe von immunvermittelten Darmerkrankungen beim Menschen, einschließlich der „Zöliakie“, „*Morbus Crohn*“ und „*Ulzerativen Kolitis*“, sind durch beschleunigten Zellumsatz und Apoptose charakterisiert, die zu veränderter Krypten/Villus-Morphologie führen. Diese Veränderungen und die damit verbundenen funktionellen Änderungen des Darmepithels sind wahrscheinlich durch Zytokine vermittelt, die sowohl von den eingewanderten Entzündungszellen als auch von den Enterozyten selbst, die dann in einer autokrinen Art und Weise fungieren, abgegeben werden (Ruemmele & Seidman, 1998). Dies zeigt, dass nicht nur Lymphozyten in der Lage sind, Zytokine zu produzieren und abzugeben (Boirivant et al., 1999a), sondern auch Darmepithelzellen die Fähigkeit besitzen, einige Zytokine zu bilden. Auf diese Weise haben sie die Möglichkeit zu auto- und parakriner Zellantwort (Ruemmele & Seidman, 1998).

T-Zellen, die von Entzündungsherden bei „*Morbus Crohn*“ oder „*Ulzerativer Kolitis*“ oder anderen entzündlichen Zuständen isoliert wurden, zeigen deutlich verringerte Apoptose und Studien über Zellen von entzündlich verändertem Gewebe bei Menschen mit „*Morbus Crohn*“ lassen den Schluss zu, dass dieser Defekt mit erhöhten Bcl-2 Spiegeln vergesellschaftet ist (Boirivant et al., 1999b). Im Gegensatz dazu zeigen die Darmepithelzellen aus diesem entzündlich verändertem Gewebe eine höhere Apoptose-Rate im Vergleich zu nicht verändertem Gewebe (Di Sabatino et al., 2003). Auch bei Patienten mit „*Zöliakie*“ kommt es zu einer stark ansteigenden Apoptose-Rate, die den Zellverlust trotz der auftretenden Hyperproliferation erklärt (Moss et al., 1996b).

Bei Menschen mit „*Ulzerativer Kolitis*“ beobachtet man beschleunigten epithelialen Zellumsatz aufgrund chronischer Entzündung und epithelialer Zellschädigung. Dieser beschleunigte epitheliale Zellumsatz, der sich in einer angestiegenen Zellproliferation und Apoptose-Rate zeigt (Sipos et al., 2002), prädisponiert die Schleimhaut möglicherweise für DNA Schädigungen, die in einem erhöhten Risiko in Bezug auf Mutationen resultieren, welche mit Fehlbildungen und der Entwicklung von Karzinomen einhergehen (Arai et al., 1999). Der Zellverlust ereignet sich hauptsächlich durch Apoptose in den Krypten veränderter und benachbarter, unveränderter Bereiche der Schleimhaut (Iwamoto et al., 1999), und diese Apoptose ist Fas/FasL vermittelt (Strater et al., 1997; Iwamoto et al., 1999).

Akute Kolitis verschiedenster Ursachen ist durch eine große Anzahl an Leukozyten in der Darmschleimhaut charakterisiert, die als Antwort auf entzündliche Stimuli durch das Schleimhautepithel wandern. Diese Leukozyten fungieren als Apoptoseauslöser (Le'Negrate et al., 2000), und zwar über eine Kombination von Zytotoxizität und Abgabe von TNF (Guy-Grand et al., 1998).

5.6. Infektionen und Apoptose

Die Epithelzellen, die die menschliche Darmschleimhaut säumen, sind die erste Stelle der Invasion eines Wirtes durch Pathogene. Die Apoptose stellt einen Abwehrmechanismus des Wirtes gegenüber viralen Infektionen dar, da Viren lebende Zellen benötigen. Es ist mittlerweile bekannt, dass die Apoptose auch bei der Abwehr anderer intrazellulärer Pathogene und sogar gegen Pathogene, die sich lediglich an die Wirtszelle anheften, eine Rolle spielt (Le Grand, 2000).

5.6.1. Virale Infektionen und Apoptose

Verschiedene Viren wurden und werden in Zusammenhang mit der Apoptose der Wirtszellen untersucht. Zytopathische Bovine Virus Diarrhoe Viren (BVDV) induzieren Apoptose in Zellkulturen von Rindern. Dies scheint ebenso einer der Mechanismen in der Pathogenese der Mucosal Disease zu sein. Die Infektion von Zellen *in vitro* mit zytopathischen BVDV führt zur Aktivierung der intrinsischen Kaskade der Apoptose über die Mitochondrien (Grummer et al., 2002). Schweizer & Peterhans (1999) zeigten, dass bei mit BVDV infizierten Zellkulturen von Rindern im frühen Stadium der Apoptose oxidativer Stress auftritt, dem Kaspasenaktivierung und DNA-Fragmentierung folgen. Oxidativer Stress ist also möglicherweise ein weiterer Faktor, der zur Apoptose infizierter Zellen führt.

Auch die Zytotoxizität von Equinen Influenza Viren (EIV) steht mit der Apoptose der Wirtszellen in Zusammenhang. Diese von den Viren ausgelöste Apoptose ist durch Kaspasen vermittelt und es kommt im weiteren Verlauf zur Spaltung der spezifischen Kaspasensubstrate (Lin et al., 2002).

Das Equine Arteritis Virus (EAV) ist ein weiteres Virus, das wie andere zytopathogene Viren in Verdacht steht, durch das Auslösen von Apoptose bei der Wirtszelle seine zytotoxischen Effekte zu entfalten. Studien haben gezeigt, dass das Virus in der Lage ist, apoptotischen Zelltod durch Kaspasen-Aktivierung und DNA-Fragmentierung *in vitro* auszulösen (Archambault & St-Laurent, 2000).

Infektionen mit Rotaviren sind eine der häufigsten Ursachen bei der Entwicklung von Gastroenteritiden bei Neugeborenen oder wenige Tage alten Menschen oder anderen Säugern. Bei mit Rotavirus infizierten, eine Woche alten Mäusen trat zwischen dem 1. und 5. Tag nach Infektion Diarrhoe auf. Der epitheliale Zellumsatz war in dieser Zeit (<4 Tage) signifikant erhöht. Sowohl die Apoptose-Rate, als auch die Proliferations-Rate stiegen zwischen Tag 1 und Tag 7 an, was in einer Zottenatrophie resultierte (Boshuizen et al., 2003). Dieser Verlust von reifen Enterozyten durch Apoptose und das Ersetzen dieser Zellen durch weniger ausdifferenzierte, sich teilende Zellen, führt zu gestörter Absorptionsfunktion des Darmepithels. Die Apoptose-Rate korrelierte mit der Intensität und der Dauer der Infektion, was darauf schließen lässt, dass das Rotavirus die direkte Ursache für den Anstieg der Apoptose der Zottenepithelzellen darstellt (Boshuizen et al., 2003).

Auch unter den Coronaviren gibt es einige Spezies, die Gastroenteritiden bei Neugeborenen auslösen. Bei Pferden wird die Neonatale Diarrhoe z.T. durch Infektionen mit Coronaviren verursacht (Davis et al., 2000; Guy et al., 2000). Es ist jedoch noch wenig untersucht, ob die

Pathogenese der Infektion mit Coronaviren mit der Apoptose von Darmepithelzellen zusammenhängt. Einige Studien haben gezeigt, dass das Porcine Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV), ein Coronavirus, Apoptose bei infizierten Zellen 10 bis 12 Stunden nach Infektion *in vitro* auslöst. Dabei spielt möglicherweise oxidativer Stress, ausgelöst durch die Coronaviren, eine Rolle. Es wurde nachgewiesen, dass die Apoptose dieser Zellen ein Kaspase-abhängiger Prozess ist (Eléouet et al., 1998; Eléouet et al., 2000). Kim et al. (2000) dagegen zeigten, dass TGEV zwar Apoptose bei Zellen *in vitro* auslöst, nicht jedoch bei Enterozyten des Darmes (Jejunum und Ileum) *in vivo*.

5.6.2. Bakterielle Infektionen und Apoptose

Auch bei bakteriellen Infektionen spielt die Apoptose eine Rolle, indem die Wirtszelle die Vermehrung der Bakterien durch Apoptose abwehrt (Le Grand, 2000).

Das Bakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) wurde intensiven Untersuchungen unterzogen, da es im Zusammenhang mit der Ätiologie verschiedenster Zustände stand und steht und vor allem bei der Entwicklung von Magenulzera beteiligt schien. Die Besiedlung des Magens mit *H. pylori* resultiert in einer wesentlich höheren Anzahl apoptotischer Zellen, als normalerweise vorhanden. Dies lässt den Schluss zu, dass *H. pylori* die Apoptose von Epithelzellen *in vivo* induziert. Ansteigende Apoptose ist dabei möglicherweise der Stimulus für eine kompensatorische hyperproliferative und potentiell prä-neoplastische Antwort der Magenepithelzellen bei chronischer Infektion mit *H. pylori* (Moss et al., 1996c; Wagner et al., 1997). Die Anzahl der apoptotischen Zellen kehrt wieder zu physiologischen Werten zurück, sobald das Bakterium vernichtet ist (Moss et al., 1996c). *H. pylori* löst auch Apoptose von Epithelzellen *in vitro* aus (Wagner et al., 1997). Der exakte Mechanismus mit dem *H. pylori* die Apoptose auslöst ist nicht bekannt, möglicherweise wird sie über verschiedene Mediatoren vermittelt. Die Apoptose bei ulzerativen Erkrankungen des Magens und des Duodenums in Verbindung mit *H. pylori* scheint unter anderem durch Fas vermittelt zu sein, da mit *H. pylori* infizierte Schleimhautzellen des Magens, im Vergleich zu nicht-infizierten Schleimhautzellen, erhöhte Fas-Spiegel zeigen (Houghton et al., 1999). Weiterhin zeigen Magenepithelzellen, deren Apoptose durch Infektion mit *H. pylori* ausgelöst wurde, erhöhte Bak-Spiegel im Vergleich zu nicht-infizierten Magenepithelzellen (Chen et al., 1997).

Menschliche Epithelzellen des Kolon sterben nach Infektion mit invasiven Enteropathogenen wie z.B. Salmonellen oder entero-invasive *Escherichia coli* (*E. coli*) durch Apoptose ab. Diese Apoptose startet frühestens 6 Stunden nach bakterieller Infektion und die sichtbaren

apoptotischen Veränderungen der Zellen treten erst nach 12-18 Stunden auf. TNF-alpha und NO werden als ein Teil der früh-entzündlichen Antwort der Zellen in den wenigen initialen Stunden nach bakterieller Invasion von den Darmepithelzellen gebildet und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der späteren apoptotischen Antwort (Jung et al., 1995; Kim et al., 1998; Witthöft et al., 1998).

Verotoxin-bildende, enteropathogene *E. coli* lösen „attaching & effacing“ Läsionen aus, d.h. sie besitzen die Fähigkeit an den Enterozyten von Ileum und Kolon anzuhafte („attaching“) und dann die Saumschicht der Mikrovilli zu zerstören bzw. die Enterozyten abzutöten („effacing“). Im Anschluss daran wurden apoptotische Veränderungen der infizierten Enterozyten beobachtet. Verotoxin-bildende *E. coli* induzieren demnach Apoptose bei infizierten Enterozyten, was für die Schleimhautschäden verantwortlich ist (Wada et al., 1997).

Shiga Toxin von *Shigella dysenteriae* und Shiga-ähnliches Toxin von enterohämorrhagischen *E. coli* verursachen Apoptose in differenzierten, absorbierenden Zellen des Zottenepithels im Darm von Kaninchen (Keenam et al., 1986).

Shigellen Spezies verursachen bakterielle Dysenterie beim Menschen, indem sie die Epithelzellen der Dickdarmschleimhaut befallen und in sie eindringen, was zu Schädigung der Epithelzellen des Dickdarmes und zu Entzündung der Schleimhaut führt. Die akute Phase der Entzündung durch Shigellosis ist sowohl durch ansteigenden Zellumsatz in der Lamina propria und im Epithel, als auch durch Apoptose der Makrophagen der Lamina propria gekennzeichnet. *Shigella flexneri* induziert die Apoptose dieser infizierten Makrophagen (Zychlinsky et al., 1992; Zychlinsky et al., 1994).

Das Anaerobierbakterium *Clostridium difficile* (*Cl. difficile*) ist an der Ätiologie der pseudomembranösen Kolitis des Menschen maßgeblich beteiligt, zudem wird es als häufige Ursache einer Antibiotika-induzierten Diarrhoe diskutiert. Auch bei der Kolitis X des Pferdes wird der idiopathische Auslösemechanismus durch Arzneimittelgabe diskutiert. Besonders bei Gabe von Antibiotika kann es nachfolgend zur Dysbiose des Darmes mit einem vermehrten Wachstum von *Cl. difficile* kommen (Schiefer, 1981; Zhao et al., 2003). Dabei produzieren toxinbildende Stämme des *Cl. difficile* mindestens zwei große Einzel-Ketten-Protein Exotoxine, Toxin A und Toxin B, die an der Pathogenese der Antibiotika-vermittelten Diarrhoe und Kolitis beteiligt sind (Lonnroth & Lange, 1983). Toxin A löst Hypersekretion der Darmepithelzellen und damit Diarrhoe bei Mäusen aus (Lonnroth & Lange, 1983). Darmzellen *in vitro*, die dem Toxin B ausgesetzt sind, werden apoptotisch und zeigen Kernspaltung und Kondensation des Chromatins (Fiorentini et al., 1998). Auch Darmzellen in

Organkulturen menschlicher Kolonbiopsien, die dem Toxin A ausgesetzt sind, zeigen Abrundung der Epithelzellen, Ablösung aus dem Zellverband und Apoptose (Mahida et al., 1996). Toxin A ist zudem in der Lage bei Makrophagen und T-Lymphozyten der Lamina propria direkt Apoptose *in vivo* auszulösen (Mahida et al., 1998). Erkrankungen des Kolons durch *Cl. difficile* werden möglicherweise durch Toxin A vermittelte Apoptose von Epithelzellen nach der Zellablösung von der Basalmembran ausgelöst (Mahida et al., 1996). Infolge der Apoptose der Makrophagen und T-Lymphozyten wird zusätzlich das Immunsystem der Kolonschleimhaut geschwächt (Mahida et al., 1998).

Über die Beteiligung von *Cl. difficile* und *Cl. perfringens* an Kolitis X, Diarrhoe und Koliken im Allgemeinen bei Pferden existieren einige Studien (siehe Kapitel II., Punkt 2.), jedoch gibt es keine Untersuchungen inwieweit oder ob *Cl. perfringens* Einfluss auf die Apoptose-Rate der Darmschleimhaut des Pferdes hat. Auch die oben beschriebene Beteiligung des *Cl. difficile* an der Apoptose von Darmepithelzellen bezieht sich auf andere Spezies als das Pferd.

5.6.3. Endoparasiten und Apoptose

Apoptose spielt bei der Interaktion zwischen Wirt und Parasit eine wichtige Rolle. Parasiten können, in Abhängigkeit von den verschiedenen Zelltypen des Wirtes, einerseits Apoptose verhindern oder sie andererseits induzieren (DosReis & Barcinski, 2001). Hohe Apoptose-Raten zeigen Wirtszellen und hier vor allem Zellen des Immunsystems bei einigen Protozoen- und Helminthen-Infektionen (Friend et al., 2000; Gavrilescu & Denkers, 2003).

Das Protozoon *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) ist dafür bekannt, persistierende Diarrhoe und Gewichtsverlust bei Kindern, Jungtieren und Aidskranken hervorzurufen. Die Infektion mit *C. parvum* führt zu der bei der Apoptose typischen Kern-Kondensation und DNA-Spaltung in den Wirtszellen. Da beides durch den Einsatz von Kaspase-Inhibitoren verhindert werden kann, sind wahrscheinlich Kaspasen an dieser Apoptose beteiligt (Ojcius et al., 1999). Die Apoptose von Darmepithelzellen durch *C. parvum* wird auch über einen Fas-FasL-abhängigen Mechanismus vermittelt (Gavrilescu & Denkers, 2003).

In vielen Fällen ist der Zelltod, der mit Protozoen-Infektionen einhergeht, ein Ergebnis der Effekte der Entzündungsmediatoren des Wirtes, wie z.B. Zytokine. Gavrilescu & Denkers (2003) zeigten, dass bestimmte Faktoren, die von den Protozoen gebildet werden, direkt die Apoptose-Kaskade in den Zielzellen auslösen. Sie fanden heraus, dass *Entamoeba histolytica* Kontakt-abhängige Apoptose in Epithelzellen *in vitro* auslöst.

Andererseits besteht die Möglichkeit, dass einige Protozoen als Apoptose-Suppressoren fungieren. So sind z.B. mit *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) infizierte Makrophagen resistent gegenüber vielen Apoptoseauslösemechanismen (Nash et al., 1998; Goebel et al., 2001). Dies geht mit erniedrigter Kaspasen-Aktivierung und mit reduzierten Spiegeln von PARP einher (Goebel et al., 2001). Es handelt sich zum größten Teil um Kaspase-3, die von *T. gondii* blockiert wird (Sinai et al., 2004). Aber auch die Cytochrom C-Abgabe aus den Mitochondrien infizierter Zellen wird durch *T. gondii* verhindert, wahrscheinlich durch die Aktivierung von Mitgliedern der anti-apoptotischen Bcl-2 Familie (Sinai et al., 2004). Die Infektion mit *T. gondii* resultiert in einer Blockade der Apoptose bei infizierten Zellen, indem verschiedene Schritte der Rezeptor-vermittelten wie auch der mitochondrial vermittelten Apoptose verhindert werden (Sinai et al., 2004). Liesenfeld et al. (1997) dagegen zeigten, dass Infektion mit *T. gondii* mit einem Anstieg der Apoptose-Rate bei den T-Lymphozyten der Peyer'schen Platten des Dünndarmes von Mäusen einhergeht, was zu einer Abnahme der T-Lymphozyten führt. Dabei kommt es zu einer erhöhten Fas Expression, die von monoklonalen anti-gamma Interferon (IFN-gamma) Antikörpern verhindert wird. Gleichzeitig wird dadurch das Auftreten von Apoptose bei den T-Lymphozyten verhindert (Liesenfeld et al., 1997).

Andere Protozoen, wie z. B. *Eimeria necatrix* und *Eimeria tenella*, infizieren Dün- und Blinddarmepithelzellen und verhindern den Zelltod der Wirtszelle, indem sie bestimmte Faktoren, welche die Apoptose auslösen, blockieren bzw. anti-apoptotische Faktoren unterstützen (del Cacho et al., 2004).

Auch der Befall mit Helminthen kann je nach Pathogenität und Anzahl des Parasiten wie auch in Abhängigkeit der Dauer der Infestation zu Magen-Darmproblemen und Diarrhoe führen.

Bei Ratten, die mit dem Nematoden *Nippostrongylus brasiliensis* infiziert wurden, beobachtet man eine signifikante Zottenatrophie 10 Tage post infectionem und diese ist mit einem deutlichen Anstieg der Apoptose bei den Epithelzellen der Zotten vergesellschaftet (Hyoh et al., 1999). Diese Zottenatrophie geht ebenso mit einem signifikanten Anstieg der Kaspasen-3 Spiegel in den Darmepithelzellen einher, was den Schluss zulässt, dass Kaspase-3 eine wichtige Rolle bei der durch Nematoden induzierten Apoptose von Darmepithelzellen spielt (Hyoh et al., 2002).

5.7. Apoptose ausgelöst durch Toxine

Bestimmte Gifte können speziell auf den Magen-Darm-Trakt toxisch wirken. So bewirkt z.B. das Alkaloid der Herbstzeitlose Colchicin enterotoxisch bedingte Läsionen in der Darmschleimhaut und diese stehen mit der Apoptose von Epithelzellen in Zusammenhang. Die meisten Säugetiere entwickeln bei einer Vergiftung mit Colchicin eine Diarrhoe (Yamada et al., 2000).

5.8. Apoptose ausgelöst durch Medikamente

Viele Arzneimittel rufen Nebenwirkungen im Magen-Darm-Trakt hervor, häufig sind dies Diarrhoe, Obstipation, Übelkeit und/oder Erbrechen. Bei der Pathologie der iatrogen ausgelösten Erkrankungen ist vieles noch weitgehend ungeklärt. Histologisch kann man bei diesen oft ulzerativen Erkrankungen vermehrt Apoptose und erhöhte Infiltration des Gewebes mit eosinophilen Granulozyten und IEL beobachten (Price, 2003). Bei Menschen mit Läsionen des Kolon, die durch Gabe von Arzneimitteln, insbesondere von NSAIDs ausgelöst wurden, findet man einen signifikanten Anstieg der epithelialen Apoptose-Rate (Lee, 1993). Die Gabe von Phenylbutazon, einem NSAID, induziert die Apoptose der Schleimhautepithelzellen der rechten dorsalen Kolonlage bei Pferden (Richter et al., 2002).

Auch bei Gabe von Antibiotika kann es zu Diarrhoe kommen. Meistens verändern die Antibiotika die physiologische Darmflora und es kommt zu einem Überwuchern mit *Clostridium difficile*, dessen Toxine an der Induktion der Apoptose der Schleimhautepithelzellen beteiligt sind (siehe Kapitel II., Punkt 5.6.2.). Bei Hamstern kann die Gabe von Clindamycin eine Enterokolitis auslösen, wobei hohe Konzentrationen von *Cl. difficile* und dessen Toxin gefunden wurden (Chang et al., 1978).

Eine häufige Nebenwirkung bei der Anti-Tumor-Therapie des Menschen ist chronische Diarrhoe. Irinotecan, ein gegen viele Tumorerkrankungen wirksames Chemotherapeutikum, löst charakteristische Veränderungen des Dünndarmepithels aus, die mit Vakuolenbildung und ansteigender Apoptose-Rate einhergehen (Ikuno et al., 1995). Ein signifikanter Anstieg der Apoptose-Rate kommt auch bei Ticlopidine-vermittelter Kolitis vor (Berrebi et al., 1998).

5.9. Apoptose im Magen-Darm-Trakt ausgelöst durch Bestrahlung

Die Empfindlichkeit der proliferierenden Epithelzellen der Krypten macht den Darm zu einem limitierenden Faktor beim Einsatz von Radiotherapie bei der Behandlung abdominalen Krebses. Als Antwort auf die ionisierende Bestrahlung verlieren die post-mitotischen Epithelzellen der Dünndarmkrypten bei ihrer Wanderung von den Darmkrypten zur Basis der angrenzenden Zotten sehr schnell ihre Fähigkeit, durch Apoptose abzusterben. Die Zellen der Krypten reagieren folglich empfindlicher auf durch Bestrahlung ausgelöste Apoptose, wobei die Epithelzellen der Zotten eine Resistenz gegen ionisierende Bestrahlung bezüglich der Apoptose zeigen. Sehr kleine Bestrahlungsdosen können die Apoptose-Rate in den Stammzellen der Krypten erhöhen. Dabei ist das Onkoprotein p53 beim Erkennen der durch Bestrahlung ausgelösten Schäden beteiligt und leitet die Apoptose ein (Coopersmith & Gordon, 1997). Diese Apoptose spielt im Darm eine wichtige Rolle in Bezug auf die Homöostase und den Schutz vor Karzinogenese, indem sie die potentiell karzinogen geschädigten Zellen entfernt (Potten et al., 1994).

Eine neuere Studie zeigte, dass Stammzellen der Krypten 4 Tage nachdem sie ionisierenden Strahlen ausgesetzt waren, einen dosisabhängigen Anstieg an apoptotischen Zellen aufweisen. Dieser Vorgang ist in transgenen PARP $-/-$ Mäusen signifikant verstärkt. Folglich stellt PARP einen Überlebensfaktor für Stammzellen des Darmes *in vivo* dar (Ishizuka et al., 2003).

5.10. Stickstoffmonoxid (NO) und Apoptose im Magen-Darm-Trakt

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiges Molekül mit verschiedenen Aufgaben, das mit großem Interesse bezüglich seiner Rolle bei der Regulation der Apoptose untersucht wird. Bei über einen Zeitraum von 18 Stunden gefasteten Ratten wird die NO Synthese für die ansteigende Apoptose im Schleimhautepithel des Magens verantwortlich gemacht (Cao et al., 2000). Auch wurde gezeigt, dass NO Apoptose in Zellen wie Makrophagen und T84-Zellen (menschliche Darmepithelzellkultur) auslöst (Sandoval et al., 1997), aber bei anderen Zellen die Apoptose verhindert (Kim et al., 1997).

NO hat einen Apoptose-verhindernden Effekt, indem es die Kaspasen durch S-Nitrosylation hemmt (Mohr et al., 1997; Dimmeler et al., 1997; Melino et al., 1997; Rossig et al., 1999), und NO verhindert ebenfalls die durch Fas ausgelöste Apoptose *in vitro* (Mannick et al., 1997). Dabei wird auch die Fas-induzierte Spaltung von PARP durch Mitglieder der Kaspasen Familie der Cystein-Proteasen unterbunden (Mannick et al., 1997).

NO hemmt die Respiration von Darmepithelzellen in Kultur reversibel und erhöht die Bcl-2 Spiegel. Da Bcl-2 ein anti-apoptotisches Protein ist, könnte dessen Erhöhung die Enterozyten gegenüber toxischen NO-Effekten schützen. Folglich könnte NO seine antibakterielle Tätigkeit im anaeroben Darmlumen effektiv entfalten, ohne bei den mit Bcl-2 angereicherten Schleimhautepithelzellen Apoptose auszulösen (Nishikawa et al., 1998).

Kaspase-3-Aktivierung fördert die Spaltung von Bcl-2 ebenso wie die Cytochrom C-Abgabe aus den Mitochondrien, und dies kann dann zu weiterer Kaspasen-Aktivierung führen. NO blockiert die Kaspasen-3-Aktivierung und verhindert somit die Cytochrom C-Abgabe aus den Mitochondrien ebenso wie die Bcl-2-Spaltung und damit die Apoptose der Zellen (Kim et al., 1998).

Leist et al. (1999) zeigten, dass NO die Ausführung der Apoptose an zwei unterschiedlichen ATP-abhängigen Schritten stromauf- und stromabwärts der mitochondrialen Cytochrom C-Abgabe verhindert. Die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien wird verzögert und das Fortschreiten der Prokaspasen-3 und -7 zu ihrer aktiven Protease wird selbst nach Abgabe von Cytochrom C verhindert.

5.11. „Apoptotic colonic disease“

Im Jahr 2001 wurde erstmals von einer bis dato noch nicht bekannten Dickdarmerkrankung eines Primaten berichtet, der an chronischer, unstillbarer Diarrhoe tödlich erkrankte. Das einzige patho-histologische Kennzeichen der Erkrankung stellten Anhäufungen intraepithelialer apoptotischer Granula in den Krypten der Dickdarmschleimhaut dar (Rubio et al., 2001). Aufgrund dieser markanten Apoptose wurde die Erkrankung „Apoptotic colonic disease“ genannt (Rubio et al., 2001). Ein Jahr später fand man ähnliche klinische und histologische Befunde erstmals bei einem Menschen (Rubio & Jacobsson, 2001).

5.12. Apoptose im Zusammenhang mit Darmresektion

Nach einer Darmresektion finden im Darm Anpassungsvorgänge an die veränderte Situation statt. Diese zeigen sich unter anderem in veränderten Apoptose- und Proliferations-Raten. Bei Kaninchen sieht man sehr bald nach Resektion einen Anstieg der Proliferation in den Darmkrypten, gefolgt von einer ansteigenden Apoptose-Rate, sowohl in den Krypten, als auch an den Zotten. Die Darmresektion resultiert in einer erhöhten Anzahl von Enterozyten in den verbliebenen Darmabschnitten (Thompson & Barent, 1999). Auch bei Mäusen konnte nach

Dünndarmresektion ein Anstieg der Proliferations-Rate und ein starker Anstieg der Apoptose-Rate im verbleibenden Ileum nachgewiesen werden (Helmrath et al., 1998). Diese erhöhte Apoptose-Rate der Enterozyten wird durch die Gabe von EGF reduziert. EGF modifiziert hierbei die Expression der Proteine der Bcl-2 Familie, indem es Bax verringert und Bcl_w erhöht (Stern et al., 2000). Fishbein et al. (2004) zeigten, dass die erhöhten Apoptose-Raten bei Dünndarmtransplantationen bei Ratten in Zusammenhang mit Ischämie-Reperfusion stehen, die bei diesem Eingriff stattfindet.

6. Nachweis der Apoptose

6.1. Nachweis der morphologischen Merkmale

Mit einem Elektronenmikroskop lassen sich die unter Kapitel II., Punkt 3.2. beschriebenen zellulären Veränderungen nachweisen. Aber auch mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie bzw. der Konfokalen Mikroskopie können die Chromatinkondensation und die Kernbruchstücke in Propidium-Iodid gefärbten Präparaten erkannt werden. In beiden Fällen handelt es sich allerdings um rein qualitative Nachweise, die keine Rückschlüsse auf die prozentualen Verhältnisse zulassen.

6.2. Nachweis der biochemischen Merkmale

6.2.1. TUNEL-Methode

Ein relativ frühes Ereignis während der Apoptose ist die Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen (endogene DNA'sen). Die Endonuklease spaltet die DNA an spezifischen Stellen (Wyllie, 1980). Eine detaillierte Analyse konnte zeigen, dass der Prozess an der Kernperipherie beginnt und insgesamt relativ kurz ist, d.h. zwischen 1 und 3 Stunden vom Beginn bis zur Zellelimination dauert (Gavrieli et al., 1992). DNA-Fragmentierung in den Epithelzellen des Dünndarmes *in vivo* kann der Zellelimination allerdings auch Stunden bis Tage vorausgehen (Pompeiano et al., 1998). Eine andere Studie zeigte allerdings, dass die DNA-Fragmentierung ein eher spätes Ereignis der Apoptose bei Zellen *in vitro* darstellt (Collins et al., 1997).

Bei diesem Prozess entstehen charakteristische Bruchstücke mit 180-200 bp (base pairs) (Wyllie, 1980). Weiterhin entstehen dabei spezifische DNA-Fragment-Enden, die 3'-OH-

Enden. Diese erhalten durch die Assoziation der core-DNA mit den Histonmolekülen ihre Stabilität. Im Gegensatz dazu erfolgt die DNA-Verdauung bei der Nekrose durch die Aktivierung unspezifischer Proteasen zufallsbedingt (=“random-digest“).

Die bei der Fragmentierung entstehenden Nukleosomen-Monomere und -Multimere lassen sich als typische DNA-Leiter auf einem Agarose-Gel darstellen (Wyllie, 1980). Besteht die Probe aus nekrotischem Material, zeigt sich bei elektrophoretischer Auftrennung auf dem Gel ein sogenanntes Schmiermuster. Daher ist das Muster der typischen DNA-Leiter der internukleosomalen DNA-Fragmentierung eines der biochemischen Kennzeichen der Apoptose (Kiechle & Zhang, 1998). Obwohl diese Methode eine eindeutige Abgrenzung zwischen Nekrose und Apoptose ermöglicht, ist sie mit einer Vielzahl von Nachteilen behaftet. Einerseits benötigt man relativ viel Material, wobei das Ergebnis aber nicht quantifizierbar ist, andererseits ist eine Bestimmung der apoptotischen Zellpopulation in inhomogenem Gewebe nicht möglich (Haunstetter & Izumo, 1998).

Die Anwesenheit von typischen DNA Bruchstücken mit 3'-OH-Enden ist ein Merkmal von apoptotischen, nicht jedoch von nekrotischen Zellkernen. Die Spezifität der *in situ*-Färbung von 3'-OH-Enden bei apoptotischen Zellkernen lässt apoptotische Zellen, die in dieser Art gefärbt sind, gut von Zellen mit nicht-apoptotischer DNA-Schädigung unterscheiden (Didenko & Hornsby, 1996). Dementsprechend hat sich die TUNEL-Technik als Methode der Wahl zur Darstellung der Apoptose durchgesetzt. Bei diesem Verfahren werden die Gewebeschnitte entsprechend dem unter Kapitel III., Punkt 3.2.1. beschriebenen Protokoll behandelt. Dabei werden die 3'-OH-Enden der DNA-Fragmente mit Hilfe einer terminalen Deoxynucleotidyl-Transferase mit Digoxigenin-Nukleotiden und Fluoreszein markiert (Schmitz et al., 1991) und die apoptotischen Kerne in einem zweiten Schritt mit einem fluoreszierenden Kernfarbstoff sichtbar gemacht (Gavrieli et al., 1992).

Da normale, nicht-apoptotische Zellen nur sehr wenige freie 3'-OH-Enden enthalten, erlaubt diese *in-situ*-Technik eine genaue Lokalisation des programmierten Zelltodes auf zellulärer Ebene. Auch für den Nachweis der Apoptose an Epithelzellen des Magens (Yao et al., 1998; Houghton et al., 1999) und des Darmes (Gavrieli et al., 1992; Coopersmith & Gordon, 1997; Wada et al., 1997; Guy-Grand et al., 1998; Pompeiano et al., 1998) ist diese Methode gut einsetzbar.

Häufig kombiniert man diese Färbung mit anderen Zell-spezifischen Markern in mehrfach-markierten Schnitten, wodurch eine genaue Zuordnung und Quantifizierung von apoptotischen Zellen (bzw. Zellkernen) im Gewebeverband möglich ist.

6.2.2. Immunhistochemie

Neben diesen häufig eingesetzten Methoden gewinnt der Nachweis der Kaspasenaktivierung immer mehr an Bedeutung. Beispielsweise lassen sich die Aktivierung der Kaspase-3, sowie die Spaltung der Kaspasensubstrate Lamin A, Lamin B1 und PARP mittels spezifischer Antikörper histologisch bestimmen (Schaper et al., 1999; Saraste & Pulkki, 2000; Freude et al., 2000).

Die proteolytische Spaltung der Lamine *in vivo* ist für das normale Fortschreiten der Apoptose erforderlich (Rao et al., 1996). Es wird angenommen, dass die Lamine eine große funktionelle Rolle bei der Anordnung des Chromatins entlang der Kernperipherie spielen (Lazebnik et al., 1995a). Die Spaltung der Lamine ist nötig, um die Lamin-Chromatin-Interaktionen zu unterbrechen. Dabei wird das Chromatin frei und kann in viele apoptotische Körperchen gepackt werden (Lazebnik et al., 1995a). Auch die Ergebnisse einer anderen Studie unterstreichen dies dadurch, dass ohne vorherige Spaltung der Lamine die DNA-Fragmentierung ausbleibt. Die DNA-Fragmentierung scheint also von der Spaltung der Lamine abhängig zu sein (Rao et al., 1996). Während der Ausführungsphase der Apoptose agieren mehrere biochemische Wege parallel. Es treten drei verschiedene Aktivitäten auf, die PARP-Proteinase, die Lamin-Proteinase und die Fragmentierungs-Nuklease (Lazebnik et al., 1995a). PARP wird sehr früh während des Prozesses der Apoptose gespalten, während die Lamine später und durch eine andere Protease gespalten werden (Lazebnik et al., 1995b). Eine neuere Studie identifizierte diese Proteasen. So wird PARP von Kaspase-3 gespalten, wohingegen Lamin A von Kaspase-6 gespalten wird (Takahashi et al., 1996).

Dies bedeutet, dass Lamin-positive Zellkerne eine intakte innere Kernhülle besitzen und somit nicht die Apoptose-Kaskade durchlaufen, wohingegen Lamin-negative Zellkerne apoptotisch sind. Auch hier ist eine genaue Zuordnung und Quantifizierung der Lamin- oder PARP-negativen Zellen bzw. Zellkerne und damit eine Aussage darüber, ob sich die Zellen in der Apoptose-Kaskade befinden, möglich. Da diese Methode einem anderen Prinzip als die TUNEL-Methode unterliegt, stellt sie eine gute Ergänzung dar.

7. Nekrose

7.1. Definition

Den passiven, energieunabhängigen Zelltod durch externe Faktoren nannte Bessis (1958) zufälligen (accidental) Zelltod.

Unter Nekrose versteht man den vorzeitigen Zelltod in einem erkrankten Organismus, also ein pathologisches Ereignis. Der Zelltod kann sowohl durch Viren und Bakterien, als auch durch mechanische oder ischämische Schädigungen ausgelöst werden und endet in der Nekrose. Während bei einer Nekrose Gruppen membrangeschädigter Zellen lysieren, führt die Apoptose zum Absterben einzelner Zellen.

Da es sich bei der Nekrose um einen Zustand nach Eintritt des Zelltodes handelt, schlugen Majno & Joris (1995) den Begriff Onkose (griech. onkos = Schwellung) für den mit Schwellung der Zelle einhergehenden Zelltod während der Ischämie vor. Dabei führt die Onkose mit begleitender Kernauflösung zur Nekrose und steht im Gegensatz zur Apoptose, die mit Kernfragmentierung und Schrumpfung der Zelle allenfalls zur sekundären Nekrose führt (Majno & Joris, 1995).

7.2. Ablauf und Morphologie

Die Nekrose wird typischerweise durch Prozesse während der Ischämie ausgelöst (Majno & Joris, 1995). In Abhängigkeit von der Dauer der Ischämie kommt es nach anfänglichen reversiblen Veränderungen zu irreversiblen Schädigungen der Zellmembran, die infolge dessen den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt der Zelle nicht mehr kontrollieren kann. Dies führt zu einer deutlichen Schwellung der Zelle und der Zellorganellen mit anschließender Ruptur der Membranen (Buja et al., 1993; Majno & Joris, 1995).

Aufgrund der Schwellung der Zelle und der Zellorganellen ist die Nekrose unter dem Lichtmikroskop eindeutig zu erkennen. Insbesondere die Mitochondrien zeigen eine deutliche Schwellung und eine Fragmentierung der Cristae. Auch die Kerne sind irreversibel geschädigt. Das Chromatin ist stark „verklumpt“ und mit fortschreitender Nekrose lösen sich die Kerne auf (Karyolyse). Weiterhin kann man das sogenannte „blebbing“ beobachten. Es handelt sich hierbei um flüssigkeitsgefüllte Bläschen, die sich von der Zelle ablösen und zerplatzen. Diese „blebs“ sind typisch für den ischämischen Zelltod (Majno & Joris, 1995).

Die Nekrose ist durch die massive Freisetzung von Botenstoffen und das Auftreten innerhalb des Zellverbandes immer von einer Entzündungsreaktion begleitet, wobei Phagozyten die Reste der nekrotischen Zellen entfernen.

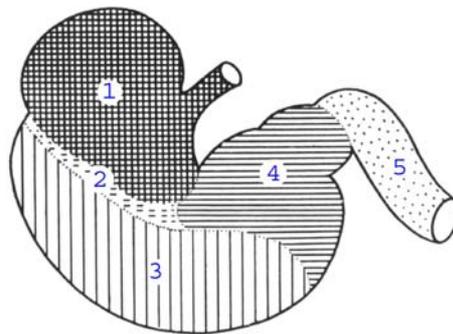
III. Material und Methoden

1. Material

In dieser Studie wurde der Magen-Darm-Trakt von sechs gesunden, adulten Pferden und von drei Fohlen untersucht. Die Schleimhautproben der adulten Pferde wurden am Schlachthof in Gießen entnommen. Die adulten Tiere waren zwischen 4 und 30 Jahre alt und zwischen 300 und 650 kg schwer. Bei den Fohlen handelte es sich um Patienten der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der JLU Gießen. Die Schleimhautproben der Fohlen wurden nach Euthanasie oder Tod der Tiere entnommen. Die Fohlen waren zwischen 7 Tage und 20 Tagen alt. Es wurden nur Tiere beprobt, deren Magen-Darm-Trakt makroskopisch und mikroskopisch unauffällig war.

Von dem jeweiligen Magen- bzw. Darmabschnitt wurden drei verschiedene Lokalisationen ausgewählt. Am Magen wurden Gewebeproben von Margo plicatus, Fundus und Pylorus verwendet (siehe Abb. 7), am Dünndarm wurden Duodenum, Jejunum und Ileum unterschieden und am Dickdarm fanden Caecum, Colon ascendens und Colon descendens Verwendung (siehe Abb. 8).

Abb. 7: Schematische Darstellung des Pferdemagens modifiziert nach Nickel (1995).



1 = Pars nonglandularis

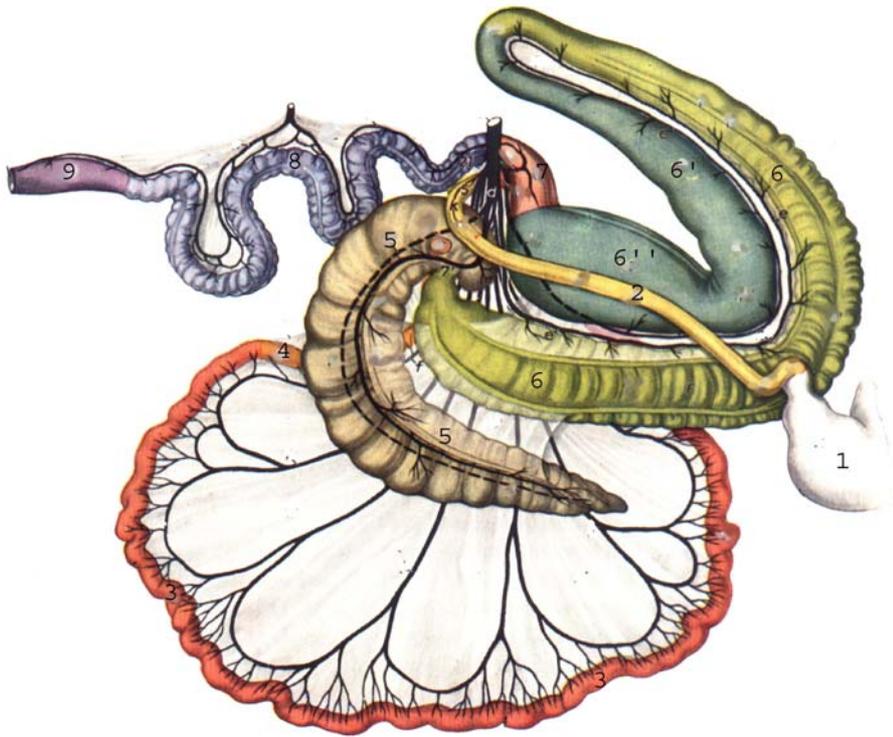
2 = Margo plicatus

3 = Fundus

4 = Pylorus

5 = Duodenum

Abb. 8: Schematische Darstellung des Pferdedarms modifiziert nach Nickel (1995).



1 = Magen

2 = Duodenum

3 = Jejunum

4 = Ileum

5 = Caecum

6 = Colon ascendens (Ventralslage)

6' = Colon ascendens (Dorsalslage)

6'' = Colon ascendens (Dorsalslage) = Magenähnliche Erweiterung

7 = Colon transversum

8 = Colon descendens

9 = Rectum

1.1. Entnahme und Aufbereitung der Gewebeproben

Mit der Gewinnung der Gewebeproben der adulten Tiere konnte begonnen werden, wenn die Tiere nach Ausbluten und Häuten ausgeweidet wurden und somit der Magen-Darm-Trakt vorlag. Die Zeitspanne vom Tod der Tiere bis zur Probenentnahme betrug aufgrund dieser technischen Gegebenheiten ungefähr 30 Minuten. Daher wurde von dem jeweiligen Pferd entweder Magen, Dünn- oder Dickdarm verwendet, um autolytische Artefakte so gering wie möglich zu halten.

Bei den Fohlen konnte mit der Probenentnahme sofort nach deren Tod begonnen werden und demnach wurde immer der gesamte Magen-Darm-Trakt pro Individuum verwendet. Bei autolytischen Prozessen wurde das entsprechende Gewebeteil später von der Beurteilung ausgeschlossen.

Von jedem Magen- oder Darmabschnitt wurden jeweils zwei bis drei Proben entnommen.

Die Gewebestücke wurden mit einem Skalpell in Stücke von circa 1 x 1 cm Größe geschnitten und senkrecht an einer in einem Stückchen Kork (1,6 x 1,6 x 0,2 cm) fixierten Kanüle auf einen Tropfen Tissue Tec (O.T.C. Compound 4583, Plano; Wetzlar, Deutschland) aufgestellt. Danach wurde das Gewebe dünn mit Tissue Tec bedeckt und unverzüglich in Methylbutan (Merck Labor und Chemie Vertrieb, Fa. Fischer; Frankfurt a. M., Deutschland) bei -130°C schockgefroren. Das rasche Auspolymerisieren des Tissue Tec bei tiefen Temperaturen führt zu einer stabilen Fixierung des Gewebes und bietet gleichzeitig einen Schutzmantel beim späteren Schneiden der Proben. Das Methylbutan wurde in einem Becher in flüssigem Stickstoff (-196°C) gekühlt. Die geeignete Temperatur des Methylbutans war erreicht, wenn sich am Boden des Bechers eine feste Schicht von ein bis zwei Zentimetern Dicke gebildet hat. Danach wurden die Gewebeproben bei -80°C aufbewahrt.

2. Methoden

2.1. Herstellung der beschichteten Objektträger

Für die durchgeführten Versuche wurden ausschließlich beschichtete Objektträger verwendet. Das gründliche Reinigen und Silikonbeschichten der Objektträger ist sehr wichtig, um ein Ablösen der Schnitte während der häufigen Wasch- und Inkubationsschritte zu verhindern. Daher wurden die unbeschichteten Glasobjektträger (Menzel-Superfrost, VWR International; Darmstadt, Deutschland) zuerst mit in Wasser gelöstem Extran TM (Merck Labor und

Chemie Vertrieb; Fa. Fischer) gereinigt und dann gründlich zuerst mit Leitungswasser und anschließend mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) gespült. Danach wurden sie über Nacht im Trockenschrank bei 40°C getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Objektträger für 5 Sekunden in einer 2%igen 3-Aminopropyltriethoxysilane (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) -Lösung (Lösungsmittel: Aceton (Merck Labor und Chemie Vertrieb; Fa. Fischer)) getaucht und nach kurzem Spülen in Aceton und destilliertem Wasser wieder über Nacht getrocknet. Anschließend wurden sie in einem Exsikator aufbewahrt.

Die Lösung zur Beschichtung wurde nach folgender Tabelle hergestellt:

Tab. 1: Beschichtung der Objektträger

1. Becken	196 ml Aceton + 4 ml 2% 3-Aminopropyltriethoxysilane	5 sec eintauchen
2. Becken	200 ml pures Aceton	5 sec eintauchen
3. Becken	200 ml Aqua dest.	5 sec eintauchen
4. Becken	200 ml Aqua dest.	5 sec eintauchen

2.2. Bearbeitung der Proben und Herstellung der Gefrierschnitte

Die für die verschiedenen Färbungen benötigten 6 µm dicken Gefrierschnitte wurden mit einem CM 3000 Kryostaten der Firma Leica (Bensheim, Deutschland) angefertigt.

Die bei -80°C gelagerten Gewebeproben wurden in einer Tüte über flüssigem Stickstoff zum Kryostaten transportiert. Jede Probe wurde mit Tissue Tec auf die vorher beschrifteten Probenhalter aufgeblickt. Hierbei wurde die Probe im Innenraum des Kryostaten mit Tissue Tec auf den Probenhalter vorfixiert und anschließend der Kork komplett mit Tissue Tec bedeckt. Nach dem Transport aus -80°C verblieben die Proben circa fünfzehn Minuten in dem Kryostaten (Temperatur von -26°C bis -30°C), um sich der Temperatur anzupassen, bevor mit dem Schneiden begonnen wurde.

Die Proben wurden dann so lange zugeschnitten, bis ein vollständiger Anschnitt zu erhalten war. Dann wurde jede 100 µm ein Schnitt mit einem Tropfen 1%iger Toluidin-Blau-Lösung (Fluka; Buchs, Schweiz) gefärbt, um eine geeignete Stelle für die Immunhistochemie auszuwählen. Die folgenden Schnitte der gewünschten Stelle des Gewebes wurden in einer Dicke von 6 µm gewonnen und jeweils vorsichtig auf einen bei Raumtemperatur (RT) gelagerten Objektträger aufgefangen, indem man den Objektträger direkt auf den Schnitt auflegt, welcher dann sehr leicht am Objektträger anhaftet. Nachdem die Schnitte 1-2

Minuten bei RT getrocknet waren, wurden sie in Abhängigkeit des jeweiligen Färbeprotokolls entweder in einer 4%igen Formaldehydlösung (PFA 4%) (Merck Labor und Chemie Vertrieb; Fa. Fischer) bei RT und nachfolgender Spülung in PBS oder in Aceton bei -20°C im Kryostaten mit anschließender Trocknung bei RT, fixiert. Ein Schnitt von jeder Gewebeprobe wurde unfixiert aufgehoben und mit Hämatoxin und Eosin gefärbt. Das nicht verwendete Gewebe wurde aufgeblickt bei -80°C gelagert.

2.3. Hämatoxin-Eosin Färbung

Zur Färbung mit Hämatoxin und Eosin (Waldeck GmbH & Co. KG, Division Chroma; Münster, Deutschland) wurden die unter Kapitel III., Punkt 1.1. und Punkt 2.2. beschriebenen Gewebeproben bzw. Gefrierschnitte verwendet. Mit dieser Standardmethode werden die Kernstrukturen durch das alkalische Hämatoxin blau gefärbt. Andere Strukturen erscheinen durch die Färbung mit Eosin in verschiedenen Rottönen. Die Gefrierschnitte wurden ohne Fixation nach folgendem Arbeitsprotokoll bei RT gefärbt.

Tab. 2: Arbeitsprotokoll Hämatoxin-Eosin Färbung

1	Färbung mit Hämatoxin	10 min
2	„Bläuen“ unter fließendem Wasser	4-5 min
3	Spülen mit Aqua dest.	30 sec
4	Färbung mit Eosin	6 min
5	Eintauchen in 95%igen Alkohol	5 x
6	Eintauchen in 100%igen Alkohol	5 x
7	Eintauchen in 100%igen Alkohol	5 x
8	Eintauchen/spülen in Xylol	5-10 min
9	Eindecken mit Entellan (Merck Labor und Chemie Vertrieb; Fa. Fischer)	

3. TUNEL-Methode

Zum Nachweis der Apoptose wurde in dieser Studie unter anderem die TUNEL-Methode (terminal-deoxynucleotidyltransferase mediated d-UTP nick end-labeling) eingesetzt. Diese TUNEL-Methode eignet sich besonders gut für den gezielten Nachweis der Apoptose. Die im Verlauf der Apoptose entstehenden typischen DNA-Fragmente (siehe Kapitel II., Punkt 6.2.1.) werden hierbei mit Hilfe einer terminalen Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) markiert. Diese TdT ist ein Enzym und katalysiert die Bindung der Tetramethyl-rhodamine (TMR) red gekoppelten Nukleotide an die 3'-OH-Enden der DNA-Fragmente. Diese TMR red gekoppelten Nukleotide polymerisieren an den 3'-OH-Enden der DNA-Fragmente. Anschließend können die rot-fluoreszierenden (Extinktion: 617 nm), positiv markierten Kerne mit einem Fluoreszenz-Mikroskop dargestellt werden.

3.1. Material

3.1.1. Gewebe

Zur Bestimmung der TUNEL-positiven Epithelzellen wurden die bei -80°C gelagerten Gewebeproben (siehe Kapitel III., Punkt 1.1.) untersucht und gemäß Kapitel III., Punkt 2.2. bearbeitet.

3.1.2. Kit

Alle Schnitte wurden mit dem *in situ* Cell Death Detection Kit, TMR red der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) nach dem unter Kapitel III., Punkt 3.2.1. beschriebenen Arbeitsprotokoll mit den beiliegenden Reagenzien behandelt.

3.1.3. Phalloidin

Zur Markierung des F-Aktins (Filament-Aktin) der Epithelzelle wurde das als hochgiftiges Pilztoxin des Fliegenpilzes (*Amanita phalloides*) bekannte Phalloidin verwendet. Hierzu wurde das grün-fluoreszierende FITC-gekoppelte Phalloidin (Sigma; Taufkirchen,

Deutschland) auf 1:1000 verdünnt und entsprechend dem Färbeprotokoll (siehe Kapitel III., Punkt 3.2.1.) aufgetragen.

3.1.4. Kernfarbstoffe

Es wurde der Kernfarbstoff 6,6-diamidino-2-phenylindole-dilactate (DAPI) gemäß der Beschreibung unter Kapitel III., Punkt 4.1.3. eingesetzt.

3.1.5. Verbrauchsmaterialien

0,1%iges TritonX

Zur Herstellung des 0,1%igen TritonX wurde TritonX-100 von Sigma verwendet. Es wurde mit 0,1%igem Natriumzitat (Merck Labor und Chemie Vertrieb; Fa. Fischer) hergestellt. 100 ml Aqua dest. wurden in ein Becherglas gegeben und mit 0,1 g Natriumzitat und 100µl TritonX-100 verrührt. Diese Lösung wurde jeweils direkt vor jeder Inkubation frisch hergestellt.

PBS (Phosphate Buffered Saline)

Zur Herstellung der Stammlösung wurden 397,4 g NaCl, 10 g KCl, 10 g H₂PO₄ und 88,75 g Na₂HPO₄ x H₂O (Merck Labor und Chemie Vertrieb; Fa. Fischer) in 5 Litern Aqua dest. aufgelöst.

Für das gebrauchsfertige PBS wurden 500 ml dieser Stammlösung mit Aqua dest. auf 5 Liter verdünnt und anschließend auf einen pH von 7,4 eingestellt.

4% Paraformaldehyd (PFA)

Hierzu wurden unter kontinuierlichem Rühren 40 g Paraformaldehyd (Merck Labor und Chemie Vertrieb; Fa. Fischer) und zwei bis drei Natriumhydroxid-Plätzchen (Merck Labor und Chemie Vertrieb; Fa. Fischer) in einem Liter PBS aufgelöst. Danach wurde der pH auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde das PFA zu jeweils 50 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Mowiol

Mowiol (Calbiochem; Schwalbach, Deutschland) ist sehr schwer löslich. Daher wurden die 50 g Mowiol 16 Stunden lang in 200 ml PBS gerührt. Dann wurden 25 ml dehydriertes

Glyzerin hinzugefügt und weitere 16 Stunden gerührt. Anschließend wurde der Überstand 15 Minuten lang bei 12000 UPM abzentrifugiert und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3.1.6. Mikroskope

Die Quantifizierung der TUNEL-(sowie der Lamin A-)Färbung wurde an einem Leitz DM-RB Fluoreszenz-Mikroskop der Firma Leica durchgeführt.

Die Bilder wurden mit Hilfe des oben genannten Mikroskopes und einer daran angeschlossenen Kamera erstellt. Dabei wurde die von Leica angeschlossene Kamera DFC 280-480 und das dazugehörige Programm, das Leica IM (IM 500), verwendet. Bei dem IM 500 handelt es sich um ein digitales Bildmanagement-System der Leica Microsystems Digital Imaging. Es fand auch die dazugehörige Leica DFC Twain-Software zur Steuerung der Leica DFC Kamera Verwendung.

3.2. Methode

3.2.1. Arbeitsprotokoll der TUNEL-Methode

Für diese Studie wurden Gefrierschnitte aller einzelnen Gewebeproben, wie unter Kapitel III., Punkt 1.1. und Punkt 2.2. beschrieben, gewonnen und entsprechend dem nachfolgenden Protokoll behandelt.

Tab. 3: Arbeitsprotokoll TUNEL-Methode

	Arbeitsschritt	Reagenz	Temp.	Zeit
1	1. Fixierung	PFA	RT	20 min
2	Waschen	PBS	RT	4 x 3 min
3	Brechen der Membranen	TritonX	Auf Eis, 2°C	2 min
4	Waschen	PBS	RT	4 x 3 min
5	1. Inkubation	Kit, TUNEL-Reaktionsgemisch	37°C	1 hr
6	Waschen	PBS	RT	4 x 3 min
7	2. Inkubation	Phalloidin	RT	30 min
8	Waschen	PBS	RT	4 x 3 min
9	3. Inkubation	DAPI	RT	20 min
10	Waschen	PBS	RT	3 x 3 min
11	Eindecken	Mowiol	RT	

RT = Raumtemperatur

Kontrollen

Bei allen Versuchsreihen wurden positive und negative Kontrollen durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde Herzgewebe vom Schwein (Ferkel) verwendet, von dem bekannt war, dass apoptotische Myozytenzellkerne vorhanden sind. So konnte überprüft werden, ob jede einzelne Färbung funktioniert hat. Als Negativkontrolle wurde ein Schnitt des zu untersuchenden Gewebes verwendet. Durch das Weglassen des Enzymes während der 1. Inkubation lassen sich falsch-positive Markierungen nachweisen. Ansonsten wurde die Negativkontrolle wie alle übrigen Schnitte behandelt.

Fixierung

Die Schnitte wurden für 20 Minuten mit 4%igem Paraformaldehyd bei RT fixiert.

Waschen

Nach jedem Arbeitsschritt, also nach Fixierung oder Inkubation, wurden die Schnitte in PBS gewaschen, um Rückstände der zuvor benutzten Substanzen zu entfernen und um die gegenwärtige Reaktion abzustoppen.

Brechen der Membranen

0,1%TritonX-100 = „permeabilisation solution“

Das Brechen der Membranen ist ein notwendiger Vorgang, damit die einzelnen Reagenzien die gewünschten Moleküle im Zellkern erreichen und so die Reaktion stattfinden kann.

1. Inkubation

Direkt vor der Inkubation wurden, je nach Anzahl der Schnitte, ein oder zwei Fläschchen mit der Färbe-Lösung und entsprechend genauso viele Fläschchen mit der Enzym-Lösung aufgetaut. Anschließend wurde von jedem Fläschchen mit der Färbe-Lösung 100µl in ein Eppendorfgefäß abpipetiert und später für die Negativkontrolle verwendet. Dann wurde der Inhalt (50µl) des Fläschchens mit der Enzym-Lösung in das Fläschchen mit der Färbe-Lösung pipetiert und gut gemischt. Anschließend wurden die Schnitte je nach Größe mit zwischen 30µl und 50µl des TUNEL-Reaktionsgemisches beschichtet und in einer feuchten Kammer inkubiert.

2. und 3. Inkubation

Für diese Inkubationen wurden die Aktinfarbstoffe entsprechend ihrer unter Punkt 3.1.3. und die Kernfarbstoffe entsprechend ihrer unter Punkt 4.1.3. angegebenen Verdünnung mit PBS verdünnt. Daraufhin wurde jeder Schnitt mit 50µl der jeweiligen Lösungen beschichtet und in die feuchte Kammer gelegt.

Eindecken

Am Ende jeder Färbung wurden die Schnitte zum Schutz und zur Konservierung eingedeckt. Zum Eindecken wurde ein mit Mowiol bestrichenes Deckgläschen vorsichtig auf den Rand des Objektträgers gesetzt und mit einer Pinzette langsam festgedrückt. Alle eventuellen Luftbläschen unter dem Deckgläschen wurden hierbei durch Druck auf das Deckgläschen entfernt, bevor die Objektträger im Kühlschrank gelagert wurden. Dort polymerisiert das Mowiol aus und gewährleistet einen sicheren Schutz vor Umwelteinflüssen.

3.2.2. Quantifizierung der TUNEL-positiven Epithelzellkerne

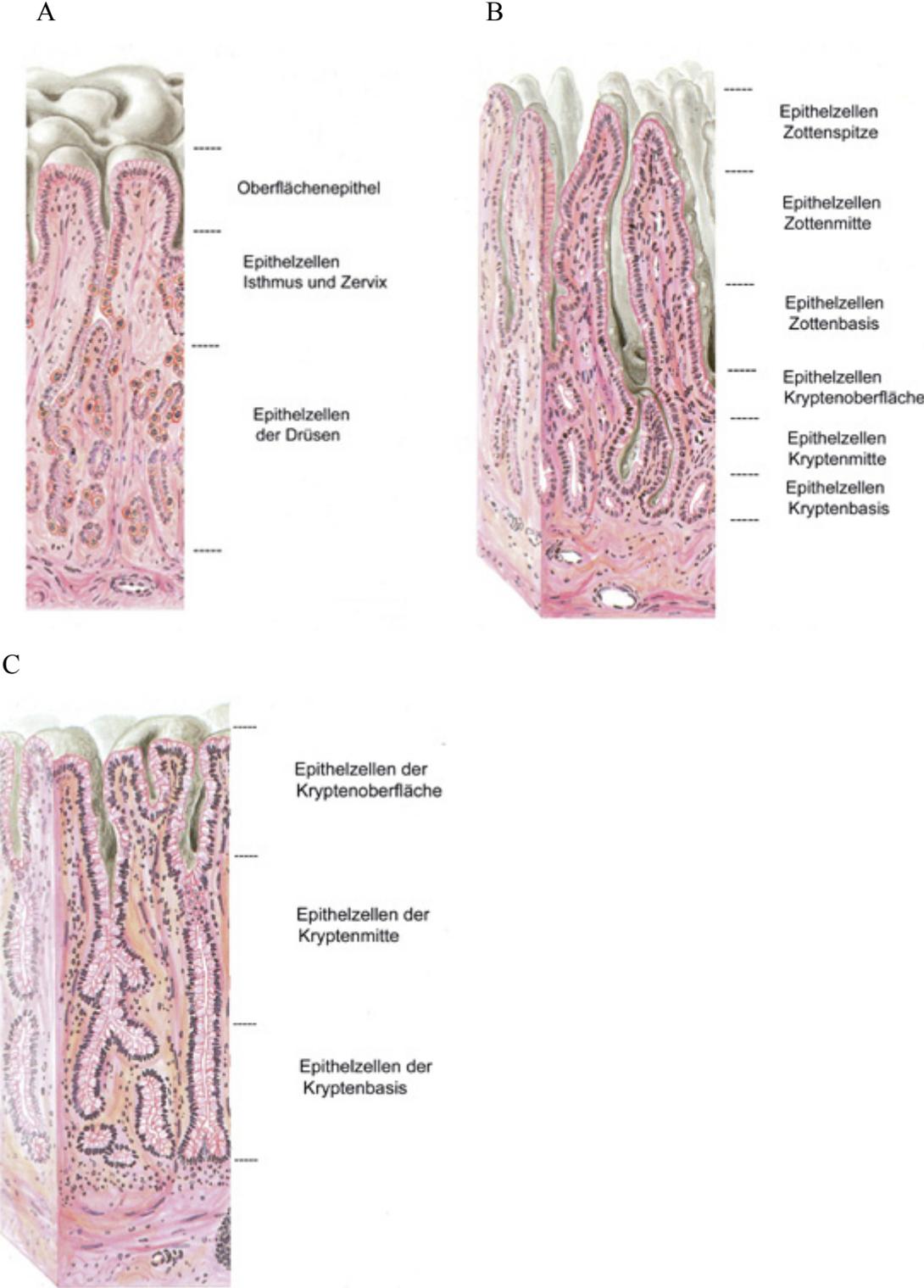
Zur Quantifizierung der nach dem Arbeitsprotokoll der TUNEL-Methode (Kapitel III., Punkt 3.2.1.) mit *in situ* Cell Death Detection Kit, TMR red behandelten Schnitte wurde ein Leitz DM-RB Fluoreszenz-Mikroskop der Firma Leica eingesetzt. Die Präparate werden bei diesem Mikroskop mit Hilfe der Auflichttechnik untersucht. Das Licht wird von einer 100 Watt Quecksilber-Dampf-Lampe (Osram) erzeugt und von oben durch einen spezifischen Filter auf die Objektträger geleitet. Dies führt dort zu einer Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe. Hierbei werden verschiedene Filter verwendet, die nur für Licht einer oder mehrerer spezifischer Wellenlängenbereiche durchlässig sind. Somit können die verschiedenen Fluoreszenz-Farben sowohl separat als auch gemeinsam beurteilt werden.

Das Gewebe wurde bei 250facher Vergrößerung mit einem 25fachen Objektiv und 10fachen Okularen „Periplan GW“ untersucht. Es wurden jeweils nur Schnitte beurteilt, bei denen alle Strukturen weitestgehend erhalten waren. Dabei wurden immer alle Epithelzellen pro Gesichtsfeld betrachtet. Es wurden nur Präparate verwendet, deren Zotten-Krypten-Achse, bzw. Krypten-Achse gut ausgerichtet war. Über den ganzen Schnitt verteilt wurden mindestens 10 Gesichtsfelder ausgezählt. Die Gesichtsfelder wurden zufällig ausgewählt. Die durch den *in situ* Cell Death Detection Kit, TMR red, rot markierten und somit TUNEL-positiven Epithelzellkerne und die Gesamtzahl der Epithelzellkerne pro Gesichtsfeld wurden hierbei erfasst. Weiterhin wurde die Lage der TUNEL-positiven Epithelzellkerne in der Schleimhaut des jeweiligen Magen-Darm-Abschnittes festgehalten (siehe Abb. 9). Die Anzahl der TUNEL-positiven Epithelzellkerne wurde dabei als Mittelwert (+/- Standardabweichung (SD)) angegeben. Die Abgrenzung der Epithelzellkerne wurde durch die Doppelmarkierung mit FITC konjugiertem Phalloidin und DAPI ermöglicht. Es wurden nur Zellen berücksichtigt, die aufgrund der Kernform und -lage sowie des markierten F-Aktins eindeutig als Epithelzellen identifiziert werden konnten.

Im Anschluss wurde der prozentuale Anteil der TUNEL-positiven Epithelzellkerne (TUNEL-pos. Epithz.) der jeweiligen Lokalisation anhand folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ TUNEL-pos. Epithelz.} = \frac{\sum \text{Anzahl der TUNEL-pos. Epithelz.}}{\sum \text{Gesamtzahl der Epithelz.}} \times 100$$

Abb. 9: Schematische Darstellung der Lage der Epithelzellen in der Schleimhaut des Magens (A), des Dünndarms (B) und des Dickdarms (C) modifiziert nach Liebich (1993).



4. Immunhistochemie

4.1. Material

4.1.1. Gewebe

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden die bei -80°C gelagerten Gewebeproben (siehe Kapitel III., Punkt 1.1.) untersucht und gemäß Kapitel III., Punkt 2.2. bearbeitet.

4.1.2. Antikörper

4.1.2.1. Primäre Antikörper

Zur Detektion von spezifischen Proteinen wurden bei den Versuchsreihen verschiedene monoklonale (Wirt: Maus) und polyklonale (Wirt: Ziege oder Kaninchen (Kann.)) Antikörper eingesetzt.

Tab. 4: 1. Antikörper

Antikörper	Klon	Wirt	Verd.	Fixierung	Hersteller
Lamin A	(N-18)	Ziege	1 : 20	*PFA	Santa Cruz (Heidelberg, Deutschland)
Cleaved PARP	(Asp214)(19F4)	Maus	1 : 50	*PFA	Cell Signaling
Lamin B1 (Ab-1)	101-B7	Maus	1 : 20	*PFA	Oncogene (Calbiochem; Schwalbach, Deutschland)
Mouse Anti- Lamin B1	119D5-F1	Maus	0 – 1 : 5	*PFA/Aceton	Serotec (Düsseldorf, Deutschland)
Lamin B2	(C-20)	Ziege	1 : 20	*PFA/Aceton	Santa Cruz

Anti-Active Caspase-3		Kaninchen	1 : 20	Aceton	Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
Cleaved Caspase-3 (17kDa)		Kaninchen	1 : 100	*PFA	Bio Labs (Frankfurt a. Main, Deutschland)
Anti-Human Leucocyte Common Antigen (DAKO-LC)	PD7/26, 2B11	Maus	1 : 50	*PFA/Aceton	Dakopatts (DAKO; Hamburg, Deutschland)
CD45	(Ab-1)	Maus	1 : 50	*PFA/Aceton	Oncogene
Anti-Equine CD11a/CD18	CVS9	Maus	0	*PFA/Aceton	Serotec
Human Desmoplakin 1 & 2	DP2.15	Maus	1 : 100	*PFA/Aceton	Cymbus Biotechnology Ltd
Cytokeratin18 CK 18		Maus	1 : 5	*PFA/Aceton	Immunotech (Hamburg, Deutschland)

*PFA = Paraformaldehyd

4.1.2.2. Sekundäre Antikörper

Die Biotin-konjugierten Sekundärantikörper dieser Studie richten sich jeweils nach dem Wirt der zuvor benutzten Primärantikörper.

Tab. 5: 2. Antikörper

Antikörper	Wirt	Verd.	Hersteller
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG	Esel	1 : 100	Jackson Immuno- Research (Dianova; Hamburg, Deutschland)
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG	Esel	1 : 100	Jackson Immuno- Research
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG	Ziege	1 : 100 bis 1 : 500	Jackson Immuno- Research

4.1.2.3. Detektionssystem

Es handelt sich bei allen Färbungen um sogenannte indirekte Markierungen, das bedeutet, die Fluoreszenzfarbstoffe sind nicht direkt an die Sekundärantikörper gekoppelt. Es fand folgendes Detektionssystem zur Darstellung der gebundenen Sekundärantikörper Verwendung:

Tab. 6: Streptavidin

Bezeichnung	Verd.	Hersteller
Cy2-conjugated Streptavidin	1:100 (1:200)	Rockland (Biotrend; Köln, Deutschland)

Cy2 ist ein sehr stabiles grün-fluoreszierendes Carbocyanin, welches sich mit Hilfe des konjugierten Streptavidins an das Vitamin Biotin bindet. Da das Biotin über vier Bindungsstellen für Streptavidin verfügt, kommt es bei Einsatz der Streptavidin-Biotin-Methode zur Intensivierung der Fluoreszenz.

4.1.3. Kernfarbstoffe

Die Zellkerne wurden mit verschiedenen Kernfarbstoffen dargestellt.

Tab. 7: Kernfarbstoffe

Bezeichnung	Verd.	Hersteller	Farbe / Wellenlänge
Propidium-Iodid	1:1000	Fa. Molecular Probes (AA Leiden, Holland)	Rot / 617 nm
DAPI*	1:1000	Fa. Molecular Probes	Blau / 416 nm

*DAPI = 6,6-diamidino-2-phenylindole-dilactate

Bei den beschriebenen Kernfarbstoffen handelt es sich ausschließlich um Fluoreszenzfarbstoffe, die sich spezifisch an die DNA der Zellkerne binden.

Die mit Lamin A-Antikörpern markierten Schnitte wurden dabei mit Propidium-Iodid gefärbt, welches beim Pferd im Gegensatz zu anderen Spezies sehr stabil ist, nicht ausbleicht, und somit zur Quantifizierung geeignet war.

Die mit der TUNEL-Methode behandelten Schnitte wurden mit dem besonders stabilen DAPI gefärbt. Dieser Farbstoff eignet sich bei allen Spezies besonders gut für die Quantifizierung bei Dreifachmarkierungen, da die blaue Fluoreszenz einen deutlichen Kontrast zu den verwendeten roten und grünen Markierungen zeigt.

4.1.4. Verbrauchsmaterialien

Weiterhin wurde bei den Versuchen PBS, 4%iges Paraformaldehyd und Mowiol gemäß der Beschreibung unter Kapitel III., Punkt 3.1.5. verwendet.

4.1.5. Mikroskope

Es wurde das Mikroskop wie unter Kapitel III., Punkt 3.1.6. beschrieben, eingesetzt.

4.2. Methoden

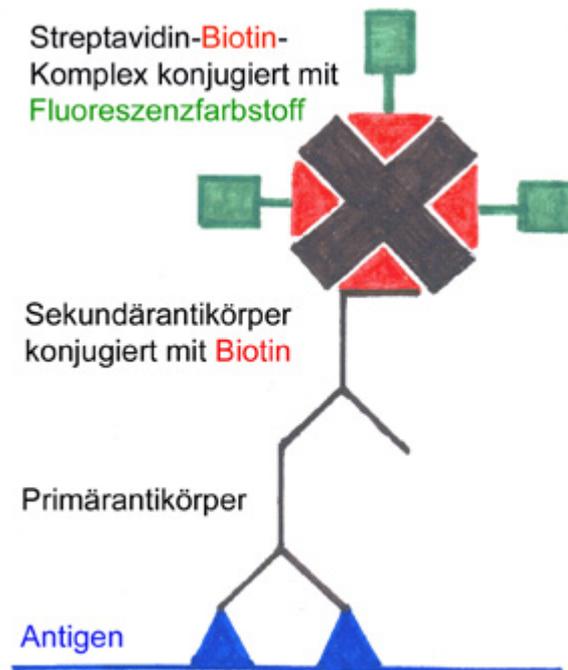
Immunhistochemische Färbungen werden verwendet, um die Lokalisation und die Verteilung von Antigenen in bestimmtem Gewebe zu untersuchen. Normalerweise enthalten die Färbeprotokolle viele verschiedene Inkubations- und Waschschriffe. Es werden hierbei spezifische Antikörper, welche an das gewünschte Antigen binden, verwendet.

Bei der direkten Methode ist dieser spezifische Antikörper direkt an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, welcher den Komplex sichtbar macht. Direkte Methoden produzieren in der Regel wenig unspezifische Reaktionen, d.h. wenig Hintergrund, aber sie benötigen eine große Menge markierter Antigen-Antikörper-Komplexe. Ein weiterer Vorteil ist, dass sie schnell durchführbar sind.

Bei der indirekten Methode kommt es zu einer Bindung eines unkonjugierten Antikörpers an das Antigen im Präparat. Um diese Anlagerung zu lokalisieren wird ein Sekundärantikörper benötigt, welcher mit einem Marker (z.B. ein Fluoreszenzfarbstoff) konjugiert ist. Dieser Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper und visualisiert den Antigen-Antikörper-Komplex. Diese indirekte Methode ist vielseitiger als die direkte Methode, da eine Vielzahl von Primärantikörpern derselben Tierspezies zusammen mit einem einzigen konjugierten Sekundärantikörper verwendet werden kann. Die Durchführung dauert allerdings etwa doppelt so lange wie die direkte Methode und unspezifische Reaktionen sind wahrscheinlicher, d.h. man hat unter Umständen mehr Hintergrund.

In der vorliegenden Studie fand die indirekte Avidin-Biotin-Methode Verwendung. Die Avidin-Biotin-Methode basiert auf der Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden. Es werden hierbei drei Reagenzien benötigt. Das erste ist ein Primärantikörper, der spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet ist. Der Sekundärantikörper, der an den ersten binden kann, ist mit Biotin konjugiert. Das dritte Reagenz ist ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierter Avidin-Biotin-Komplex. Die freien Stellen des Avidinmoleküls ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Der Fluoreszenzfarbstoff macht den Komplex aus Primär- und Sekundärantikörper und Avidin-Biotin sichtbar. Aufgrund der hohen Affinität des Avidins zum Biotin besitzt diese Methode eine höhere Empfindlichkeit.

Abb. 10: Schematische Darstellung der indirekten Avidin-Biotin-Methode.



4.2.1. Färbeprotokoll

Jedes Färbeprotokoll wurde anhand mehrerer vorbereitender Versuchsreihen entwickelt, um sorgfältig die optimalen Bedingungen zu ermitteln. Das beinhaltet optimale Verdünnungen der jeweiligen Substanzen, geeignete Inkubationszeiten wie auch optimale Substanzen und Zeitspannen zur Fixation.

Um falsch-positive Markierungen auszuschließen, wurden bei allen Versuchsreihen Negativkontrollen durchgeführt. Diese Kontrollschnitte wurden genauso behandelt wie die anderen Schnitte, mit Ausnahme der ersten Inkubation, bei der diese Kontrollen in einer Lösung ohne den Primärantikörper inkubiert wurden.

Zusätzlich wurde pro Versuchsreihe mindestens ein Schnitt hergestellt, von dessen Gewebe man sicher war, positive Ergebnisse zu erzielen. Dieser Schnitt wurde als Positivkontrolle benötigt, um den Erfolg und die Qualität der Färbung zu überprüfen.

Tab. 8: Arbeitsprotokoll für die Immunhistochemie

	Arbeitsschritt	Reagenz	Temp.	Zeit
1a	Fixierung	PFA	RT	5 min
1b	Fixierung	PFA	RT	10 min
1c	Fixierung	Aceton	-26°C	10 min
2	Waschen	PBS	RT	4 x 3 min
3	1. Inkubation	1. Antikörper	4°C	16 hr
4	Waschen	PBS	RT	4 x 3 min
5	2. Inkubation	2. Antikörper	RT	1 hr
6	Waschen	PBS	RT	4 x 3 min
7	3. Inkubation	Cy2- Streptavidin	RT	35 min
8	Waschen	PBS	RT	4 x 3 min
9	4. Inkubation	Kernfarbstoffe	RT	15 min
10	Waschen	PBS	RT	3 x 3 min
11	Eindecken	Mowiol	RT	

RT = Raumtemperatur

Fixierung

Die Wahl des Fixierungsreagenz und die Zeitspanne der Fixierung ist abhängig vom Primärantikörper (Kapitel III., Punkt 4.1.2.1.). Einige Antikörper, bei denen die Fixierung mit Aceton empfohlen wird, funktionieren allerdings auch bei Fixierung mit PFA, lediglich das erhaltene Signal wird etwas schwächer.

Die Fixierung mit Formaldehyd (PFA 4%) führt zu einer Stabilisierung der Gewebestrukturen durch Quervernetzung von Amido-, Amino- und anderen Gruppen. PFA 4% wurde bei Raumtemperatur benutzt. Aliquote Teile von PFA 4% wurden nach Herstellung tiefgefroren und jeweils kurz vor Benutzung frisch aufgetaut.

Manche Primärantikörper haben ihre optimale Wirkung bei Fixierung mit Aceton. Die Fixierung mit Aceton führt zu einer schnellen Dehydrierung und ist speziell zum Nachweis von Proteinen an Gefrierschnitten geeignet. Reines Aceton wurde zur Fixierung der Schnitte bei -26°C verwendet. Dabei müssen die Objektträger nach der Fixierung luftgetrocknet werden, um ein sogenanntes „Auslaufen der Zellkerne“ (d.h. die Kernfarbstoffe sind nicht mehr auf die Kerne begrenzt) zu minimieren.

Waschen

Nach jedem Arbeitsschritt, also nach Fixierung oder Inkubation, wurden die Schnitte sorgfältig in PBS gewaschen, um Rückstände der zuvor benutzten Substanzen zu entfernen und um die gegenwärtige Reaktion abzustoppen.

Inkubation

Die Objektträger wurden während der Inkubation in feuchten Kammern aufbewahrt. Dadurch wurden ein Verdunsten der aufgetragenen Lösungen und ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe in den späteren Arbeitsschritten verhindert.

Für die Inkubation wurden die Antikörper (Primär- und Sekundärantikörper), Cy2-Streptavidin und die Kernfarbstoffe entsprechend ihrer, unter Punkt 4.1.2.1., 4.1.2.2., 4.1.2.3. und 4.1.3. angegebenen Verdünnungen mit PBS verdünnt. Anschließend wurde jeder Schnitt mit 50 µl der jeweiligen Verdünnung beschichtet und in die feuchte Kammer gelegt.

Eindecken

Für das Eindecken gelten die unter Kapitel III., Punkt 3.2.1. beschriebenen Erläuterungen.

4.2.2. Quantifizierung der Lamin A-negativen Epithelzellen

Die Quantifizierung der nach dem Färbeprotokoll mit Lamin A-Antikörpern behandelten Präparate wurde entsprechend der unter Punkt 3.2.2. beschriebenen Auswertung der TUNEL-positiven Epithelzellkerne durchgeführt. Hierbei wurden alle im Gesichtsfeld liegenden Lamin A-positiven Epithelzellkerne (rot- und grün-fluoreszierend) und die Lamin A-negativen Epithelzellkerne (nur rot-fluoreszierend) erfasst. Weiterhin wurde die Lage der Lamin A-negativen Epithelzellkerne in der Schleimhaut des jeweiligen Magen-Darm-Abschnittes festgehalten (siehe Kapitel III., Punkt 3.2.2., Abb. 9). Die Anzahl der Lamin A-negativen Zellkerne wurde als Mittelwert (+/- SD) angegeben. Im Anschluss wurde der prozentuale Anteil der Lamin A-negativen Epithelzellkerne (Lamin A-neg. Epithz.) der jeweiligen Lokalisation anhand folgender Formel errechnet:

$$\% \text{ Lamin A-neg. Epithelz.} = \frac{\sum \text{Anzahl der Lamin A-neg. Epithelz.}}{\sum \text{Gesamtzahl der Epithelz.}} \times 100$$

5. Auswertung und Statistik

Die Datenauswertung erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogrammpaketes BMDP/Dynamic, Release 7.0 durchgeführt. Die Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms Excel (Microsoft Corporation).

Zur Beschreibung der Daten wurden arithmetische Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima, Maxima und Stichprobenumfänge berechnet und tabellarisch wiedergegeben. Es handelt sich bei dieser Auswertung um relativ kleine Zahlenwerte (arithmetische Mittelwerte) in Zusammenhang mit hohen Variationskoeffizienten und damit um eine rechtsschiefe Verteilung der Messwerte. Daher wurden die Daten logarithmisch transformiert, um näherungsweise eine Normalverteilung zu erzeugen, da dies die mathematische Voraussetzung für die Anwendung der statistischen Verfahren darstellt. In Anlehnung an den Verteilungstyp erfolgt die Darstellung der Daten mit Hilfe des geometrischen Mittelwertes und des Streufaktors, d.h. die logarithmierten Werte (arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung) wurden nach Durchführung der statistischen Berechnungen zur verständlicheren Interpretation wieder entlogarithmiert. So erhielt man den geometrischen Mittelwert, der noch die Dimension der Urwerte besitzt und den Streufaktor, die Standardabweichung der Logarithmen, der dimensionslos und stets >1 ist. Diese entlogarithmierten Daten (geometrischer Mittelwert und Streufaktor) wurden in Form von Säulendiagrammen dargestellt. Die qualitativen Merkmale wurden nach Gruppen getrennt ausgezählt und in Form von Häufigkeitstabellen dargestellt. Zur statistischen Prüfung des Gruppen- und Lokalisationseinflusses auf Signifikanz wurde mit den logarithmierten Daten eine zweifaktorielle Varianzanalyse (mit Messwiederholung im Faktor „Lokalisation“) mit dem Programm BMDP7D, bzw. BMDP2V durchgeführt.

Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt. Dabei wurden folgende Bezeichnungen verwendet:

$p < 0,001$	hoch signifikant
$p < 0,05$	signifikant
$p > 0,05$	nicht signifikant

IV. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Apoptose-Rate von Epithelzellen des Magen-Darm-Traktes von Pferden zu ermitteln. Es wurden zwei Methoden eingesetzt, die durch den Nachweis von DNA-Fragmenten (TUNEL-Methode) oder den Nachweis der Fragmentierung der Kernlamina (Lamin A) den Apoptose-Nachweis ermöglichen.

Bei den adulten Pferden kamen 6 Magen-Darm-Trakt Serien, bei den Fohlen 3 Magen-Darm-Trakt Serien zur Auswertung. Für die Gewinnung der Proben der adulten Pferde wurde der Magen-Darm-Trakt von gesunden, geschlachteten Pferden verwendet. Es wurde darauf geachtet möglichst solche Pferde zu beproben, bei denen eine kurze Zeitspanne zwischen Eintritt des Todes und Entnahme des Magen-Darm-Traktes lag. Bei Beprobung von Magen, Dünn- und Dickdarm eines Individuums waren bei den zuletzt entnommenen Proben starke autolytische Veränderungen in der Schleimhaut vorhanden. Daher wurde dazu übergegangen, jeweils nur Magen, Dünn- oder Dickdarm eines Individuums zu beproben. Mit dieser Maßnahme konnten Schäden der Schleimhaut durch Autolyse vermieden werden.

Zur Gewinnung der Proben des Magen-Darm-Traktes von Fohlen wurden eingeschläferte oder verstorbene Fohlen beprobt. Es wurde darauf geachtet, die Proben so schnell wie möglich nach Eintritt des Todes der Fohlen zu gewinnen. Weiterhin wurde darauf geachtet nur Fohlen zu beproben, deren Magen-Darm-Trakt makro- und mikroskopisch unauffällig war.

Bei beiden Altersgruppen stellte die Erhaltung der Zotten des Dünndarmes ein großes Problem dar. Mit dem durchaus gebräuchlichen Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff war es nicht möglich die Zottenstrukturen zu erhalten und auch bei den Proben des Magens und Dickdarmes kam es dabei zu Schleimhautschäden. Erst das Einfrieren in Methylbutan, bei dem das Gewebe auf Kork mit einer Schutzhülle aus Tissue Tec eingefroren wird, brachte gut erhaltene Gewebestrukturen, mit denen die weiteren Untersuchungen durchgeführt werden konnten.

1. TUNEL-Methode

Die TUNEL-Methode stellt mittlerweile eine Standardmethode zum Nachweis von Apoptose bei Zellen aus den unterschiedlichsten Geweben dar. Sie wurde bisher bei verschiedenen Spezies (siehe Kapitel II., Punkt 6.2.1.) eingesetzt und ergibt auch am Magen-Darm-Trakt des Pferdes sehr gute Resultate.

Die TUNEL-Färbung stellt sich als rote Markierung der Zellkerne, die die DNA-Fragmente enthalten und somit die Apoptose der Zelle anzeigen, dar. Jede TUNEL-positive Markierung wurde auf die Anfärbung mit DAPI überprüft, um die rote Markierung eindeutig einem Zellkern (oder Zellkern-Bruchstück) zuzuordnen. Mit der Anfärbung der Aktinfilamente mit Phalloidin wurde die Intaktheit der Schleimhautoberfläche sichtbar gemacht.

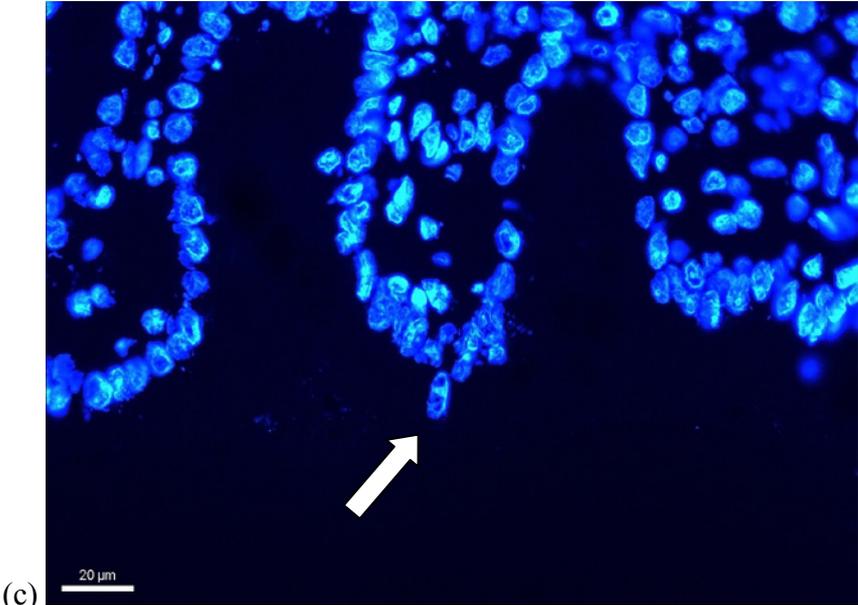
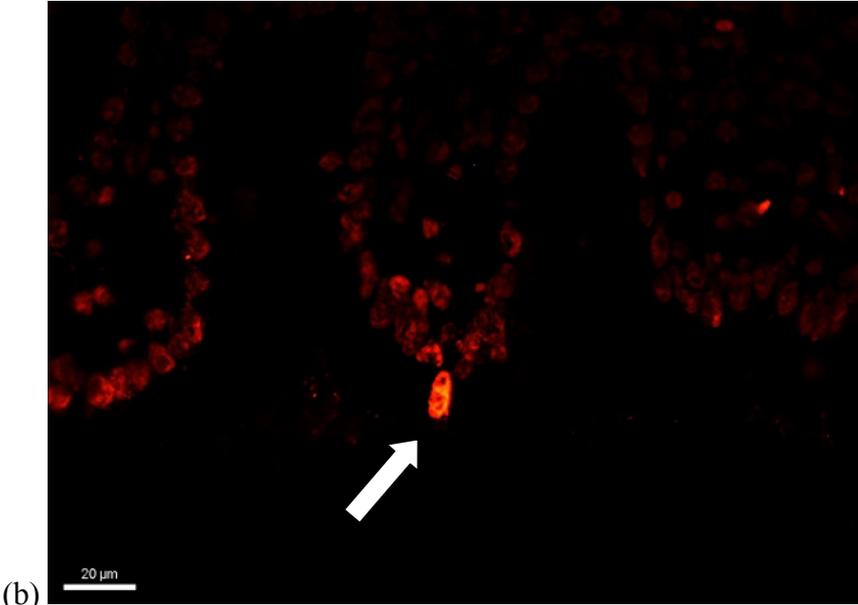
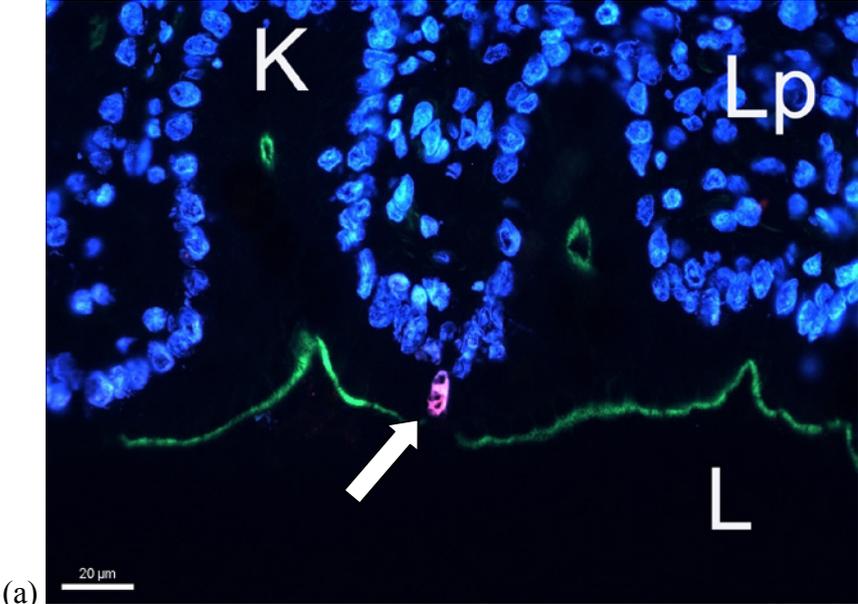
Die Abbildung 11 zeigt die TUNEL-Methode an einem Schnitt des Colon ascendens eines Fohlens (F 3). Der apoptotische Zellkern ist in der TUNEL-Färbung rot markiert. Weiterhin erkennt man, dass die Zelle mit dem apoptotischen Zellkern im Begriff ist, sich aus dem Zellverband zu lösen und in Richtung des Lumens zu bewegen.

Abb. 11: TUNEL-Nachweis am Colon ascendens eines Fohlens (F 3 Cola 11); L = Lumen, K = Krypte, Lp = Lamina propria, Pfeil = apoptotischer Zellkern. Skalierung: 20 μm (x 400).

a) Apoptose/TUNEL in rot, Zellkerne mit DAPI blau und Aktin mit Phalloidin grün gefärbt

b) TUNEL in rot

c) Zellkerne mit DAPI blau gefärbt.



1.1. Magen

1.1.1. Margo plicatus

Bei den adulten Pferden befanden sich die apoptotischen Zellen am Margo plicatus hauptsächlich im Oberflächenepithel (Mittelwert (M) = 65,667 Zellkerne (ZK) (+/-79,939 ZK (= Standardabweichung)), selten im Bereich des Isthmus (M = 1,833 ZK (+/-3,125 ZK)) und sehr selten im Bereich der Drüsenzellen (M = 0,167 ZK (+/-0,408 ZK)) (siehe Tabellen Anhang).

Auch bei den Fohlen befand sich die Mehrzahl der apoptotischen Zellen am Margo plicatus im Oberflächenepithel (M = 31,333 ZK (+/-12,423 ZK)), es wurden aber auch vereinzelt apoptotische Zellen im Bereich des Isthmus (M = 3 ZK (+/-2,646 ZK)) und der Drüsenregion (M = 2,333 ZK (+/-1,527 ZK)) gefunden (siehe Tabellen Anhang).

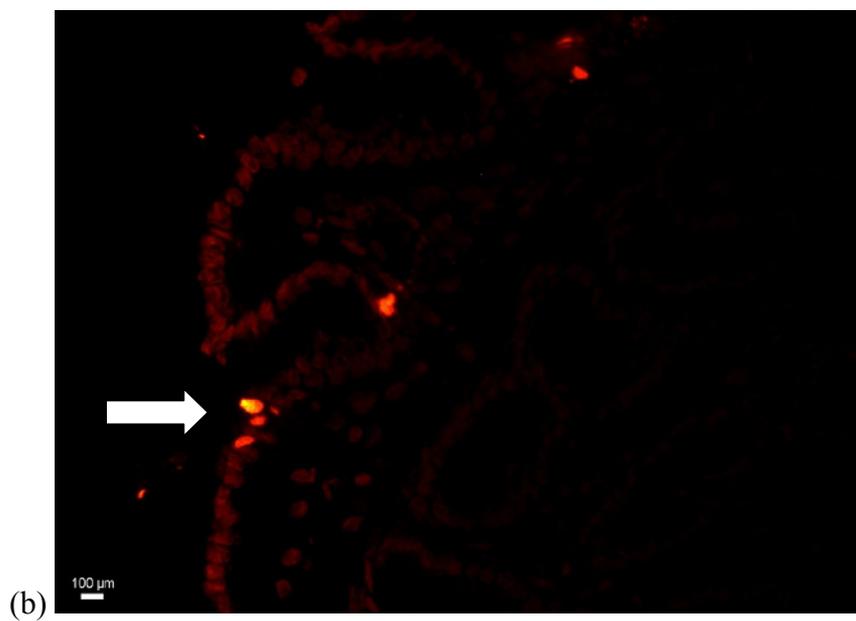
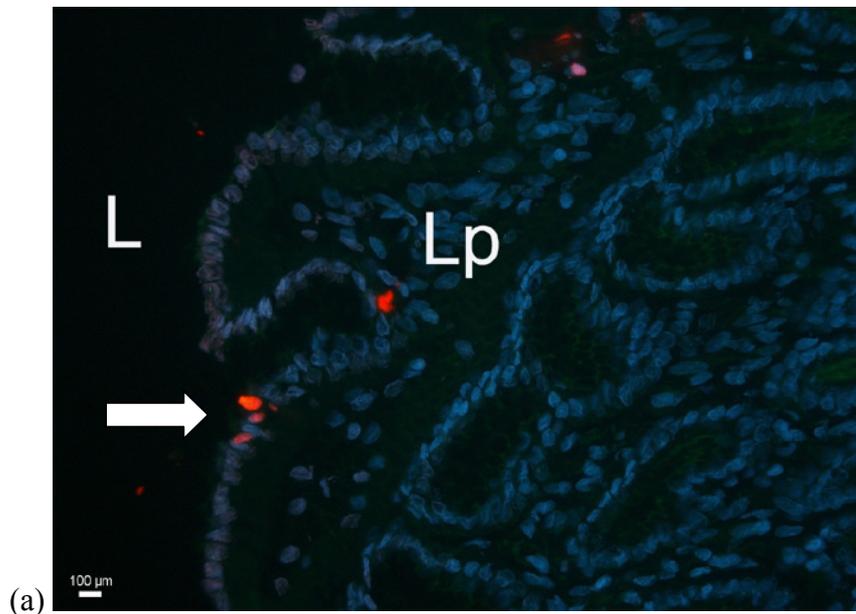
Bei den adulten Pferden betrug der Mittelwert der Apoptose-Rate am Margo plicatus 0,380% (+/-0,441% (= SD)). Bei den Fohlen betrug der Mittelwert der Apoptose-Rate am Margo plicatus 0,197% (+/-0,037%).

Der geometrische Mittelwert der Apoptose-Rate am Margo plicatus der adulten Pferde lag bei 0,181%, der Streufaktor betrug 4,454. Der geometrische Mittelwert der Apoptose-Rate am Margo plicatus der Fohlen lag bei 0,195%, der Streufaktor betrug 1,220 (siehe Tab. 9 und Abb. 15).

Abb. 12: TUNEL-Nachweis am Margo plicatus eines Adulten (A 3.1. Mpli 11); L = Lumen, Lp = Lamina propria, Pfeil = apoptotischer Zellkern. Skalierung: 100 μm (x 250).

a) Apoptose/TUNEL in rot, Zellkerne mit DAPI blau und Aktin mit Phalloidin grün gefärbt

b) TUNEL in rot.



1.1.2. Fundus

Bei den adulten Pferden befanden sich die apoptotischen Zellen am Fundus hauptsächlich im Oberflächenepithel ($M = 58,333 \text{ ZK } (+/-28,752 \text{ ZK})$), selten im Bereich des Isthmus ($M = 1,5 \text{ ZK } (+/-2,811 \text{ ZK})$) und selten im Bereich der Drüsenzellen ($M = 2,167 \text{ ZK } (+/-5,307 \text{ ZK})$). Nur bei einem Individuum wurden einige apoptotische Zellen in der Isthmus- und der Drüsenregion gefunden (siehe Tabellen Anhang).

Auch bei den Fohlen befand sich die Mehrzahl der apoptotischen Zellen am Fundus im Oberflächenepithel ($M = 58,333 \text{ ZK } (+/-59,543 \text{ ZK})$), es wurden aber auch vereinzelt apoptotische Zellen im Bereich des Isthmus ($M = 7 \text{ ZK } (+/-2 \text{ ZK})$) und der Drüsenregion ($M = 6,333 \text{ ZK } (+/-10,116 \text{ ZK})$) gefunden (siehe Tabellen Anhang).

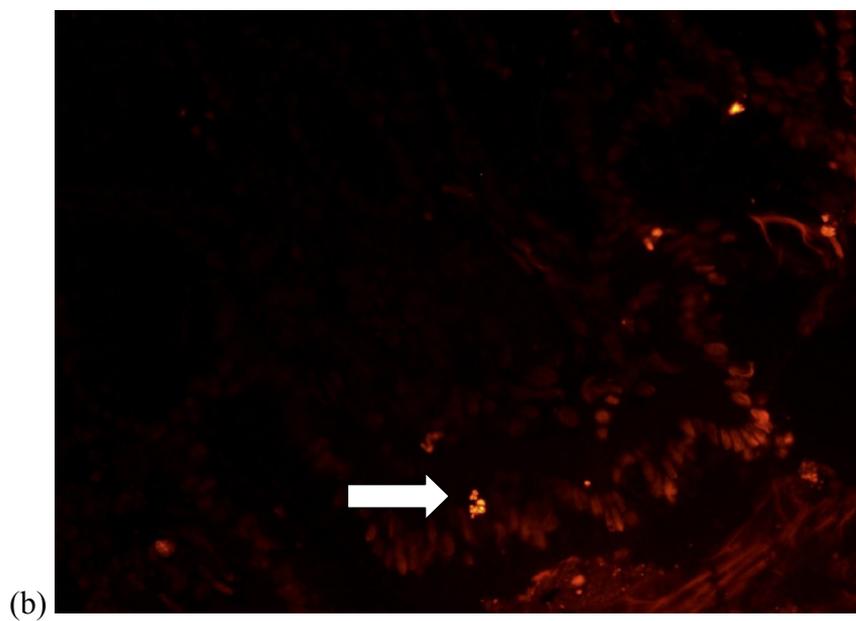
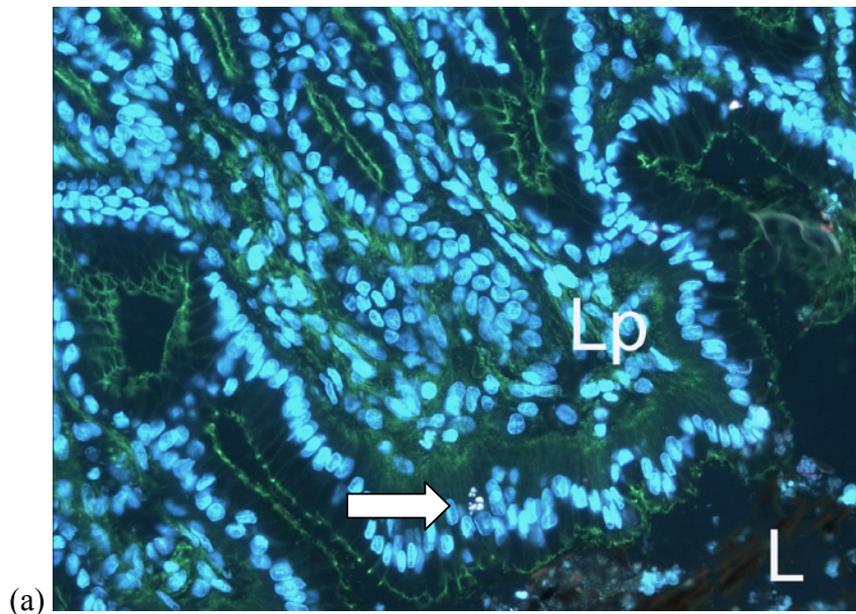
Bei den adulten Pferden betrug der Mittelwert der Apoptose-Rate am Fundus 0,352% ($+/-0,180\%$). Bei den Fohlen betrug der Mittelwert der Apoptose-Rate am Fundus 0,460% ($+/-0,464\%$).

Der geometrische Mittelwert der Apoptose-Rate am Fundus der adulten Pferde lag bei 0,301%, der Streufaktor betrug 1,985. Der geometrische Mittelwert der Apoptose-Rate am Fundus der Fohlen lag bei 0,332%, der Streufaktor betrug 2,606 (siehe Tab. 9 und Abb. 15).

Abb. 13: TUNEL-Nachweis am Fundus eines Fohlens (F 3 Fun 25); L = Lumen, Lp = Lamina propria, Pfeil = apoptotischer Zellkern bzw. apoptotische Körperchen (x 250).

a) Apoptose/TUNEL in rot, Zellkerne mit DAPI blau und Aktin mit Phalloidin grün gefärbt

b) TUNEL in rot.



1.1.3. Pylorus

Bei den adulten Pferden befanden sich die apoptotischen Zellen am Pylorus hauptsächlich im Oberflächenepithel ($M = 66,333 \text{ ZK } (+/-68,739 \text{ ZK})$), selten im Bereich des Isthmus ($M = 1 \text{ ZK } (+/-0,894 \text{ ZK})$) und sehr selten im Bereich der Drüsenzellen ($M = 0,667 \text{ ZK } (+/-0,816 \text{ ZK})$) (siehe Tabellen Anhang).

Auch bei den Fohlen befand sich die Mehrzahl der apoptotischen Zellen am Pylorus im Oberflächenepithel ($M = 49 \text{ ZK } (+/-66,731 \text{ ZK})$), es wurden aber auch vereinzelt apoptotische Zellen im Bereich des Isthmus ($M = 3,667 \text{ ZK } (+/-6,351 \text{ ZK})$) und der Drüsenregion ($M = 2,667 \text{ ZK } (+/-2,517 \text{ ZK})$) gefunden (siehe Tabellen Anhang).

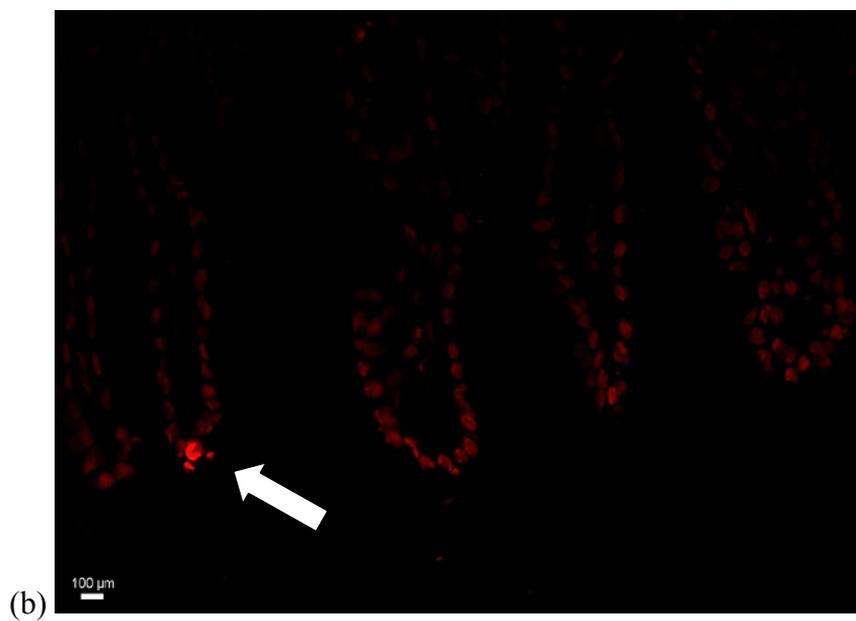
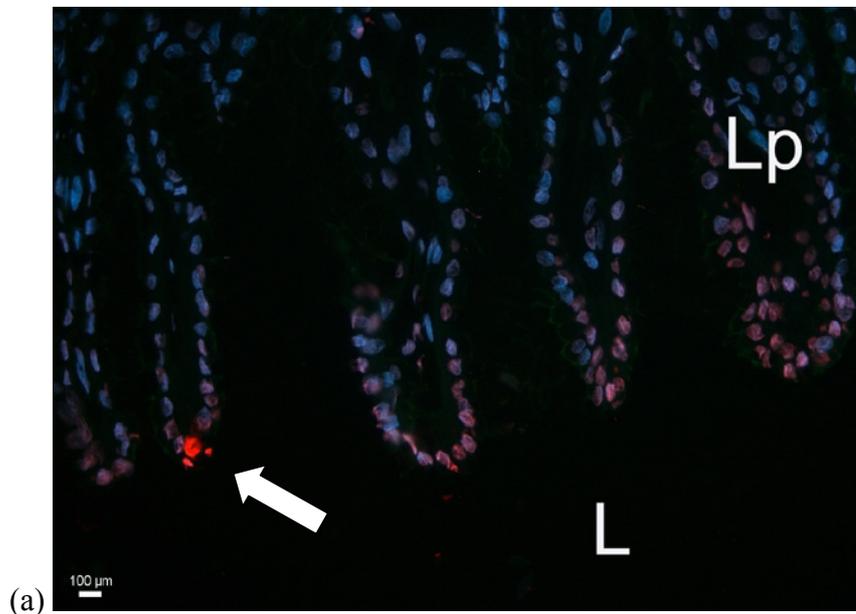
Bei den adulten Pferden betrug der Mittelwert der Apoptose-Rate am Pylorus 0,366% ($+/-0,355\%$). Bei den Fohlen betrug der Mittelwert der Apoptose-Rate am Pylorus 0,415% ($+/-0,531\%$).

Der geometrische Mittelwert der Apoptose-Rate am Pylorus der adulten Pferde lag bei 0,219%, der Streufaktor betrug 3,308. Der geometrische Mittelwert der Apoptose-Rate am Pylorus der Fohlen lag bei 0,202%, der Streufaktor betrug 4,740 (siehe Tab. 9 und Abb. 15).

Abb. 14: TUNEL-Nachweis am Pylorus eines Adulten (A 4.1. Pyl 12); L = Lumen, Lp = Lamina propria, Pfeil = apoptotischer Zellkern. Skalierung: 100 μm (x 250).

a) Apoptose/TUNEL in rot, Zellkerne mit DAPI blau und Aktin mit Phalloidin grün gefärbt

b) TUNEL in rot.



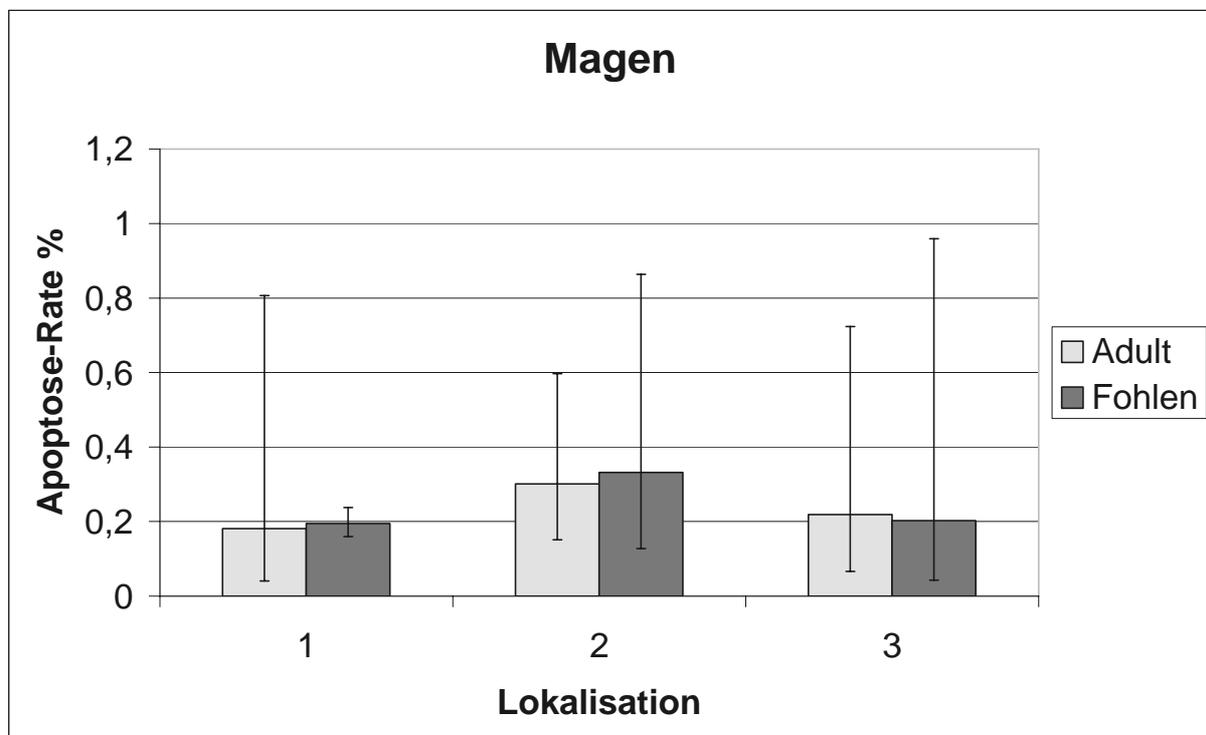
Die geometrischen Mittelwerte (geom. M) der Apoptose-Rate der einzelnen Lokalisationen des Magens adulter Pferde und Fohlen sind in der Tabelle 9 angegeben und in der Abbildung 15 dargestellt.

Zusammenfassend unterscheidet sich die Apoptose-Rate der Epithelzellen an den einzelnen Lokalisationen des Magens der adulten Pferde nicht signifikant von der der Fohlen ($p = 0,950$). Auch der Unterschied der Apoptose-Rate der Epithelzellen zwischen den einzelnen Lokalisationen des Magens von adulten Pferden oder Fohlen ist nicht signifikant ($p = 0,637$).

Tab. 9: Apoptose-Raten in % (geom. M) am Magen von adulten Pferden und Fohlen.

	Margo plicatus	Fundus	Pylorus
ADULT	0,181	0,301	0,219
FOHLEN	0,195	0,332	0,202

Abb. 15: Die Apoptose-Raten in % (geom. M) an den drei Lokalisationen des Magens vergleichend zwischen adulten Pferden und Fohlen. Lokalisation 1 = Margo plicatus; Lokalisation 2 = Fundus; Lokalisation 3 = Pylorus.



1.2. Dünndarm

1.2.1. Duodenum

Bei den adulten Pferden befanden sich die apoptotischen Zellen am Duodenum hauptsächlich im Bereich der Zottenspitze ($M = 14,167 \text{ ZK } (+/-16,461 \text{ ZK})$), selten im Bereich der Zottenmitte ($M = 3,667 \text{ ZK } (+/-7,062 \text{ ZK})$) und sehr selten im Bereich der Zottenbasis ($M = 0,5 \text{ ZK } (+/-1,225 \text{ ZK})$) oder der Krypten (kein ZK). Nur bei einem Individuum wurde ein apoptotischer ZK im Bereich der Kryptenmitte gefunden, d.h. in der Kryptenmitte war $M = 0,167 \text{ ZK } (+/-0,408 \text{ ZK})$ (siehe Tabellen Anhang).

Auch bei den Fohlen befand sich die Mehrzahl der apoptotischen Zellen am Duodenum im Bereich der Zottenspitze ($M = 73,333 \text{ ZK } (+/-49,217 \text{ ZK})$), es wurden auch apoptotische Zellen im Bereich der Zottenmitte ($M = 18 \text{ ZK } (+/-8 \text{ ZK})$) gefunden, aber keine im Bereich der Zottenbasis (kein ZK), der Kryptenoberfläche (kein ZK) oder der Kryptenmitte (kein ZK). Bei einem Individuum befanden sich 2 apoptotische Zellen im Bereich der Kryptenbasis, d.h. in der Kryptenbasis war $M = 0,667 \text{ ZK } (+/-1,155 \text{ ZK})$ (siehe Tabellen Anhang).

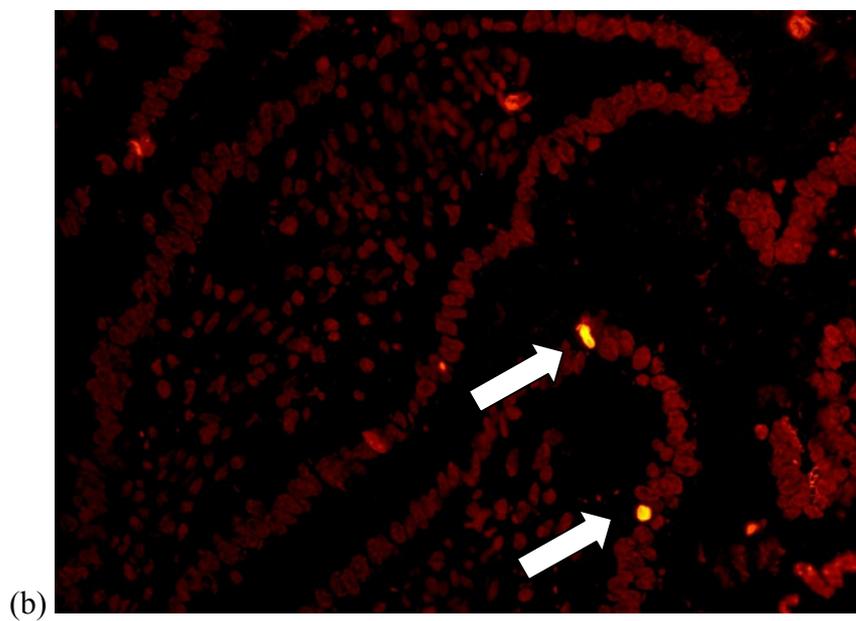
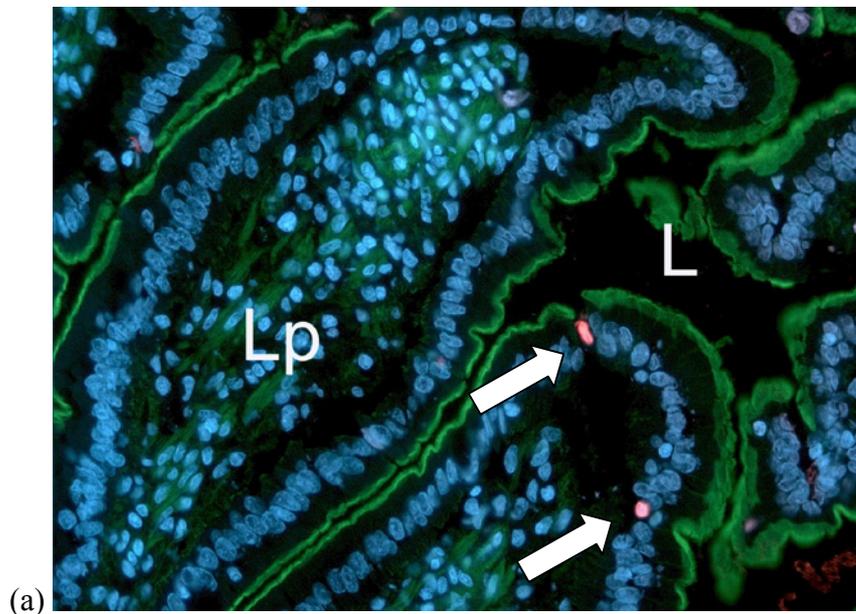
Bei den adulten Pferden betrug der Mittelwert der Apoptose-Rate am Duodenum 0,157% ($+/-0,215\%$). Im Gegensatz dazu betrug der Mittelwert der Apoptose-Rate am Duodenum bei den Fohlen 0,692% ($+/-0,436\%$).

Der geometrische Mittelwert der Apoptose-Rate am Duodenum der adulten Pferde lag bei 0,076% und der Streufaktor betrug 3,678, dagegen lag der geometrische Mittelwert der Apoptose-Rate am Duodenum der Fohlen bei 0,598% und der Streufaktor betrug 1,971 (siehe Tab. 10 und Abb. 19).

Abb. 16: TUNEL-Nachweis am Duodenum eines Fohlens (F 3 Duo 31); L = Lumen, Lp = Lamina propria, Pfeile = apoptotische Zellkerne (x 250).

a) Apoptose/TUNEL in rot, Zellkerne mit DAPI blau und Aktin mit Phalloidin grün gefärbt

b) TUNEL in rot.



1.2.2. Jejunum

Bei den adulten Pferden befanden sich die apoptotischen Zellen am Jejunum hauptsächlich im Bereich der Zottenspitze ($M = 14 \text{ ZK } (+/-3,098 \text{ ZK})$), vereinzelt auch im Bereich der Zottenmitte ($M = 4 \text{ ZK } (+/-4,336 \text{ ZK})$) und selten im Bereich der Zottenbasis ($M = 0,5 \text{ ZK } (+/-,225 \text{ ZK})$) und keine im Bereich der Krypten (keine ZK) (siehe Tabellen Anhang).

Auch bei den Fohlen befand sich die Mehrzahl der apoptotischen Zellen am Jejunum im Bereich der Zottenspitze ($M = 65 \text{ ZK } (+/-76,531 \text{ ZK})$), es wurden auch apoptotische Zellen im Bereich der Zottenmitte ($M = 53,333 \text{ ZK } (+/-84,619 \text{ ZK})$), weniger im Bereich der Zottenbasis ($M = 16,333 \text{ ZK } (+/-27,429 \text{ ZK})$) und selten im Bereich der Kryptenoberfläche ($M = 0,333 \text{ ZK } (+/-0,577 \text{ ZK})$) gefunden, aber keine in anderen Bereichen der Krypten (keine ZK). Bei einem Individuum befanden sich viele apoptotische Zellen im Bereich der Zottenmitte und relativ viele im Bereich der Zottenbasis (siehe Tabellen Anhang).

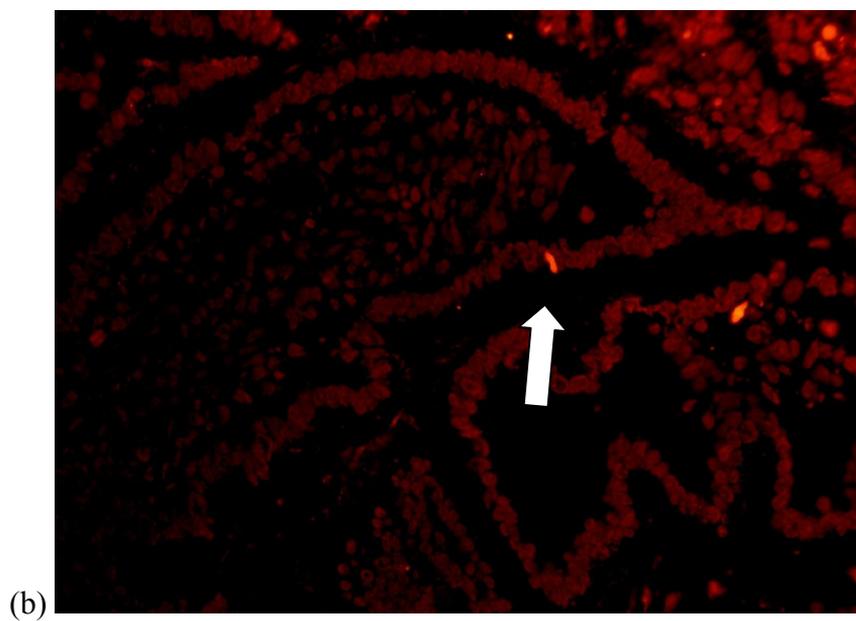
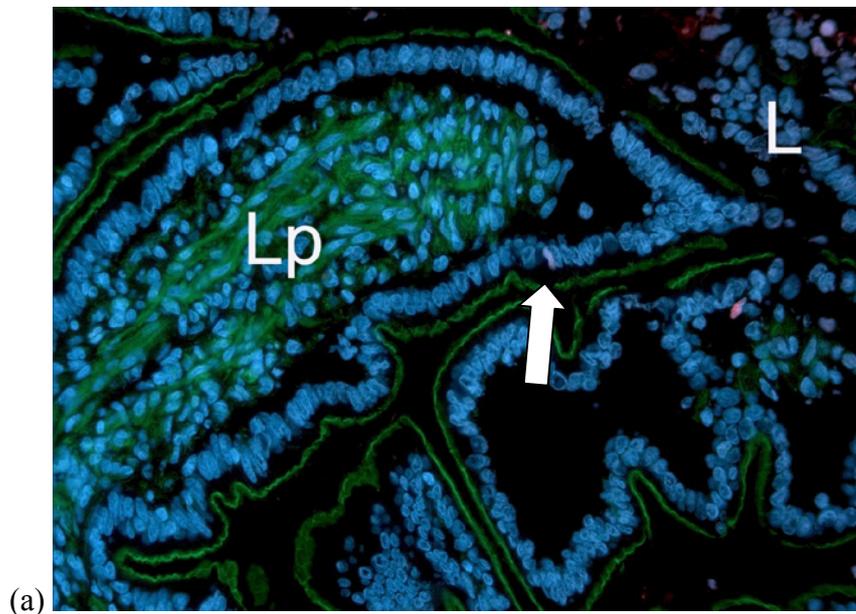
Bei den adulten Pferden betrug der Mittelwert der Apoptose-Rate am Jejunum 0,106% ($+/-0,033\%$). Im Gegensatz dazu betrug der Mittelwert der Apoptose-Rate am Jejunum bei den Fohlen 0,788% ($+/-1,058\%$).

Der geometrische Mittelwert der Apoptose-Rate am Jejunum der adulten Pferde lag bei 0,102% und, der Streufaktor betrug 1,370, dagegen lag der geometrische Mittelwert der Apoptose-Rate am Jejunum der Fohlen bei 0,399% und der Streufaktor betrug 4,060 (siehe Tab. 10 und Abb. 19).

Abb. 17: TUNEL-Nachweis am Jejunum eines Fohlens (F 3 Jej 45); L = Lumen, Lp = Lamina propria, Pfeil = apoptotischer Zellkern (x 250).

a) Apoptose/TUNEL in rot, Zellkerne mit DAPI blau und Aktin mit Phalloidin grün gefärbt

b) TUNEL in rot.



1.2.3. Ileum

Bei den adulten Pferden befanden sich die apoptotischen Zellen am Ileum hauptsächlich im Bereich der Zottenspitze ($M = 14,833 \text{ ZK } (+/-11,444 \text{ ZK})$), vereinzelt auch im Bereich der Zottenmitte ($M = 2,5 \text{ ZK } (+/-2,258 \text{ ZK})$), selten im Bereich der Zottenbasis ($M = 1 \text{ ZK } (+/-2 \text{ ZK})$) und keine im Bereich der Krypten (keine ZK) (siehe Tabellen Anhang).

Auch bei den Fohlen befand sich die Mehrzahl der apoptotischen Zellen am Ileum im Bereich der Zottenspitze ($M = 29,667 \text{ ZK } (+/-9,452 \text{ ZK})$), es wurden aber auch apoptotische Zellen im Bereich der Zottenmitte ($M = 14 \text{ ZK } (+/-20,881 \text{ ZK})$) und selten im Bereich der Zottenbasis ($M = 2 \text{ ZK } (+/-3,464 \text{ ZK})$) gefunden, jedoch keine im Bereich der Krypten (keine ZK) (siehe Tabellen Anhang). Bei einem Individuum wurden viele apoptotische Zellen im Bereich der Zottenmitte gefunden.

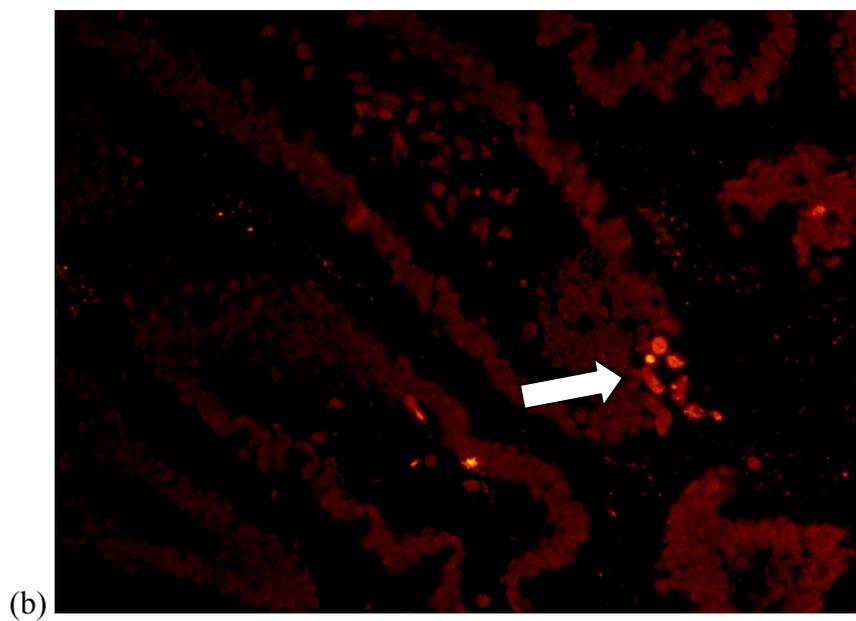
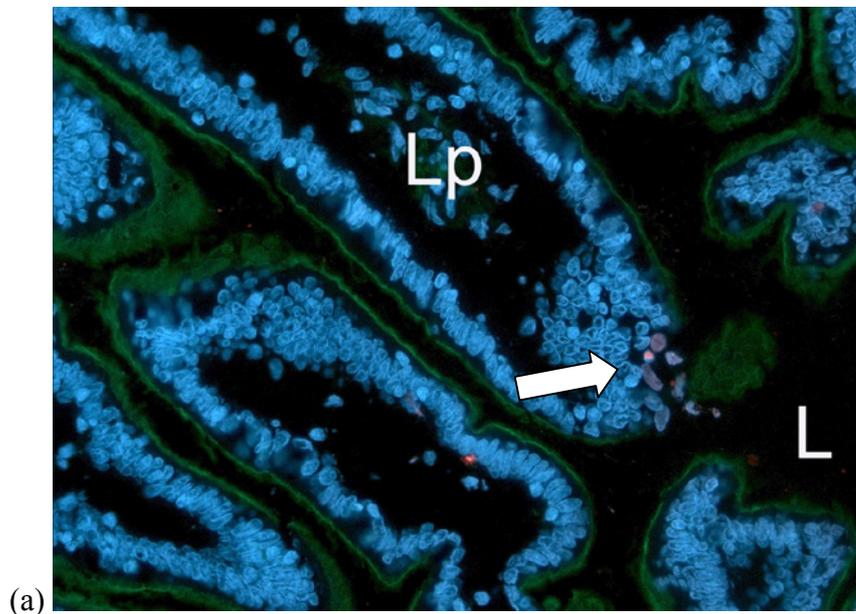
Bei den adulten Pferden betrug der Mittelwert der Apoptose-Rate am Ileum 0,110% ($+/-0,077\%$). Im Gegensatz dazu betrug der Mittelwert der Apoptose-Rate am Ileum bei den Fohlen 0,226% ($+/-0,131\%$).

Der geometrische Mittelwert der Apoptose-Rate am Ileum der adulten Pferde lag bei 0,080% und der Streufaktor betrug 2,578, dagegen lag der geometrische Mittelwert der Apoptose-Rate am Ileum der Fohlen bei 0,201% und der Streufaktor betrug 1,823 (siehe Tab. 10 und Abb. 19).

Abb. 18: TUNEL-Nachweis am Ileum eines Fohlens (F 3 Ile 11); L = Lumen, Lp = Lamina propria, Pfeil = apoptotische Zellkerne (x 250).

a) Apoptose/TUNEL in rot, Zellkerne mit DAPI blau und Aktin mit Phalloidin grün gefärbt

b) TUNEL in rot.



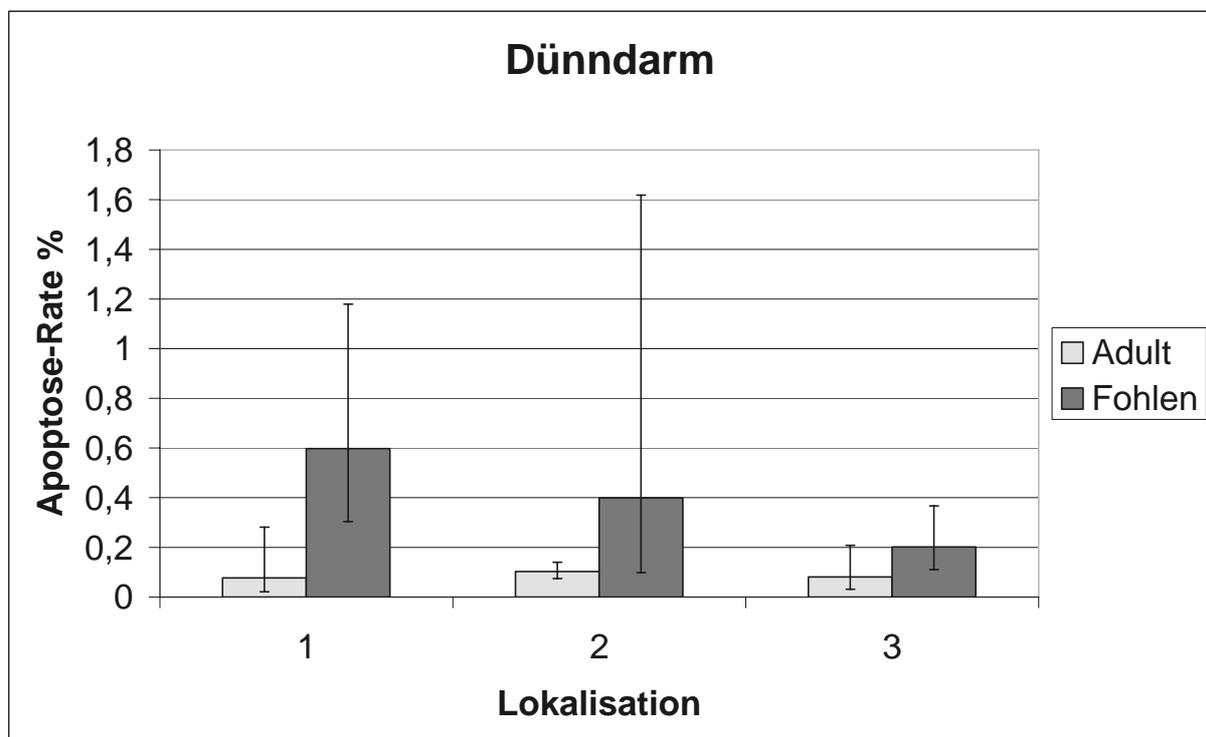
Die geometrischen Mittelwerte (geom. M) der Apoptose-Rate der einzelnen Lokalisationen des Dünndarmes adulter Pferde und Fohlen sind in der Tabelle 10 angegeben und in der Abbildung 19 dargestellt.

Zusammenfassend ist die Apoptose-Rate der Epithelzellen an den einzelnen Lokalisationen des Dünndarms bei den adulten Pferden signifikant niedriger als die der Fohlen ($p = 0,015$). Dagegen ist der Unterschied der Apoptose-Rate zwischen den einzelnen Lokalisationen am Dünndarm von adulten Pferden oder Fohlen nicht signifikant ($p = 0,443$).

Tab. 10: Apoptose-Raten in % (geom. M) am Dünndarm von adulten Pferden und Fohlen.

	Duodenum	Jejunum	Ileum
ADULT	0,076	0,102	0,080
FOHLEN	0,598	0,399	0,201

Abb. 19: Die Apoptose-Rate an den drei Lokalisationen des Dünndarmes vergleichend zwischen adulten Pferden und Fohlen. Lokalisation 1 = Duodenum; Lokalisation 2 = Jejunum; Lokalisation 3 = Ileum.



1.3. Dickdarm

1.3.1. Caecum

Bei den adulten Pferden befanden sich die apoptotischen Zellen am Caecum hauptsächlich im Oberflächenepithel ($M = 12,5$ ZK ($\pm 7,662$ ZK)), selten im Bereich der Kryptenmitte ($M = 1,333$ ZK ($\pm 1,211$ ZK)) und keine im Bereich der Kryptenbasis (keine ZK) (siehe Tabellen Anhang).

Bei den Fohlen kam insgesamt nur ein Caecum zur Auswertung, da die anderen Gewebestücke Autolyse zeigten. Bei diesem Fohlen befand sich die Mehrzahl der apoptotischen Zellen im Oberflächenepithel (15 ZK), es wurden aber auch eine apoptotische Zelle im Bereich der Kryptenmitte (1 ZK) und eine im Bereich der Kryptenbasis (1 ZK) gefunden (siehe Tabellen Anhang).

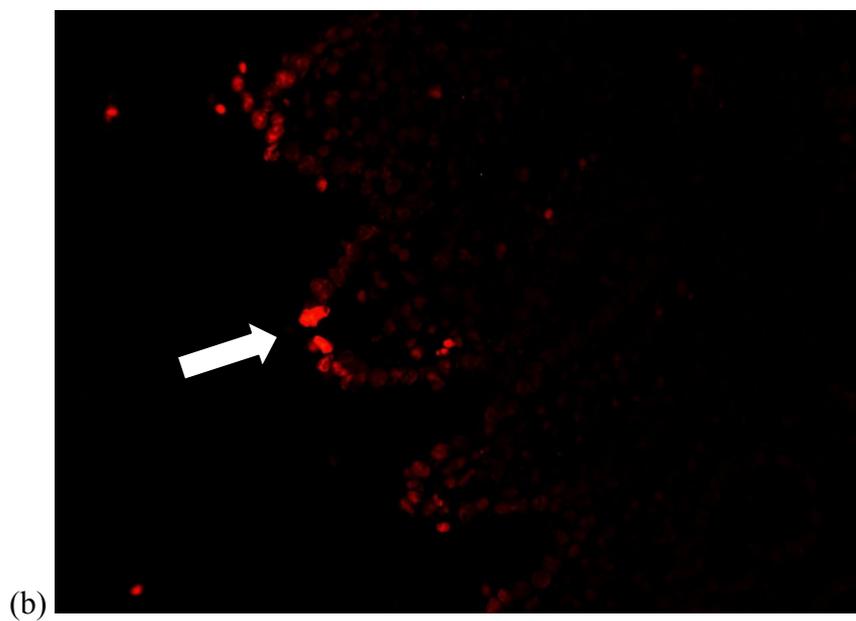
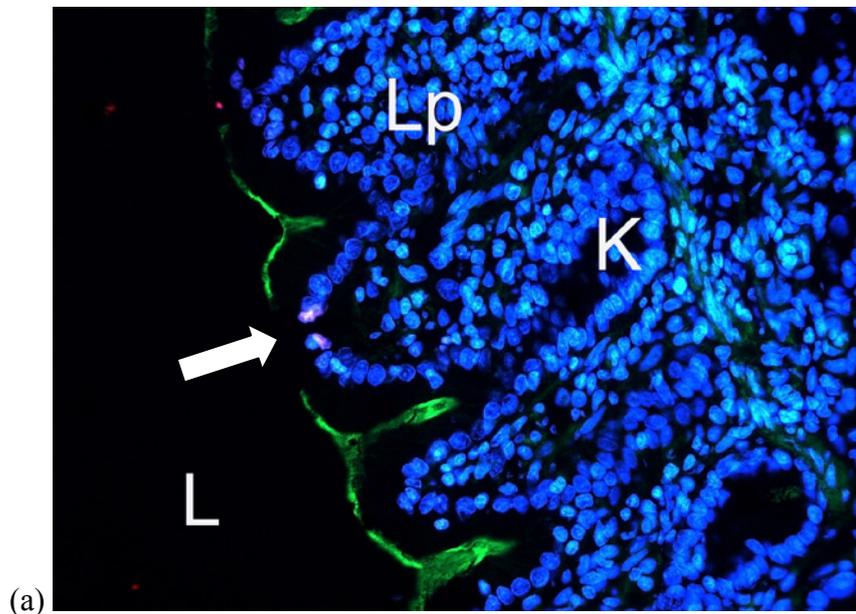
Bei den adulten Pferden betrug der Mittelwert der Apoptose-Rate am Caecum 0,137% ($\pm 0,065\%$). Im Gegensatz dazu betrug die Apoptose-Rate am Caecum bei diesem einen Fohlen 0,290% ($\pm 0\%$).

Da bei den Fohlen nur das Caecum eines Individuums zur Auswertung kam, wurde auf die logarithmische Transformation der Werte und damit auf die statistische Auswertung des Caecums verzichtet.

Abb. 20: TUNEL-Nachweis am Caecum eines Fohlens (F 3 Cae 23); L = Lumen, K = Krypte, Lp = Lamina propria, Pfeil = apoptotische Zellkerne (x 250).

a) Apoptose/TUNEL in rot, Zellkerne mit DAPI blau und Aktin mit Phalloidin grün gefärbt

b) TUNEL in rot.



1.3.2. Colon ascendens

Bei den adulten Pferden befanden sich die apoptotischen Zellen am Colon ascendens hauptsächlich im Oberflächenepithel ($M = 49,333 \text{ ZK } (+/-65,271 \text{ ZK})$), selten im Bereich der Kryptenmitte ($M = 1,667 \text{ ZK } (+/-1,505 \text{ ZK})$) und nur vereinzelt im Bereich der Kryptenbasis ($M = 0,333 \text{ ZK } (+/-0,816 \text{ ZK})$) (siehe Tabellen Anhang).

Bei den Fohlen befand sich die Mehrzahl der apoptotischen Zellen am Colon ascendens im Oberflächenepithel ($M = 137 \text{ ZK } (+/-164,572 \text{ ZK})$), es wurden auch einige apoptotische Zellen im Bereich der Kryptenmitte ($M = 6,667 \text{ ZK } (+/-8,963 \text{ ZK})$), aber keine im Bereich der Kryptenbasis (keine ZK) gefunden (siehe Tabellen Anhang).

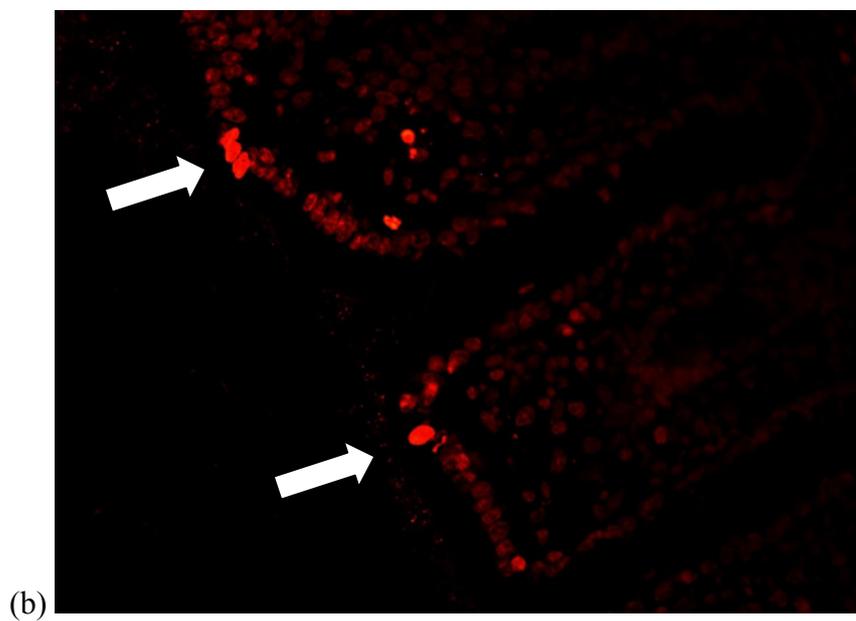
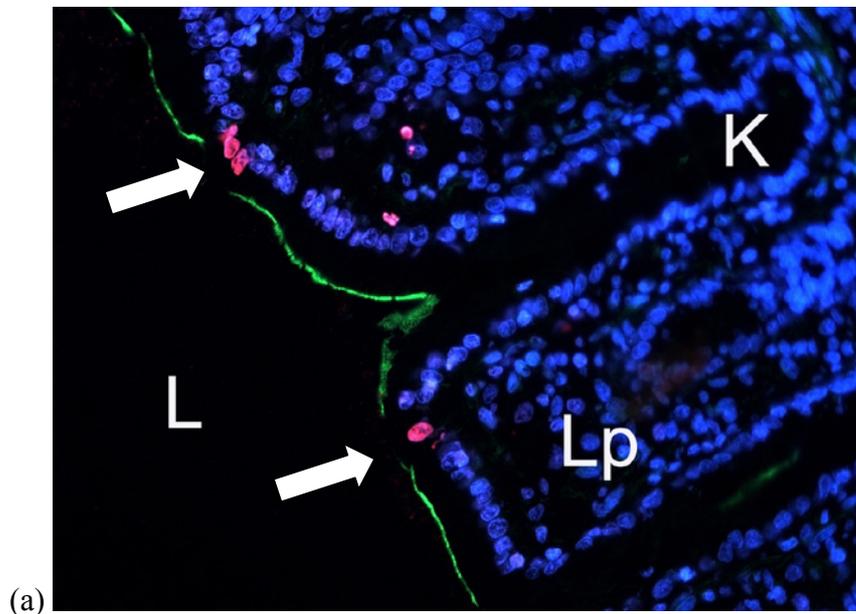
Bei den adulten Pferden betrug der Mittelwert der Apoptose-Rate am Colon ascendens 0,369% ($+/-0,417\%$). Im Gegensatz dazu betrug der Mittelwert der Apoptose-Rate am Colon ascendens bei den Fohlen 1,273% ($+/-1,419\%$).

Der geometrische Mittelwert der Apoptose-Rate am Colon ascendens der adulten Pferde lag bei 0,202% und der Streufaktor betrug 3,448, dagegen lag der geometrische Mittelwert der Apoptose-Rate am Colon ascendens der Fohlen bei 0,837% und der Streufaktor betrug 2,977 (siehe Tab. 11 und Abb. 23).

Abb. 21: TUNEL-Nachweis am Colon ascendens eines Fohlens (F 3 Cola 13); L = Lumen, K = Krypte, Lp = Lamina propria, Pfeile = apoptotische Zellkerne (x 250).

a) Apoptose/TUNEL in rot, Zellkerne mit DAPI blau und Aktin mit Phalloidin grün gefärbt

b) TUNEL in rot.



1.3.3. Colon descendens

Bei den adulten Pferden befanden sich die apoptotischen Zellen am Colon descendens hauptsächlich im Oberflächenepithel ($M = 35,5 \text{ ZK } (+/-31,373 \text{ ZK})$), selten im Bereich der Kryptenmitte ($M = 1,333 \text{ ZK } (+/-1,366 \text{ ZK})$) und keine im Bereich der Kryptenbasis (keine ZK) (siehe Tabellen Anhang).

Bei den Fohlen befand sich die Mehrzahl der apoptotischen Zellen am Colon descendens im Oberflächenepithel ($M = 115,667 \text{ ZK } (+/-115,084 \text{ ZK})$), es wurden auch einige apoptotische Zellen im Bereich der Kryptenmitte ($M = 3,333 \text{ ZK } (+/-4,041 \text{ ZK})$), jedoch keine im Bereich der Kryptenbasis (keine ZK) gefunden (siehe Tabellen Anhang).

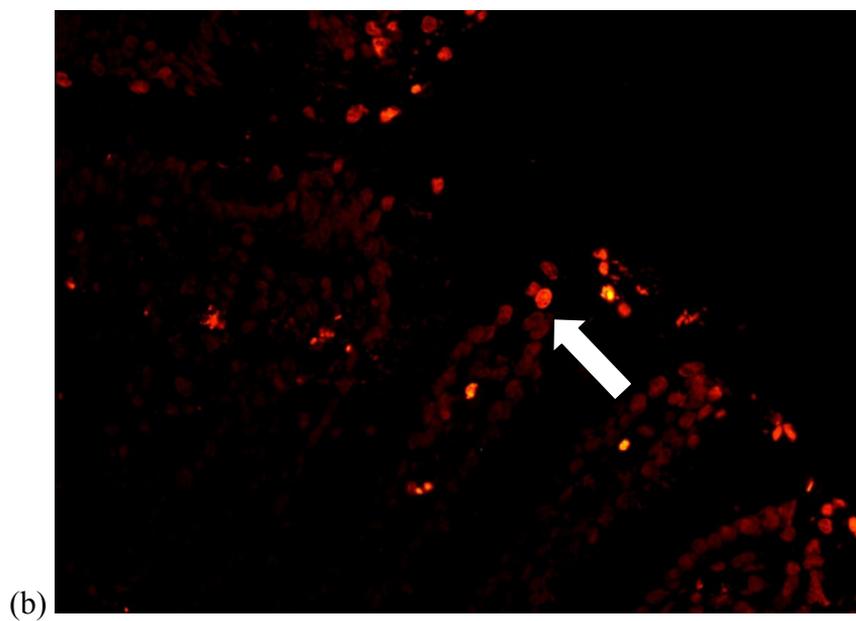
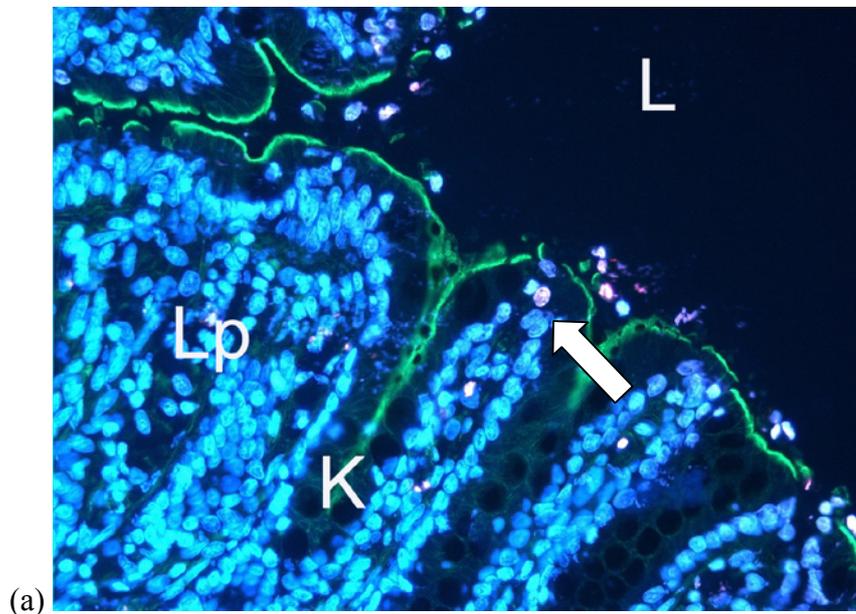
Bei den adulten Pferden betrug der Mittelwert der Apoptose-Rate am Colon descendens 0,262% ($+/-0,235\%$). Im Gegensatz dazu betrug der Mittelwert der Apoptose-Rate am Colon descendens bei den Fohlen 0,876% ($+/-0,838\%$).

Der geometrische Mittelwert der Apoptose-Rate am Colon descendens der adulten Pferde lag bei 0,186% und der Streufaktor betrug 2,534, dagegen lag der geometrische Mittelwert der Apoptose-Rate am Colon descendens der Fohlen bei 0,654% und der Streufaktor betrug 2,468 (siehe Tab. 11 und Abb. 23).

Abb. 22: TUNEL-Nachweis am Colon descendens eines Fohlens (F 3 Cold 24); L = Lumen, K = Krypte, Lp = Lamina propria, Pfeil = apoptotischer Zellkern (x 250).

a) Apoptose/TUNEL in rot, Zellkerne mit DAPI blau und Aktin mit Phalloidin grün gefärbt

b) TUNEL in rot.



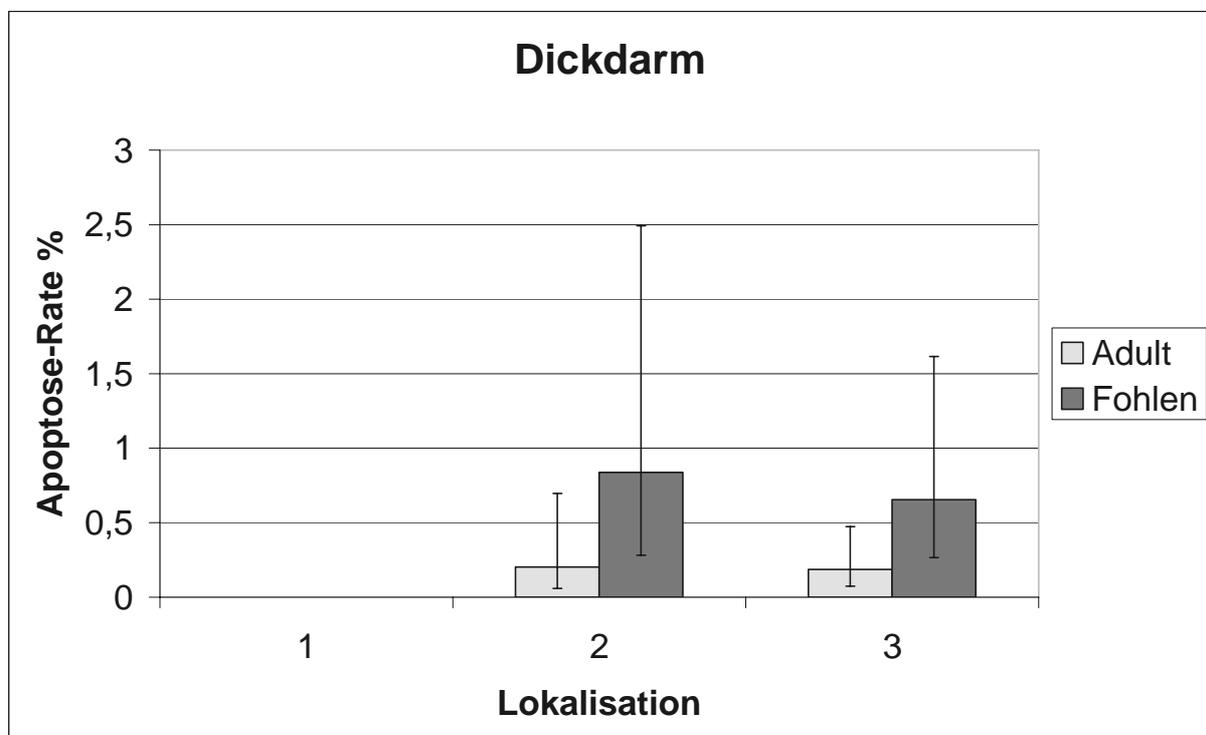
Die geometrischen Mittelwerte (geom. M) der Apoptose-Rate der einzelnen Lokalisationen des Dickdarmes adulter Pferde und Fohlen sind in der Tabelle 11 angegeben und in der Abbildung 23 dargestellt. Da bei den Fohlen nur das Caecum eines Individuums ausgewertet werden konnte, wurde auf die statistische Beurteilung des Caecums bei allen Altersklassen bzw. Proben verzichtet.

Zusammenfassend zeigt die Apoptose-Rate der Epithelzellen am Dickdarm einen Trend, sie ist bei den adulten Pferden niedriger als bei den Fohlen, ist jedoch (knapp) nicht signifikant ($p = 0,089$). Der Unterschied der Apoptose-Rate zwischen den einzelnen Lokalisationen am Dickdarm von den adulten Pferden oder Fohlen ist nicht signifikant ($p = 0,639$).

Tab. 11: Apoptose-Raten in % (geom. M) am Dickdarm von adulten Pferden und Fohlen.

	Caecum	Colon ascendens	Colon descendens
ADULT	*	0,202	0,186
FOHLEN	*	0,837	0,654

Abb. 23: Die Apoptose-Raten in % (geom. M) an den drei Lokalisationen des Dickdarmes vergleichend zwischen adulten Pferden und Fohlen. Lokalisation 1 = Caecum (fehlt); Lokalisation 2 = Colon ascendens; Lokalisation 3 = Colon descendens.



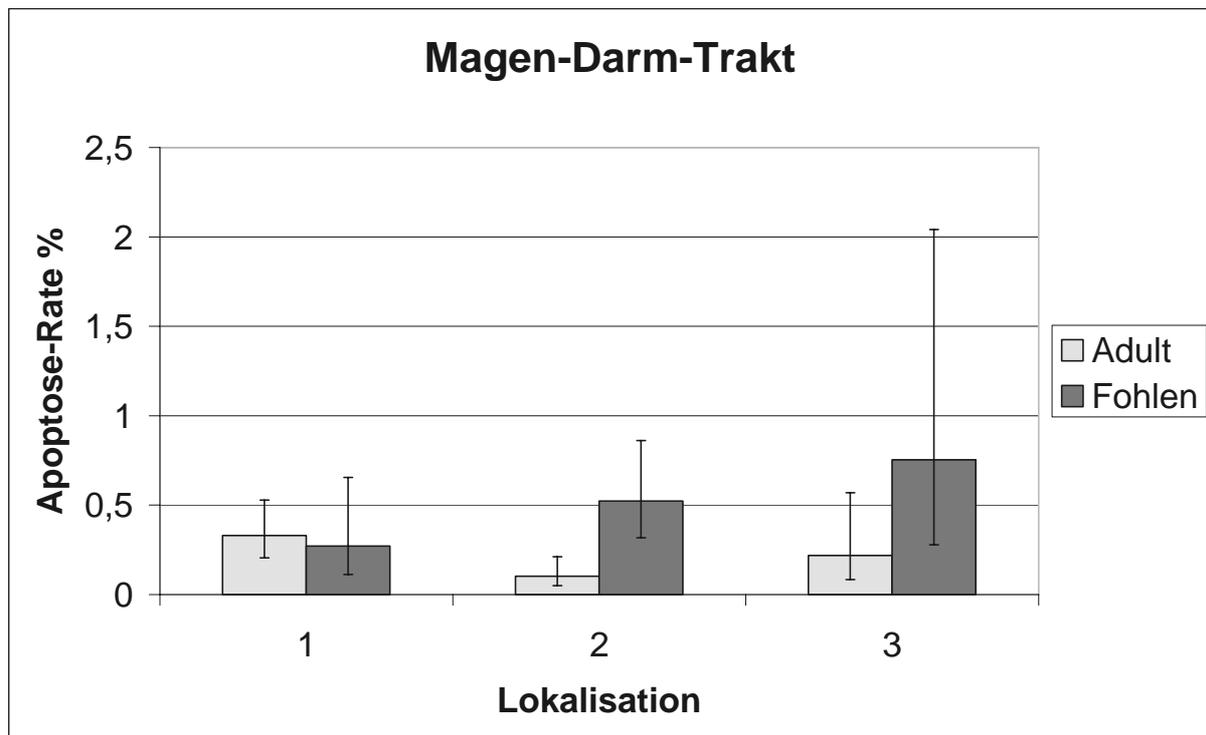
Um die Apoptose-Rate von Magen, Dünn- und Dickdarm der beiden Altersgruppen miteinander vergleichen zu können, wurden aus den Apoptose-Raten der Feinlokalisationen Mittelwerte gebildet. Unter Feinlokalisationen versteht man am Magen den Margo plicatus, Fundus und Pylorus; am Dünndarm das Duodenum, Jejunum und Ileum; am Dickdarm das Caecum, Colon ascendens und Colon descendens. Aus den geometrischen Mittelwerten der Feinlokalisationen wurde dann jeweils für Magen, Dünndarm und Dickdarm der Mittelwert gebildet (geom. M) und anschließend wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in der Tabelle 12 angegeben und in der Abbildung 24 dargestellt.

Die Unterschiede in der Apoptose-Rate der Epithelzellen gemittelt über alle Feinlokalisationen zwischen den adulten Pferden und den Fohlen, also die globalen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, sind signifikant ($p = 0,010$). Die Unterschiede zwischen der Apoptose-Rate des Magens, Dünn- oder Dickdarms jeweils bei den adulten Pferden oder bei den Fohlen, sind nicht signifikant ($p = 0,362$). Bei der Wechselwirkung zwischen dem Einfluss der Gruppe (adulte Pferde oder Fohlen) und dem Einfluss der Lokalisation (Magen, Dünndarm, Dickdarm) auf die Apoptose-Rate ist ein Trend zu erkennen, sie ist jedoch (knapp) nicht signifikant ($p = 0,064$).

Tab. 12: Apoptose-Raten in % (geom. M) gemittelt über die Feinlokalisationen am Magen-Darm-Trakt von adulten Pferden und Fohlen.

	Magen	Dünndarm	Dickdarm
ADULT	0,330	0,103	0,218
FOHLEN	0,271	0,522	0,753

Abb. 24: Die Apoptose-Raten in % (geom. M) gemittelt über die Feinlokalisationen vergleichend zwischen adulten Pferden und Fohlen. Lokalisation 1 = Magen; Lokalisation 2 = Dünndarm; Lokalisation 3 = Dickdarm.



2. Immunhistochemie

2.1. Lamin A

Mittels der Immunhistochemie wurde die Anwesenheit von Lamin A untersucht.

Die Lamine stellen sich immunhistochemisch, je nach Anschnitt des Kernes, entweder als fluoreszierender Ring um den Kern oder auch komplett über die gesamte Kernoberfläche verteilt dar.

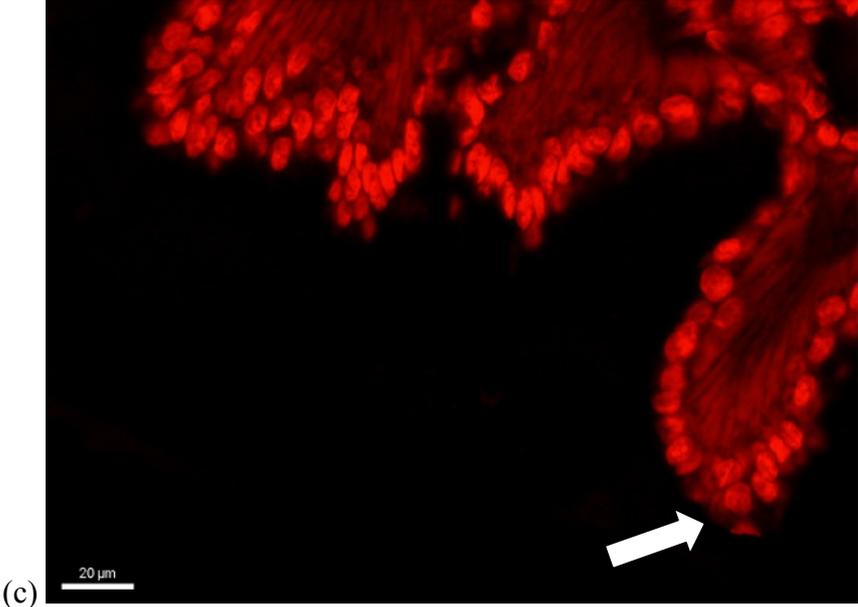
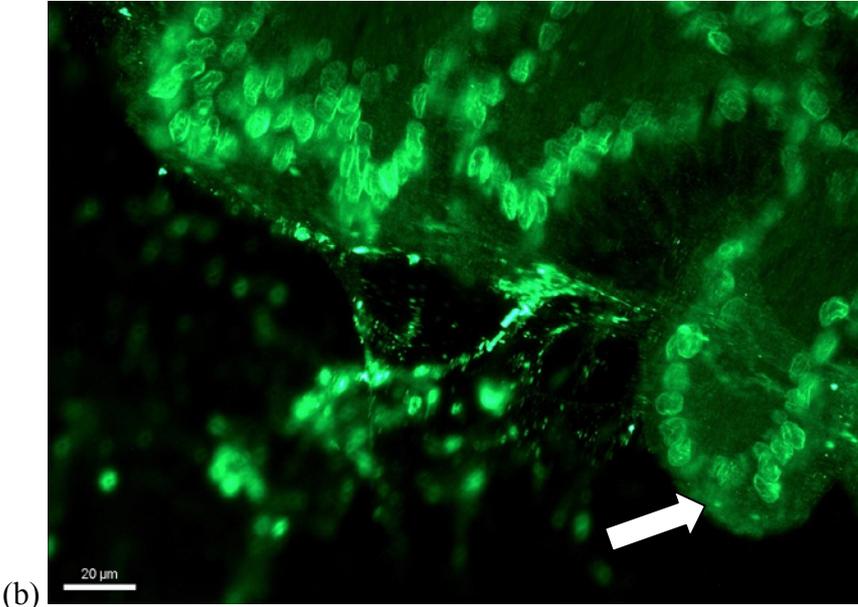
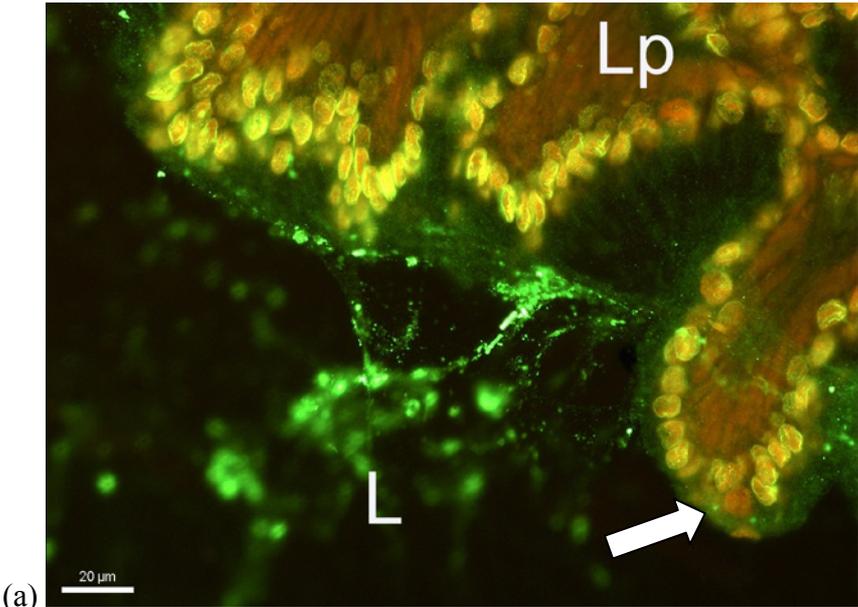
Die Abbildung 25 zeigt die Lamin A-Färbung am Beispiel des Fundus eines Fohlens (F3). Es ist sehr gut zu erkennen, dass das Lamin wie ein „Ring“ oder eine „Hülle“ um den Kern liegt. Nur wenn das Lamin nicht mehr vorhanden ist, leuchtet im Rot-Grün-Filter das Propidium-Iodid als roter Kernfarbstoff durch und zeigt so einen Lamin-negativen Zellkern an.

Abb. 25: *Lamin A-Nachweis am Fundus eines Fohlens (F 3 Fun 31); L = Lumen, Lp = Lamina propria, Pfeil = Lamin A-negativer Zellkern. Skalierung: 20 µm (x400).*

a) Gemischter Filter; Lamin A in gelbgrün, Zellkerne mit Propidium Jodid rot gefärbt

b) Grüner Filter; Lamin A in grün

c) Roter Filter; Zellkerne mit Propidium Jodid rot gefärbt.



2.1.1. Magen

2.1.1.1. Margo plicatus

Bei den adulten Pferden befanden sich die Lamin A-negativen Zellen am Margo plicatus hauptsächlich im Oberflächenepithel ($M = 41,333 \text{ ZK } (+/-18,949 \text{ ZK})$), weniger im Bereich des Isthmus ($M = 22 \text{ ZK } (+/-11,983 \text{ ZK})$) und selten im Bereich der Drüsenzellen ($M = 11,5 \text{ ZK } (+/-8,479 \text{ ZK})$) (siehe Tabellen Anhang).

Auch bei den Fohlen befand sich die Mehrzahl der Lamin A-negativen Zellen am Margo plicatus im Oberflächenepithel ($M = 33 \text{ ZK } (+/-3,605 \text{ ZK})$), es wurden auch apoptotische Zellen im Bereich des Isthmus ($M = 10 \text{ ZK } (+/-6,557 \text{ ZK})$), jedoch keine im Bereich der Drüsenregion (keine ZK) gefunden (siehe Tabellen Anhang).

Bei den adulten Pferden betrug der Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Margo plicatus 0,565% ($+/-0,291\%$). Bei den Fohlen betrug der Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Margo plicatus 0,367% ($+/-0,754\%$).

Der geometrische Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Margo plicatus der adulten Pferde lag bei 0,509%, der Streufaktor betrug 1,635. Der geometrische Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Margo plicatus der Fohlen lag bei 0,362%, der Streufaktor betrug 1,244 (siehe Tab. 13 und Abb. 26).

2.1.1.2. Fundus

Bei den adulten Pferden befanden sich die Lamin A-negativen Zellen am Fundus hauptsächlich im Oberflächenepithel ($M = 37,5 \text{ ZK } (+/-7,765 \text{ ZK})$), weniger im Bereich des Isthmus ($M = 19 \text{ ZK } (+/-8,414 \text{ ZK})$) und selten im Bereich der Drüsenzellen ($M = 7,333 \text{ ZK } (+/-5,854 \text{ ZK})$) (siehe Tabellen Anhang).

Auch bei den Fohlen befand sich die Mehrzahl der Lamin A-negativen Zellen am Fundus im Oberflächenepithel ($M = 48,667 \text{ ZK } (+/-16,197 \text{ ZK})$), es wurden aber auch wenige Zellen im Bereich des Isthmus ($M = 11,667 \text{ ZK } (+/-6,028 \text{ ZK})$) und einige vereinzelte im Bereich der Drüsenregion ($M = 1,667 \text{ ZK } (+/-2,082 \text{ ZK})$) gefunden (siehe Tabellen Anhang).

Bei den adulten Pferden betrug der Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Fundus 0,422% ($+/-0,088\%$). Bei den Fohlen betrug der Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Fundus 0,504% ($+/-0,195$).

Der geometrische Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Fundus der adulten Pferde lag bei 0,415%, der Streufaktor betrug 1,224. Der geometrische Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Fundus der Fohlen lag bei 0,479%, der Streufaktor betrug 1,486 (siehe Tab. 13 und Abb. 26).

2.1.1.3. Pylorus

Bei den adulten Pferden befanden sich die Lamin A-negativen Zellen am Pylorus hauptsächlich im Oberflächenepithel ($M = 35,5$ ZK ($\pm 16,084$ ZK)), weniger im Bereich des Isthmus ($M = 25,167$ ZK ($\pm 20,634$ ZK)) und im Bereich der Drüsenzellen ($M = 10,667$ ZK ($\pm 12,044$ ZK)) (siehe Tabellen Anhang).

Auch bei den Fohlen befand sich die Mehrzahl der Lamin A-negativen Zellen am Pylorus im Oberflächenepithel ($M = 42$ ZK ($\pm 10,440$ ZK)), weniger im Bereich des Isthmus ($M = 13,667$ ZK ($\pm 8,144$ ZK)) und vereinzelt im Bereich der Drüsenregion ($M = 2$ ZK ($\pm 2,646$ ZK)) (siehe Tabellen Anhang).

Bei den adulten Pferden betrug der Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Pylorus 0,445% ($\pm 0,237\%$). Bei den Fohlen betrug der Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Pylorus 0,501% ($\pm 0,180\%$).

Der geometrische Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Pylorus der adulten Pferde lag bei 0,396%, der Streufaktor betrug 1,685. Der geometrische Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Pylorus der Fohlen lag bei 0,481%, der Streufaktor betrug 1,397 (siehe Tab. 13 und Abb. 26).

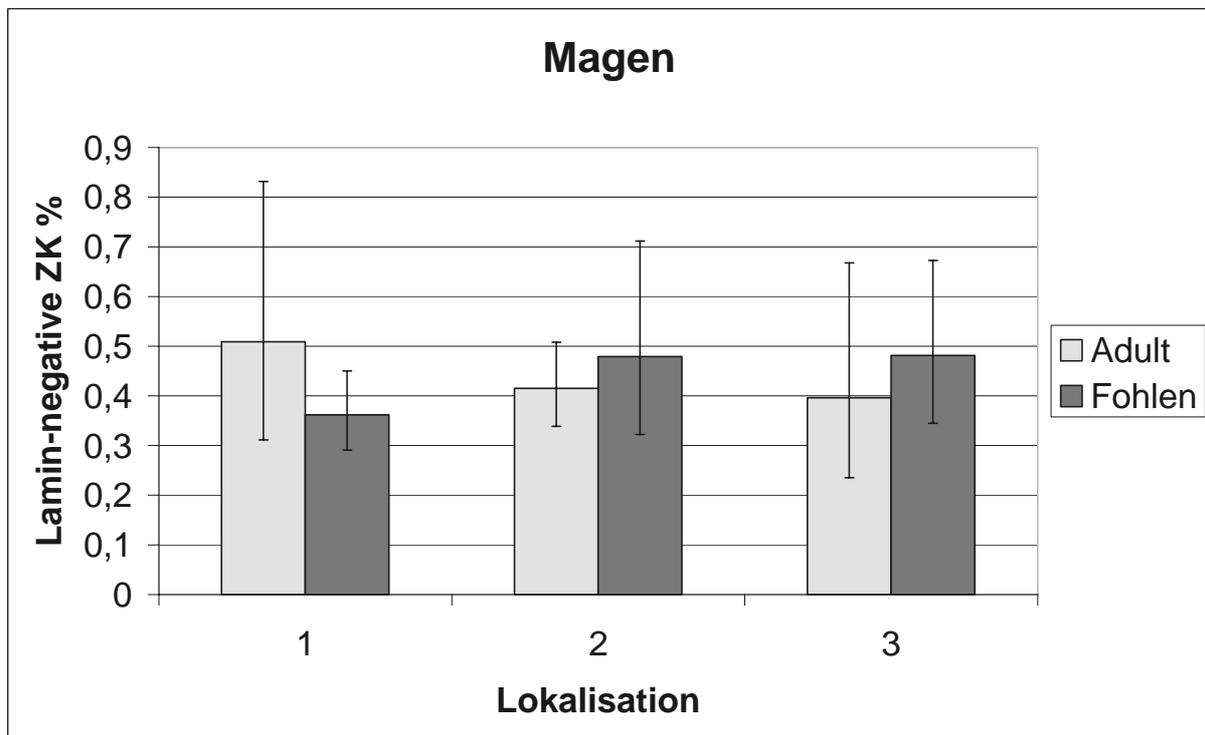
Die geometrischen Mittelwerte (geom. M) der Rate der Lamin A-negativen ZK des Epithels der einzelnen Lokalisationen des Magens adulter Pferde und Fohlen sind in der Tabelle 13 angegeben und in der Abbildung 26 dargestellt.

Zusammenfassend unterscheidet sich die Rate der Lamin A-negativen ZK des Epithels an den einzelnen Lokalisationen des Magens der adulten Pferde nicht signifikant von der der Fohlen ($p = 0,996$). Auch der Unterschied der Rate der Lamin A-negativen ZK des Epithels zwischen den einzelnen Lokalisationen am Magen von adulten Pferden oder Fohlen ist nicht signifikant ($p = 0,977$).

Tab. 13: Raten der Lamin A-negativen ZK in % (geom. M) am Magen von adulten Pferden und Fohlen.

	Margo plicatus	Fundus	Pylorus
ADULT	0,509	0,415	0,396
FOHLEN	0,362	0,479	0,481

Abb. 26: Die Lamin A-negativen ZK in % (geom. M) an den drei Lokalisationen des Magens vergleichend zwischen adulten Pferden und Fohlen. Lokalisation 1 = Margo plicatus; Lokalisation 2 = Fundus; Lokalisation 3 = Pylorus.



2.1.2. Dünndarm

2.1.2.1. Duodenum

Bei den adulten Pferden befanden sich die Lamin A-negativen Zellen am Duodenum hauptsächlich im Bereich der Zottenspitze ($M = 59,333 \text{ ZK } (+/-26,553 \text{ ZK})$), weniger im Bereich der Zottenmitte ($M = 47,5 \text{ ZK } (+/-23,356 \text{ ZK})$) und im Bereich der Zottenbasis ($M = 31,333 \text{ ZK } (+/-15,214 \text{ ZK})$). Es wurden aber auch einige im Bereich der Kryptenoberfläche ($M = 11,333 \text{ ZK } (+/-1,033 \text{ ZK})$), der Kryptenmitte ($M = 5,167 \text{ ZK } (+/-3,971 \text{ ZK})$) und der Kryptenbasis ($M = 2,5 \text{ ZK } (+/-3,781 \text{ ZK})$) gefunden (siehe Tabellen Anhang).

Auch bei den Fohlen befand sich die Mehrzahl der Lamin A-negativen Zellen am Duodenum im Bereich der Zottenspitze ($M = 45,333 \text{ ZK } (+/-2,887 \text{ ZK})$), weniger im Bereich der Zottenmitte ($M = 33,667 \text{ ZK } (+/-0,577 \text{ ZK})$) und der Zottenbasis ($M = 19,667 \text{ ZK } (+/-3,055 \text{ ZK})$). Es wurden aber auch einige im Bereich der Kryptenoberfläche ($M = 10 \text{ ZK } (+/-3,605 \text{ ZK})$), der Kryptenmitte ($M = 4,667 \text{ ZK } (+/-2,517 \text{ ZK})$) und der Kryptenbasis ($M = 1 \text{ ZK } (+/-1 \text{ ZK})$) gefunden (siehe Tabellen Anhang).

Bei den adulten Pferden betrug der Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Duodenum 1,584% ($+/-0,471\%$). Bei Fohlen betrug der Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Duodenum 1,240% ($+/-0,072\%$).

Der geometrische Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Duodenum der adulten Pferde lag bei 1,527%, der Streufaktor betrug 1,344. Der geometrische Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Duodenum der Fohlen lag bei 1,239%, der Streufaktor betrug 1,059 (siehe Tab. 14 und Abb. 27).

2.1.2.2. Jejunum

Bei den adulten Pferden befanden sich die Lamin A-negativen Zellen am Jejunum hauptsächlich im Bereich der Zottenspitze ($M = 107,5 \text{ ZK } (+/-29,541 \text{ ZK})$), weniger im Bereich der Zottenmitte ($M = 83,667 \text{ ZK } (+/-20,047 \text{ ZK})$) und im Bereich der Zottenbasis ($M = 48,833 \text{ ZK } (+/-12,576 \text{ ZK})$). Es wurden aber auch einige im Bereich der Kryptenoberfläche ($M = 14,833 \text{ ZK } (+/-8,909 \text{ ZK})$), der Kryptenmitte ($M = 4,833 \text{ ZK } (+/-4,916 \text{ ZK})$) und der Kryptenbasis ($M = 0,667 \text{ ZK } (+/-1,033 \text{ ZK})$) gefunden (siehe Tabellen Anhang).

Auch bei den Fohlen befand sich die Mehrzahl der Lamin A-negativen Zellen am Jejunum im Bereich der Zottenspitze ($M = 86,333 \text{ ZK } (+/-48,911 \text{ ZK})$), weniger im Bereich der Zottenmitte ($M = 61,333 \text{ ZK } (+/-32,716 \text{ ZK})$) und im Bereich der Zottenbasis ($M = 38,333 \text{ ZK } (+/-23,714 \text{ ZK})$). Es wurden auch einige im Bereich der Kryptenoberfläche ($M = 17,667 \text{ ZK } (+/-13,051 \text{ ZK})$) und der Kryptenmitte ($M = 0,667 \text{ ZK } (+/-1,155 \text{ ZK})$), jedoch keine im Bereich der Kryptenbasis (keine ZK) gefunden (siehe Tabellen Anhang).

Bei den adulten Pferden betrug der Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Jejunum 2,258% ($+/-0,355\%$). Im Gegensatz dazu betrug der Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Jejunum bei den Fohlen 1,898% ($+/-1,076\%$).

Der geometrische Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Jejunum der adulten Pferde lag bei 2,234% und der Streufaktor betrug 1,175, dagegen lag der geometrische Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Jejunum der Fohlen bei 1,655% und der Streufaktor betrug 1,975 (siehe Tab. 14 und Abb. 27).

2.1.2.3. Ileum

Bei den adulten Pferden befanden sich die Lamin A-negativen Zellen am Ileum hauptsächlich im Bereich der Zottenspitze ($M = 98,667 \text{ ZK } (+/-52,152 \text{ ZK})$), weniger im Bereich der Zottenmitte ($M = 88 \text{ ZK } (+/-36,682 \text{ ZK})$) und im Bereich der Zottenbasis ($M = 58 \text{ ZK } (+/-25,706 \text{ ZK})$). Es wurden aber auch einige im Bereich der Kryptenoberfläche ($M = 26,833 \text{ ZK } (+/-13,182 \text{ ZK})$), der Kryptenmitte ($M = 5,667 \text{ ZK } (+/-3,670 \text{ ZK})$) und der Kryptenbasis ($M = 0,333 \text{ ZK } (+/-0,816 \text{ ZK})$) gefunden (siehe Tabellen Anhang).

Auch bei den Fohlen befand sich die Mehrzahl der Lamin A-negativen Zellen am Ileum im Bereich der Zottenspitze ($M = 79,333 \text{ ZK } (+/-29,905 \text{ ZK})$), weniger im Bereich der Zottenmitte ($M = 55,667 \text{ ZK } (+/-19,502 \text{ ZK})$) und im Bereich der Zottenbasis ($M = 33,333 \text{ ZK } (+/-7,371 \text{ ZK})$). Es wurden auch einige im Bereich der Kryptenoberfläche ($M = 16 \text{ ZK } (+/-4,359 \text{ ZK})$) und der Kryptenmitte ($M = 2 \text{ ZK } (+/-2,646 \text{ ZK})$), jedoch keine im Bereich der Kryptenbasis (keine ZK) gefunden (siehe Tabellen Anhang).

Bei den adulten Pferden betrug der Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Ileum 2,248% ($+/-0,666\%$). Im Gegensatz dazu betrug der Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Ileum bei den Fohlen 1,550% ($+/-0,515\%$).

Der geometrische Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Ileum der adulten Pferde lag bei 2,168% und der Streufaktor betrug 1,342, dagegen lag der geometrische Mittelwert der

Lamin A-negativen ZK am Ileum der Fohlen bei 1,494% und der Streufaktor betrug 1,389 (siehe Tab. 14 und Abb. 27).

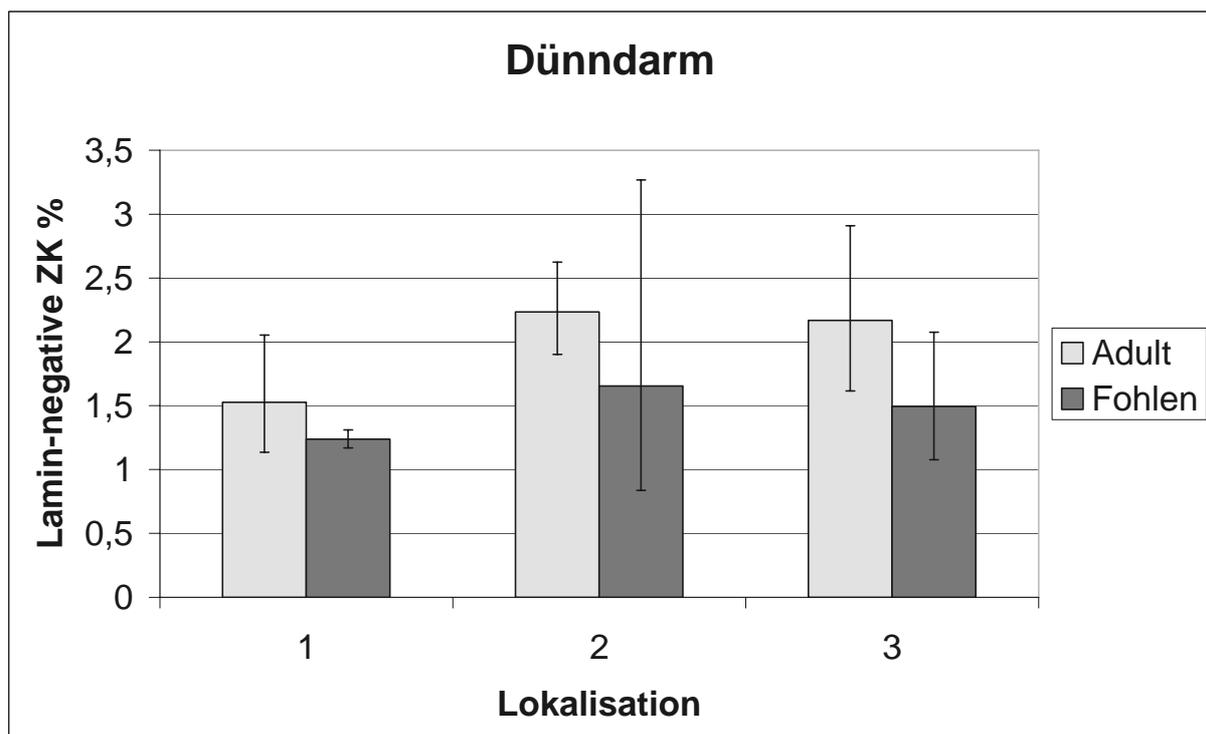
Die geometrischen Mittelwerte (geom. M) der Rate der Lamin A-negativen ZK des Epithels der einzelnen Lokalisationen des Dünndarmes adulter Pferde und Fohlen sind in der Tabelle 14 angegeben und in der Abbildung 27 dargestellt.

Zusammenfassend unterscheidet sich die Rate der Lamin A-negativen ZK des Epithels des Dünndarmes der adulten Pferde nicht signifikant von der der Fohlen ($p = 0,135$). Der Unterschied der Rate der Lamin A-negativen ZK des Epithels zwischen den einzelnen Lokalisationen am Dünndarm von adulten Pferden oder Fohlen ist signifikant ($p = 0,042$).

Tab. 14: Raten der Lamin A-negativen ZK in % (geom. M) am Dünndarm von adulten Pferden und Fohlen.

	Duodenum	Jejunum	Ileum
ADULT	1,527	2,234	2,168
FOHLEN	1,239	1,655	1,494

Abb. 27: Die Lamin A-negativen ZK in % (geom. M) an den drei Lokalisationen des Dünndarmes vergleichend zwischen adulten Pferden und Fohlen. Lokalisation 1 = Duodenum; Lokalisation 2 = Jejunum; Lokalisation 3 = Ileum.



2.1.3. Dickdarm

2.1.3.1. Caecum

Bei den adulten Pferden befanden sich die Lamin A-negativen Zellen am Caecum hauptsächlich im Oberflächenepithel ($M = 98,167 \text{ ZK } (+/-48,738 \text{ ZK})$), weniger im Bereich der Kryptenmitte ($M = 39,167 \text{ ZK } (+/-26,873 \text{ ZK})$) und der Kryptenbasis ($M = 17,167 \text{ ZK } (+/-13,644 \text{ ZK})$) (siehe Tabellen Anhang).

Bei dem einen ausgewerteten Fohlen befand sich die Mehrzahl der Lamin A-negativen Zellen am Caecum im Oberflächenepithel (44 ZK), weniger im Bereich der Kryptenmitte (26 ZK) und im Bereich der Kryptenbasis (4 ZK) (siehe Tabellen Anhang).

Bei den adulten Pferden betrug der Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Caecum 2,531% (+/-1,093%). Bei dem Fohlen betrug die Lamin A-negativen ZK am Caecum 1,864% (+/-0%).

2.1.3.2. Colon ascendens

Bei den adulten Pferden befanden sich die Lamin A-negativen Zellen am Colon ascendens hauptsächlich im Oberflächenepithel ($M = 122,333 \text{ ZK } (+/-45,368 \text{ ZK})$), weniger im Bereich der Kryptenmitte ($M = 51 \text{ ZK } (+/-15,595 \text{ ZK})$) und der Kryptenbasis ($M = 13,333 \text{ ZK } (+/-11,605 \text{ ZK})$) (siehe Tabellen Anhang).

Bei den Fohlen befand sich die Mehrzahl der Lamin A-negativen Zellen am Colon ascendens im Oberflächenepithel ($M = 118,333 \text{ ZK } (+/-54,012 \text{ ZK})$), weniger im Bereich der Kryptenmitte ($M = 52,667 \text{ ZK } (+/-18,717 \text{ ZK})$) oder der Kryptenbasis ($M = 19,333 \text{ ZK } (+/-10,017 \text{ ZK})$) (siehe Tabellen Anhang).

Bei den adulten Pferden betrug der Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Colon ascendens 2,411% (+/-0,363%). Im Gegensatz dazu betrug der Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Colon ascendens bei den Fohlen 3,046% (+/-1,237%).

Der geometrische Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Colon ascendens der adulten Pferde lag bei 2,387% und der Streufaktor betrug 1,171, dagegen lag der geometrische Mittelwert der Lamin A-negativen am Colon ascendens der Fohlen bei 2,892% und der Streufaktor betrug 1,473 (siehe Tab. 15 und Abb. 28).

2.1.3.3. Colon descendens

Bei den adulten Pferden befanden sich die Lamin A-negativen Zellen am Colon descendens hauptsächlich im Oberflächenepithel ($M = 84,667 \text{ ZK } (+/-40,663 \text{ ZK})$), weniger im Bereich der Kryptenmitte ($M = 48,167 \text{ ZK } (+/-37,552 \text{ ZK})$) und im Bereich der Kryptenbasis ($M = 11,333 \text{ ZK } (+/-3,445 \text{ ZK})$) (siehe Tabellen Anhang).

Bei den Fohlen befand sich die Mehrzahl der Lamin A-negativen Zellen am Colon descendens im Oberflächenepithel ($M = 119,667 \text{ ZK } (+/-67,278 \text{ ZK})$), weniger im Bereich der Kryptenmitte ($M = 43,667 \text{ ZK } (+/-10,693 \text{ ZK})$) und der Kryptenbasis ($M = 10 \text{ ZK } (+/-2,646 \text{ ZK})$) (siehe Tabellen Anhang).

Bei den adulten Pferden betrug der Mittelwert der Lamin A-negativen Zellkerne am Colon descendens 1,588% ($+/-0,322\%$). Im Gegensatz dazu betrug der Mittelwert der Lamin A-negativen Zellkerne am Colon descendens bei den Fohlen 2,510% ($+/-1,167\%$).

Der geometrische Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Colon descendens der adulten Pferde lag bei 1,560% und der Streufaktor betrug 1,229, dagegen lag der geometrische Mittelwert der Lamin A-negativen ZK am Colon descendens der Fohlen bei 2,352% und der Streufaktor betrug 1,536 (siehe Tab. 15 und Abb. 28).

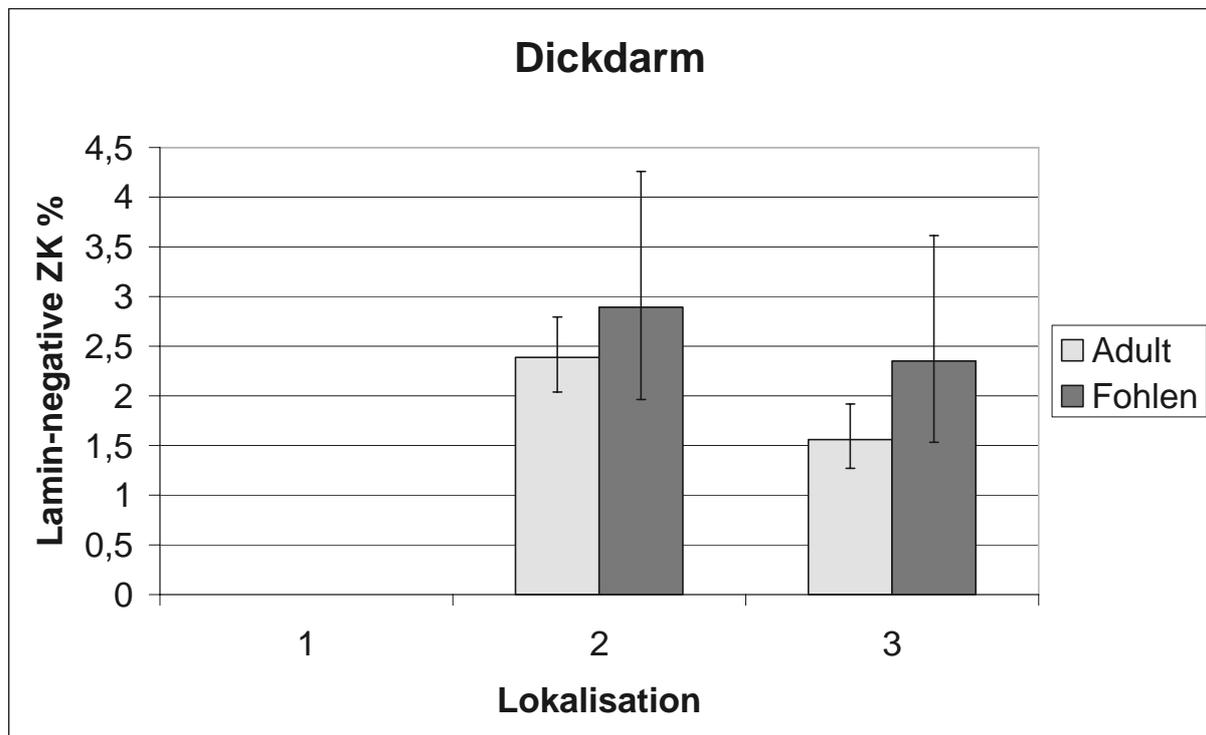
Die geometrischen Mittelwerte (geom. M) der Rate der Lamin A-negativen ZK des Epithels der einzelnen Lokalisationen des Dickdarmes adulter Pferde und Fohlen sind in der Tabelle 15 angegeben und in der Abbildung 28 dargestellt.

Zusammenfassend zeigt die Rate der Lamin A-negativen ZK des Epithels am Dickdarm einen Trend. Sie ist bei den adulten Pferden niedriger als bei den Fohlen, wobei dieser Unterschied jedoch nicht signifikant ist ($p = 0,140$). Der Unterschied der Rate der Lamin A-negativen ZK des Epithels zwischen den einzelnen Lokalisationen am Dickdarm von adulten Pferden oder Fohlen ist hoch signifikant ($p = 0,001$).

Tab. 15: Raten der Lamin A-negativen ZK in % (geom. M) am Dickdarm von adulten Pferden und Fohlen.

	Caecum	Colon ascendens	Colon descendens
ADULT	*	2,387	1,560
FOHLEN	*	2,892	2,352

Abb. 28: Die Lamin A-negativen ZK in % (geom. M) an den drei Lokalisationen des Dickdarmes vergleichend zwischen adulten Pferden und Fohlen. Lokalisation 1 = Caecum (fehlt); Lokalisation 2 = Colon ascendens; Lokalisation 3 = Colon descendens.



Die Raten der Lamin A-negativen ZK des Epithels gemittelt über die Feinlokalisationen und nach Durchführung der zweifaktoriellen Varianzanalyse sind in der Tabelle 16 angegeben und in der Abbildung 29 dargestellt.

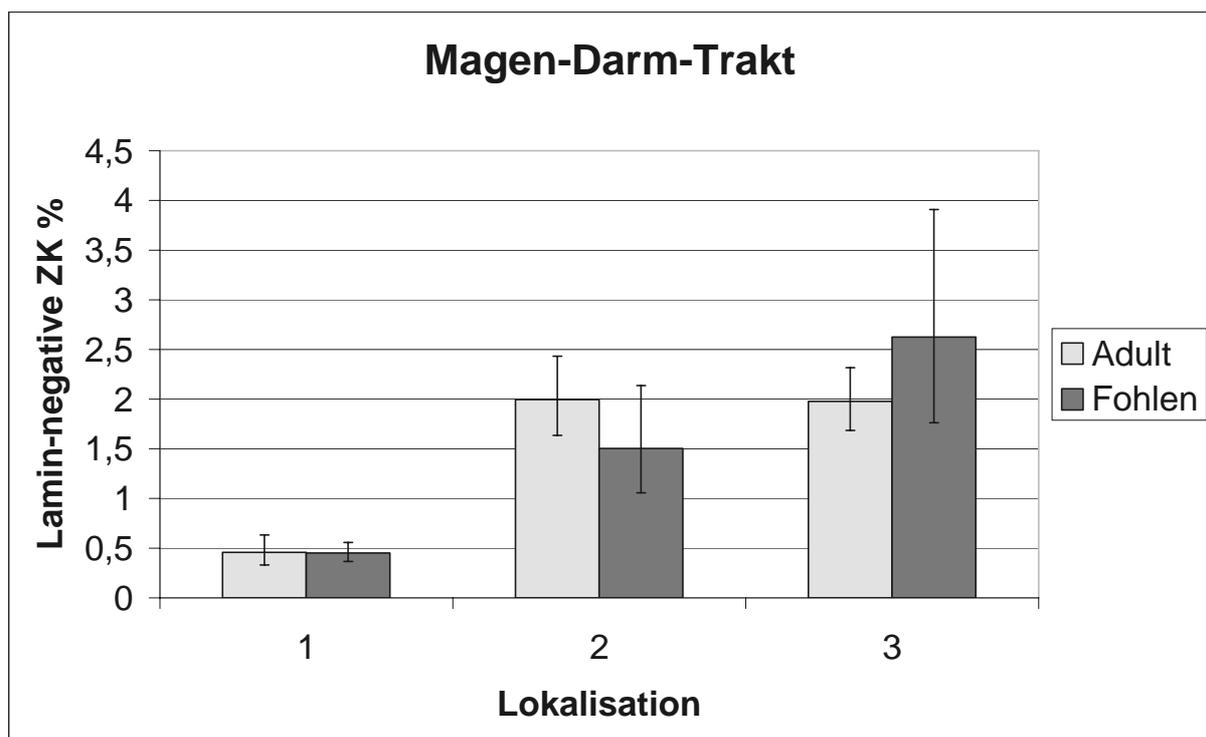
Die Unterschiede in der Rate der Lamin A-negativen ZK des Epithels gemittelt über alle Lokalisationen zwischen den adulten Pferden und den Fohlen, also die globalen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, sind nicht signifikant ($p = 0,963$). Die Unterschiede zwischen der Rate der Lamin A-negativen ZK des Epithels des Magens, Dün- oder Dickdarms jeweils bei den adulten Pferden oder bei den Fohlen sind dagegen hoch signifikant ($p = 0,001$). Die Wechselwirkung zwischen dem Einfluss der Gruppe (adulte Pferde oder Fohlen) und dem

Einfluss der Lokalisation (Magen, Dünndarm, Dickdarm) auf die Rate der Lamin A-negativen ZK ist nicht signifikant ($p = 0,130$).

Tab.16: Raten der Lamin A-negativen ZK in % (geom. M) gemittelt über die Feinlokalisationen am Magen-Darm-Trakt von adulten Pferden und Fohlen.

	Magen	Dünndarm	Dickdarm
ADULT	0,457	1,995	1,977
FOHLEN	0,451	1,503	2,624

Abb. 29: Die Lamin A-negativen ZK in % (geom. M) gemittelt über die Feinlokalisationen vergleichend zwischen adulten Pferden und Fohlen. Lokalisation 1 = Magen; Lokalisation 2 = Dünndarm; Lokalisation 3 = Dickdarm.



2.2. PARP

Zum Nachweis der gespaltenen PARP-Fragmente im Verlauf der Apoptose wurden einige Gefrierschnitte nach dem Protokoll unter Kapitel III., Punkt 4.2.1. gefärbt. Der Antikörper (siehe Kapitel III., Punkt 4.1.2.1.) funktionierte am Pferdegewebe, jedoch war das Signal nicht immer so klar wie bei der Färbung mit Lamin A, sodass keine weitere Färbung und Auswertung vorgenommen wurde.

2.3. Weitere Antikörper

Zum Nachweis von aktivierter Kaspase-3 im Zuge der Apoptose-Kaskade wurden zwei Kaspasen-3 Antikörper getestet (siehe Kapitel III., Punkt 4.1.2.1.). Beide Antikörper sind für Humangewebe geeignet. Der „Cleaved Caspase-3“ Antikörper von Biolabs ist ein Antikörper, der an Humangewebe sehr gute Ergebnisse erzielt, am Magen- und Darmgewebe des Pferdes allerdings keine Signale ergab.

Zum Nachweis von Lamin B wurden drei verschiedene Lamin B Antikörper am Pferdegewebe getestet (siehe Kapitel III., Punkt 4.1.2.1.). Zwei der Antikörper waren zum Nachweis von Lamin B1. Bei beiden konnten am Magen- und Darmgewebe des Pferdes keine Signale erzielt werden, obwohl der Lamin B1 Antikörper von Serotec für einige Spezies (Ratte, Maus, Hund, Schaf, Ziege, Rind) geeignet ist. Auch mit dem Lamin B2 Antikörper konnte am Magen- und Darmgewebe des Pferdes kein Signal erzielt werden.

Zur Abgrenzung von Leukozyten, die z.T. kein Lamin A besitzen (siehe Kapitel V., Punkt 2.2.), wurde ein Antikörper getestet, der speziell Pferdeleukozyten markieren soll (siehe Kapitel III., Punkt 4.1.2.1.). Es konnten auch mit diesem speziellen Anti-Equine CD11a/CD18 Antikörper keine brauchbaren Ergebnisse erzielt werden.

Aus dem selben Grund wie oben genannt wurden zwei weitere Leukozyten-markierende Antikörper (siehe Kapitel III., Punkt 4.1.2.1.) an Magen- und Darmgewebe des Pferdes getestet. Auch hier konnten keine brauchbaren Ergebnisse erzielt werden.

Um die Zuordnung der Lamin A-negativen Zellkerne zu den Epithelzellen zu erleichtern, wurde ein Antikörper für Desmoplakin (siehe Kapitel III., Punkt 4.1.2.1.) getestet. Dabei

werden die Desmosomen markiert, die nur in Epithelzellen vorkommen. Der Antikörper funktionierte gut bei Aceton-Fixierung, aber sehr schwach bei PFA-Fixierung. Da Aceton das empfindliche Magen- und Darmgewebe im Gefrierschnitt weitgehend zerstörte, konnte der Antikörper nicht verwendet werden.

Aus dem selben Grund wie die Verwendung eines Antikörpers für Desmoplakin wurde das Markieren der Epithelzellen mit einem Cytokeratin 18 Antikörper (siehe Kapitel III., Punkt 4.1.2.1.) getestet. Cytokeratin 18 kommt nur bei Epithelzellen vor. Der Antikörper gab an Magen- und Darmgewebe des Pferdes keine Signale.

3. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Apoptose-Rate der Epithelzellen des Magen-Darm-Traktes bei Pferden verschiedener Altersgruppen ermittelt.

Zusammenfassend war die Apoptose-Rate am Magen bei den adulten Pferden im Vergleich zu den Fohlen relativ einheitlich. Die Quantifizierung der Apoptose-Rate am Dünndarm ergab bei den adulten Pferden signifikant niedrigere Werte als bei den Fohlen. Am Dickdarm war die Apoptose-Rate bei den adulten Pferden ebenfalls niedriger als bei den Fohlen, der Unterschied war jedoch knapp nicht signifikant.

Die Rate der Lamin A-negativen ZK am Magen war bei den adulten Pferden im Vergleich zu den Fohlen annähernd gleich. Bei der Quantifizierung der Lamin A-negativen ZK ergaben sich für Dün- und Dickdarm keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Allerdings waren die Unterschiede in der Rate der Lamin A-negativen ZK zwischen den Lokalisationen bei den adulten Pferden wie auch bei den Fohlen hoch signifikant.

V. Diskussion

In dieser Arbeit wurde erstmalig die Apoptose-Rate des Magen-, Dünn- und Dickdarmepithels von adulten Pferden und von Fohlen untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Apoptose am Epithel des Magen-Darm-Traktes des Pferdes nachzuweisen, die Apoptose-Raten der verschiedenen Lokalisationen zu ermitteln und diese sowohl untereinander als auch zwischen den Altersgruppen zu vergleichen. Eine weitere Intention bestand darin, die Lage der apoptotischen Zellen im equinen Magen- und Darmepithel der jeweiligen Lokalisationen mit derjenigen anderer Spezies zu vergleichen.

1. Material

1.1. Adulte Pferde

Zur Probengewinnung wurde der Magen-Darm-Trakt gesunder, adulter Pferde verwendet. Es wurde dabei darauf geachtet, die Zeitspanne zwischen dem Tod der Tiere, der Probenentnahme und der anschließenden Kryokonservierung möglichst gering zu halten. Bei Verwendung eines gesamten Magen-Darm-Traktes pro Individuum kam es aufgrund des zwangsläufig erhöhten Zeitaufwandes zu starken autolytischen Artefakten. Vor allem die Erhaltung der Zotten des Dünndarmes stellte eine große Schwierigkeit dar. Daher wurde dazu übergegangen, jeweils nur den Magen, den Dünndarm oder den Dickdarm eines Individuums zu beproben, um unbeschädigte Schleimhautproben zu erhalten.

1.2. Fohlen

Bei der Probengewinnung wurde darauf geachtet, nur Fohlen zu beproben, deren Magen-Darm-Trakt makro- und mikroskopisch unauffällig war. Allerdings können auch Erkrankungen, die nicht den Magen-Darm-Trakt betreffen, die Ergebnisse bezüglich der Apoptose-Rate verfälschen. Es ist bekannt, dass Schock infolge von Trauma und die damit verbundene Ischämie am Magen-Darm-Trakt die Apoptose-Rate vor allem am Darmepithel erhöht (Hotchkiss et al., 2000; siehe Kapitel II., Punkt 5.3.). Bestimmte Medikamente wie z.B. NSAIDs können die Apoptose-Rate des Magen- und Darmepithels beeinflussen bzw. erhöhen (Richter et al., 2002; siehe Kapitel II., Punkt 5.8.).

Im Zeitraum der Untersuchungen standen nur 3 Fohlen zur Beprobung zur Verfügung.

2. Methoden

2.1. TUNEL-Methode

In der vorliegenden Studie wurde der Anteil apoptotischer Zellen mit Hilfe der TUNEL-Methode und der Lamin A-Färbung ermittelt. Diese Kombination zweier Methoden entspricht den Empfehlungen von Schaper et al. (1999). Sie reagieren damit auf die aktuelle Kritik an der TUNEL-Methode, die unter bestimmten Umständen nekrotische Zellen (Ohno et al., 1998) und Kerne mit DNA-Reparatur (Kanoh et al., 1999) markiert. Trotzdem gilt die Methode nach sorgfältiger Standardisierung und in Verbindung mit einer anderen Methode als zuverlässig.

Einige Arbeitsgruppen haben die TUNEL-Methode zum Nachweis apoptotischer Zellen am Magen- und Darmepithel verschiedener Spezies eingesetzt (Gavrieli et al., 1992; Coopersmith & Gordon, 1997; Wada et al., 1997; Guy-Grand et al., 1998; Pompeiano et al., 1998; Yao et al., 1998; Houghton et al., 1999) und auch für den Magen-Darm-Trakt des Pferdes hat sich diese Nachweismethode als sehr gut erwiesen. Da apoptotische Lymphozyten in der TUNEL-Färbung auch positiv markiert werden und in der Lamina propria viele Lymphozyten vorhanden sind, von denen einige Apoptose zeigen (Gavrieli et al., 1992), wird Darmgewebe verschiedener Spezies häufig als Positivkontrolle für die TUNEL-Methode verwendet. Daher gab es bei jedem Schnitt die Möglichkeit der Positivkontrolle durch einige positiv markierte Lymphozyten in der Lamina propria.

Um falsch positive Markierungen zu vermeiden, dürfen die Gefrierschnitte nicht länger als 5 Minuten bei Raumtemperatur trocknen und müssen dann unverzüglich im Fixationsmittel (PFA) fixiert werden. Die Aussage von Hall et al. (1994), dass erst nach 15 Minuten fixierte Schnitte sehr viel mehr positiv markierte Zellkerne zeigen, konnte hiermit bestätigt werden. Weiterhin muss darauf geachtet werden, dass es während der verschiedenen Färbeschritte nicht zur Austrocknung der Ränder des Schnittes kommt, da dies ebenso zu falsch positiven Markierungen führt.

2.2. Lamin A-Färbung

Die Lamin A-Färbung wurde bisher am Magen-Darm-Gewebe des Pferdes noch nicht beschrieben. Diese Färbung dient der Ergänzung der TUNEL-Methode und lässt sich am Magen-Darm-Gewebe des Pferdes gut durchführen.

Fast alle somatischen Zellen der Säugetiere exprimieren Lamin A, Lamin C (Lamin A/C) und Lamin B in ihrer Kernlamina (Rober et al., 1990a). Jedoch gibt es hier einige Ausnahmen, denn hämatopoetische Zellen des Blutes und des Knochenmarkes von Säugetieren exprimieren normalerweise kein Lamin A/C, sondern nur Lamin B (Paulin-Levasseur et al., 1988; Rober et al., 1990a; Rober et al., 1990b). Auch beim Menschen exprimieren einige hämatopoetische Zellen kein Lamin A/C (Guilly et al., 1987). Außerdem kann bei menschlichen Fibroblasten je nach Stand des Zellzyklus eine Maskierung der Epitope des Lamin A- und Lamin C-Proteins stattfinden, so dass die Antikörper nicht binden können (Dyer et al., 1997). Nach den Ergebnissen von Rober und Sauter et al. (1990) exprimieren T- und B-Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten der Maus kein Lamin A/C. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit ist dies (wahrscheinlich) auch beim Pferd der Fall, wobei zwischen den Zellen des hämatopoetischen Systems nicht weiter differenziert wurde. Es befanden sich in der Lamina propria einige Lamin A-negative Zellen bzw. Zellkerne, die als Lymphozyten oder Fibrozyten identifiziert wurden und nicht apoptotisch waren. Aus diesem Grunde konnten bei der Auswertung möglicherweise intraepithelial gelegene Lamin A-negative Lymphozyten als falsch-negativ mitgezählt werden.

Trotz dieser möglichen Fehlerquelle wurde die Lamin A-Färbung als zweite Methode gewählt, da die Färbung zum einen auch mit PFA-Fixierung gut am Magen-Darm-Gewebe des Pferdes durchführbar war und zum anderen Lamin A während der DNA-Kondensation bei der Apoptose-Kaskade gespalten wird (Broers et al., 2002). Auch Oberhammer et al. beschreiben 1994, dass während der Apoptose-Kaskade die Chromatin-Kondensation parallel zur DNA-Fragmentation stattfindet und dass diese Chromatin-Kondensation wiederum mit der Spaltung der Lamina A+B vergesellschaftet ist.

Der Nachweis von PARP bzw. PARP-Bruchstücken wurde wegen der weniger deutlichen Markierung am Magen-Darm-Gewebe des Pferdes ausgeschlossen. Außerdem belegt eine Studie von Casiano et al. (1998), dass PARP nicht nur ausschließlich während der Apoptose, sondern unter Umständen auch während der Nekrose gespalten wird.

2.3. Auswertung der Methoden

Die Erhaltung der Schleimhaut beim Einfrieren der Proben stellte sich als besonders schwierig dar. Vor allem am Dünndarm war es nicht möglich, die Zotten durch einfaches Schockgefrieren der Probenstücke in flüssigem Stickstoff zu erhalten. Erst das Einfrieren in gekühltem Methylbutan mit einer Schutzschicht aus Tissue Tec im Zusammenhang mit einer möglichst kurzen Zeitspanne zwischen Tod der Tiere und Probenentnahme führte zu vollständig erhaltenen Zotten.

Für beide Methoden wurden bei der statistischen Auswertung die Apoptose-Raten von Magen, Dün- und Dickdarm innerhalb der Gruppen verglichen, um die Unterschiede bezüglich der Lokalisationen aufzuzeigen. Weiterhin wurden für beide Methoden und beide Gruppen die Feinlokalisationen von Magen, Dün- und Dickdarm auf Unterschiede in der Apoptose-Rate statistisch untersucht. Auch die Gruppen wurden bei beiden Methoden statistisch auf globale Unterschiede in den Apoptose-Raten untersucht, um eine Aussage über den Einfluss der Gruppe und damit des Alters der Tiere auf die Apoptose-Rate treffen zu können. Weiterhin wurde verglichen, ob besonders bei den verschiedenen Lokalisationen Unterschiede zwischen den Gruppen vorhanden sind. Auf einen statistischen Vergleich der beiden Methoden wurde verzichtet, da die Lamin A-Werte höher waren als die Werte der TUNEL-Methode. Es kam darauf an, ob die statistischen Vergleiche der Lokalisationen und der Gruppen innerhalb der Methoden miteinander vergleichbar sind und damit die Unterschiede bei beiden Methoden die gleiche Tendenz zeigen.

Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung ist nur schwer eine Differenzierung der einzelnen Epithelzelltypen durchzuführen. Die Epithelzellen wurden ihrer Lage in der Magen- und Darmschleimhaut entsprechend bezeichnet. Beim Magen wurde daher von Oberflächen-, Isthmus- und Drüsenepithelzellen, beim Dünndarm von Epithelzellen der Zottenspitze, der Zottenmitte, der Zottenbasis, der Kryptenoberfläche, der Kryptenmitte und der Kryptenbasis und beim Dickdarm von Epithelzellen der Kryptenoberfläche, der Kryptenmitte und der Kryptenbasis gesprochen.

3. Ergebnisse

Die Werte der Apoptose-Raten hatten z.T. eine hohe Standardabweichung bzw. einen hohen Streufaktor. Dies war zum einen auf die geringe Anzahl der Probanden, zum anderen auch auf die verschiedenen Einflussmöglichkeiten auf die Apoptose-Rate, wie z.B. die Fütterung zurückzuführen.

Beim Fohlen sind die hohen Streuungen eventuell darin begründet, dass alle drei Fohlen aus drei verschiedenen „Zeitfenstern“ stammen, also unterschiedlich alt sind, nämlich 7 Tage, 12 Tage und 20 Tage. Das sind vermutlich genau die Altersabschnitte, in denen sich täglich am MDT der Fohlen sehr viel verändert. Es müssten daher weitere Untersuchungen mit mehr Individuen pro Zeitfenster durchgeführt und ausgewertet werden.

3.1. TUNEL-Methode

Trotz des hohen Zellumsatzes handelte es sich bei der Apoptose-Rate des MDT bei Pferden um sehr kleine Zahlenwerte. Diese Tatsache entspricht auch den Aussagen anderer Autoren. Benedetti et al. (1990) beschrieben das Auftreten von apoptotischen Zellkernen oder apoptotischen Körperchen in physiologischem Magen- und Duodenalepithel junger Ratten als ein seltenes, aber konstantes Ereignis. Dabei lag die Anzahl der apoptotischen Körperchen im Magen bei 1,4 ($\pm 1,1 = \text{SD}$) pro Magengrübchen und im Duodenum bei 3 (± 1) pro Zotte. Die apoptotischen Körperchen waren in den luminalen Bereichen lokalisiert (Benedetti et al., 1990).

Pro Tag wandern circa 1200 Epithelzellen an einer Darmzotte entlang, also muss auch eine ähnliche Zahl an Zellen verloren gehen (Potten & Hendry, 1983). Laut Hall et al. (1994) war durchschnittlich nur ein apoptotischer ZK oder ein apoptotisches Körperchen im Zottenepithel der Maus pro angeschnittene Zotte zu finden. Dieser Schnitt war jedoch nur 3 μm dick, während eine Zotte zwischen 120 und 150 μm (138 (± 15) μm) Durchmesser besitzt. Daher werden zu jedem Zeitpunkt um die 40 bis 50 apoptotische ZK oder apoptotische Körperchen in einer Zotte vorhanden sein (Hall et al., 1994). Diese apoptotischen ZK oder apoptotischen Körperchen werden relativ schnell entfernt, es dauert möglicherweise weniger als eine Stunde bis sie verschwunden sind (Coles et al., 1993). Wird die Anzahl der apoptotischen ZK oder apoptotischen Körperchen auf eine Periode von 24 Stunden bezogen, so ergibt sich eine Zahl von circa 960 bis 1200 apoptotischen ZK oder apoptotischen Körperchen pro Zotte. Das entspricht dann wiederum der eingangs erwähnten Zahl des Zellverlustes (Hall et al., 1994).

Für das Kolon gibt es ähnliche Berechnungen. Auch hier sind die Zahlenwerte klein, für das Kolon von Mäusen ergibt dies 0,74 (+/-0,15) apoptotische Körperchen pro Krypte (Hall et al., 1994).

In vielen Fällen ist die Beobachtung der Apoptose-Kaskade unvollständig, so kann man *in vivo* vielleicht nur einen Teil der Morphologie sehen, bevor die Zellen von Nachbarzellen phagozytiert werden oder sich aus dem Zellverband lösen (Häcker, 2000). Auch dieses Phänomen kann die kleinen Zahlenwerte bei der Ermittlung der Apoptose-Rate erklären, denn möglicherweise sind die Enterozyten schon abgeschilfert, bevor sie TUNEL-positiv markiert werden können (siehe Kapitel II., Punkt 5.1.).

Es waren auch zelluläre Elemente im Lumen des MDT zu finden. Dabei handelte es sich zum einen um Epithelzellen oder Bruchstücke derselben, die z. T. TUNEL-positiv Markierung zeigten und zum anderen um zelluläre Reste der Futterpflanzen.

3.1.1. Magen

Beim Pferd befanden sich die apoptotischen Zellen am Magen fast ausschließlich im Oberflächenepithel und kamen relativ selten vor. Die Apoptose-Rate betrug für den Magen (gemittelter geometrischer Mittelwert) beim adulten Pferd 0,330% und beim Fohlen 0,271%. Es war am Magen zwischen adulten Pferden und Fohlen kein signifikanter Unterschied vorhanden. Auch bei Ratten wurden in physiologischem Oberflächenepithel des Magens nur vereinzelt apoptotische Zellen gefunden (Konturek et al., 1999). Ebenso waren die Zahlenwerte gering, so gab Konturek et al. (1999) den apoptotischen Index von 0,4% (+/-0,1%) für den Magen von Ratten an.

In allen drei Abschnitten des Pferdemagens, dem Margo plicatus oder Kardiadrüsenregion, der Fundusdrüsenregion und der Pylorusdrüsenregion war das Verteilungsmuster der apoptotischen Zellen relativ gleich. Die wenigen apoptotischen ZK befanden sich vor allem im Oberflächenepithel. Beim Vergleich des Verteilungsmusters der apoptotischen ZK der adulten Pferde und der Fohlen, fiel auf, dass bei Fohlen auch einige apoptotische ZK im Bereich des Isthmus und der Drüsenregion vorkamen, beim adulten Pferd jedoch höchstens 1 bis 2 apoptotische ZK in diesen Bereichen zu finden waren. Wahrscheinlich waren beim Fohlen mehr apoptotische ZK in diesen Bereichen zu finden, da der sich entwickelnde Magen auch in diesen Zonen einen erhöhten Zellumsatz hat und die Apoptose dort als Gegenspieler der Proliferation stattfindet. Das Verteilungsmuster der Apoptose im gastralen Epithel unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Spezies. Beim Hund wurden z.B. in den

Drüsenzonen des Pylorus mehr apoptotische ZK gefunden als bei Nagetieren, bei denen die Apoptose hauptsächlich im Oberflächenepithel vorkam (Yao et al., 1997). Auch beim Menschen war die Apoptose in den Drüsen der Magenschleimhaut selten zu finden (Yao et al., 1997).

3.1.2. Dünndarm

In dieser Studie befanden sich die apoptotischen ZK beim Dünndarm des Pferdes physiologischerweise hauptsächlich im Oberflächenepithel und hier vor allem an der Zottenspitze. Von der Zottenbasis, dem Sitz der Stammzellen ausgehend, erfolgt eine ständige Regeneration der Epithelzellen. Diese Zellen wandern während der kontinuierlichen physiologischen Zellerneuerung unter weiterer Differenzierung oberflächenwärts in Richtung Lumen (Wong & Wright, 1999) und werden vor allem an der Zottenspitze apoptotisch und/oder abgeschilfert (Vachon et al., 2000). Shibahara et al. (1995) untersuchten den Prozess der Exfoliation der gealterten Enterozyten an den Zotten des menschlichen Dünndarmes. Dabei konnten sie TUNEL-positive Enterozyten sowohl an der Zottenspitze als auch an den Seiten der Zotten finden. Die meisten zellulären Elemente im Lumen waren dabei ebenfalls Enterozyten mit TUNEL-positivem ZK (Shibahara et al., 1995).

Ebenso wie beim Magen war die Apoptose-Rate des Dünndarmes niedrig. In dieser Studie betrug die Apoptose-Rate am Dünndarm (gemittelter geometrischer Mittelwert) bei den adulten Pferden 0,103% und bei Fohlen 0,522%. Die Apoptose-Rate war damit bei den adulten Pferden signifikant niedriger als bei den Fohlen (siehe Kapitel V., Punkt 3.1.4.).

Andere Arbeitsgruppen berichteten bei verschiedenen Spezies ebenfalls von niedrigen Zahlenwerten. Ramzy et al. (2000) gaben die Apoptose-Rate am physiologischen Dünndarm von Ratten mit 0,52% (+/-0,2%) an.

Im MDT von Ratten fand Apoptose auch in Abhängigkeit von der Fütterung statt. Im Dünndarm lag die Apoptose-Rate zwischen 0 und 6 Stunden nach Fütterung bei 2 bis 9% und stieg dann deutlich an. So lag die Apoptose-Rate 12 Stunden nach Fütterung zwischen 12 und 18% und 24 Stunden nach Fütterung zwischen 30 und 32%. Nach längerer Fastenzeit war die Apoptose-Rate demnach deutlich erhöht (Iwakiri et al., 2001; Fukuyama et al., 2001)). Die Fütterung stellt folglich eine Einflussmöglichkeit auf die Apoptose-Rate dar, die die Ergebnisse verfälschen kann.

Obwohl wie schon erwähnt die Apoptose hauptsächlich im Oberflächenepithel und hier an der Zottenspitze stattfand, kamen in dieser Arbeit auch einige apoptotische ZK in der Zottenmitte

vor. In den anderen Bereichen waren apoptotische ZK eher selten. Dieses Verteilungsmuster der apoptotischen ZK wiesen sowohl die adulten Pferden wie auch die Fohlen auf. Jedoch war die Zahl der apoptotischen ZK bei Fohlen höher und es kamen mehr apoptotische ZK in der Zottenmitte vor als beim adulten Pferd. Möglicherweise ist dieses Verteilungsmuster ähnlich wie beim Magen altersabhängig und beim sich entwickelnden Dünndarm der Fohlen findet vermehrt Apoptose in diesen Bereichen statt. Bei beiden Altersgruppen kamen jedoch nur vereinzelt apoptotische ZK im Bereich der Zottenbasis und in allen Bereichen der Krypten vor. Iwanaga (1995) berichtete bei anderen Spezies über ähnliche Ergebnisse. Am Dünndarm von Maus und Ratte wird bei den meisten Epithelzellen an der Zottenspitze Apoptose induziert. Anschließend werden sie als Ganzes in das Lumen abgeschilfert. Bei Meerschweinchen und Affen werden nur die apikalen Anteile des Zytoplasmas der Epithelzellen in das Lumen abgegeben, der Großteil des Zytoplasmas wird bei diesen Spezies von Makrophagen in der Zottenspitze phagozytiert (Iwanaga, 1995). Demnach lassen sich die verschiedenen Spezies nach der Art und Weise wie sie ihre gealterten Epithelzellen entfernen in zwei große Klassen einteilen. Bei beiden Klassen kommt es zur Apoptose der Epithelzellen (Mayhew et al., 1999).

3.1.3. Dickdarm

Im Epithel des Dickdarms fand entsprechend den Verhältnissen im Magen und Dünndarm laut der vorliegenden Studie die Apoptose physiologischerweise hauptsächlich an den Oberflächenzellen statt. Ebenso handelte es sich bei der Apoptose-Rate des Dickdarms um vergleichsweise niedrige Zahlenwerte. Die Apoptose-Rate am Dickdarm (gemittelter geometrischer Mittelwert) betrug bei den adulten Pferden 0,218% und bei den Fohlen 0,753%. Es war ein Trend zwischen den beiden Altersgruppen festzustellen, der Unterschied war jedoch knapp nicht signifikant (siehe Kapitel V., Punkt 3.1.4.). Es ist anzunehmen, dass sich bei einer Auswertung des Caecums und den sich daraus ergebenden statistischen Berechnungen ein signifikanter Unterschied in der Apoptose-Rate am Dickdarm zwischen adulten Pferden und Fohlen ergeben würde. Durch die geringere Probenanzahl stellte sich der Unterschied statistisch jedoch als nicht signifikant dar.

Ähnliche Ergebnisse wurden für die Apoptose-Rate des menschlichen Dickdarms erzielt. Laut Liu et al. (1999) betrug sie zwischen 1,2% (+/-0,1%) und 2,2% (+/-0,1%).

Entsprechend der Ergebnisse für den Magen und Dünndarm konnte beim Pferd für den gesamten Dickdarm ein ähnliches Verteilungsmuster der apoptotischen Epithelzellen

festgestellt werden. Apoptotische ZK befanden sich hauptsächlich im Oberflächenepithel und einige wenige in der Kryptenmitte. An der Kryptenbasis waren keine apoptotischen ZK zu finden. Dieses Verteilungsmuster kam bei beiden Altersgruppen vor, die Anzahl der apoptotischen ZK war jedoch beim Fohlen höher als beim adulten Pferd. Bei beiden Altersgruppen konnte das Loslösen apoptotischer Zellen aus dem Zellverband beobachtet werden.

Auch bei Ratten waren apoptotische Aktivitäten vornehmlich im Oberflächenepithel bzw. den oberen Bereichen der Krypten zu finden (Avivi-Green et al., 2000). Ebenso fand im Caecum von Hühnern die Apoptose der Epithelzellen hauptsächlich im Oberflächenepithel statt. Häufig war zu sehen, dass die apoptotischen Zellen an der Schleimhautoberfläche im Begriff waren, in das Lumen abzuschilfern. Nur selten wurden apoptotische Zellen im Bereich der Krypten gesehen (Takeuchi et al., 1998).

3.1.4. Vergleich der Altersgruppen (Adultes Pferd/Fohlen)

An den einzelnen Lokalisationen des Magens zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei der Apoptose-Rate zwischen adulten Pferden und Fohlen.

In der postnatalen Entwicklungsphase bei Ratten steigt die Größe der Magenepithelzellen bis zum 100. Tag post natum kontinuierlich an. Auch die Population der Epithelzelltypen verändert sich in dieser Zeit und ihre Anzahl nimmt zu (Jacobs & Ackerman, 1984). Diese Zunahme an Epithelzellen wird von Wachstumsfaktoren wie EGF beeinflusst. EGF stimuliert die Proliferation am MDT (Ruifrok et al., 1997; Wong & Wright, 1999). Zudem weist das Kolostrum von Stute und Kuh eine erhöhte Konzentration von EGF auf (Murray et al., 1993; Roffler et al., 2002), was bedeutet, dass Fohlen und Kälber vermehrt EGF aufnehmen. Konturek et al. (2001) konnten nachweisen, dass EGF die Apoptose in der Magenschleimhaut von Ratten hemmt. Das könnte auch auf die Epithelzellen des Pferdemagens zutreffen. Dies könnte eine Erklärung für die niedrigere oder den adulten Pferden gleiche Apoptose-Rate bei Fohlen darstellen.

Die Apoptose-Rate war für die einzelnen Lokalisationen des Dünndarmes beim Fohlen signifikant höher als beim adulten Pferd.

Der juvenile Organismus versucht den Zeitraum der postnatalen Periode mit einer verstärkten Bildung von neuen Zellen zu überbrücken (Pacha, 2000). Mit dieser erhöhten Proliferations-Rate geht auch eine erhöhte Apoptose-Rate einher, da im Prozess der Reifung verbrauchte, schädigende und überflüssige Zellen eliminiert werden. Weiterhin unterscheidet sich die

Lebensdauer der Enterozyten bei neugeborenen Säugern von der bei adulten Säugern. Einige Zellen im noch immaturren Darm von Nagern weisen eine längere Lebensdauer auf als im adulten (maturen) Darm (Pacha, 2000). So erklärt dies, dass sich bei Fohlen trotz höherer Apoptose-Rate als bei den adulten Pferden die Anzahl der Epithelzellen als Zeichen adaptiver Massnahmen des juvenilen Organismus erhöht (postnatale Phase). Bei Ratten wurde beschrieben, dass die Anzahl der apoptotischen ZK in der Schleimhaut des Jejunum nach der Geburt ansteigt und im 3. Monat post natum einen Höhepunkt erreicht. Danach fällt die Anzahl der apoptotischen ZK wieder ab. Auch die Höhe der jejunalen Zotten steigt nach der Geburt an, hat einen Höhepunkt im 3. Monat post natum und fällt dann wieder ab. Dies weist darauf hin, dass Zellproliferation und Apoptose sich mit der Entstehung der Verdauungstätigkeit während des Wachstums und der Reifung der Ratte entwickeln (Wang et al., 2003). Demnach würde man auch beim Fohlen aufgrund des Wachstums und der Entwicklung eine höhere Proliferations-Rate als beim adulten Pferd und somit auch eine höhere Apoptose-Rate erwarten.

Für die Lokalisationen des Dickdarmes ergaben sich für die Apoptose-Rate der Epithelzellen deutlich erkennbare Unterschiede, sie waren jedoch knapp nicht signifikant. Die Apoptose-Rate war bei den Fohlen höher als bei den adulten Pferden.

Im Schleimhautepithel des gesamten MDT erhöht sich die Proliferations-Aktivität mit zunehmendem Alter (Atillasoy & Holt, 1993). Speziell in der Kolonschleimhaut ist die Proliferations-Aktivität bei 26 bis 28 Monate alten Ratten höher als bei 3 bis 4 Monate alten Tieren (Holt & Yeh, 1988). Ebenso sind altersabhängige Veränderungen bei der Apoptose-Aktivität in der Kolonschleimhaut vorhanden. Die Anzahl der apoptotischen ZK in der Kolonschleimhaut ist bei 22 Monate alten Ratten signifikant niedriger als bei 4 oder 13 Monate alten Tieren. Es ist also eine altersabhängige Reduktion der Apoptose in der Kolonschleimhaut bei der Ratte vorhanden (Xiao et al., 2001). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, bei der sich für die adulten Pferde niedrigere Werte bezüglich der Apoptose-Raten ergaben.

Sowohl bei den adulten Pferden als auch bei den Fohlen war die Apoptose-Rate am Dickdarm insgesamt höher als am Dünndarm. Dieser Unterschied in der Apoptose-Rate zwischen Dünndarm und Dickdarm ist möglicherweise in der unterschiedlichen Funktion der beiden Darmabschnitte begründet. Der Dünndarm ist der Hauptort der Verdauung, also für die Abbauvorgänge und enzymatischen Spaltungen ebenso wie für die Resorption von Nährstoffen, Spurenelementen, Vitaminen, Wasser und Elektrolyten. In das Duodenum fließen die Galle- und Pankreassekrete ein. Die Aufgabe des Dickdarmepithels ist zum

größten Teil die Absorption von Wasser und Elektrolyten. Zusätzlich laufen hier aufgrund der bakteriellen Besiedelung zahlreiche mikrobielle Umsetzungen ab (Von Engelhardt & Breves, 2004)

Der Ionentransport unterliegt postnatalen Veränderungen im Dünndarm und Dickdarm (siehe Kapitel V., Punkt 3.1.5.). Dabei finden die stärksten entwicklungsbedingten Veränderungen im Kolon statt. Das fetale und neonatale Kolon besitzt viele morphologische und funktionelle Eigenschaften, die sich von denen des adulten Kolon unterscheiden. Im Gegensatz zum adulten Kolon besitzt das fetale und neonatale Kolon zottenähnliche Strukturen (Colony et al., 1989) und signifikante Kapazität aktiver Absorption von luminalen Kohlenhydraten und Aminosäuren (Menard et al., 1994). Ebenso findet der Wechsel der Na⁺-Absorptions-Mechanismen während der frühen postnatalen Entwicklung statt (siehe Kapitel V., Punkt 3.1.5.). Dies könnte eine Erklärung für die höhere Apoptose-Rate des Dickdarmes im Vergleich zum Dünndarm bei Fohlen darstellen.

3.1.5. Bedeutung der Apoptose für pathophysiologische Veränderungen am Magen-Darm-Trakt

Es stellt sich weiterhin die Frage nach der Bedeutung der Apoptose für pathophysiologische Veränderungen am MDT der adulten und neugeborenen Pferde. In dieser Untersuchung ergaben sich für den Magen keine signifikanten Unterschiede in der Apoptose-Rate zwischen den beiden Altersgruppen und insgesamt war die Apoptose-Rate niedrig. Wie schon in Kapitel II. Punkt 2. erwähnt, kommen Magenzulzera bei adulten Pferden wie auch bei Fohlen relativ häufig vor. Obwohl die Entstehung von Magenzulzera bei Ratten mit einem starken Anstieg der Apoptose-Rate einhergeht (Konturek et al., 1999 und 2001; Liu et al., 2003), war laut dieser Studie kein Zusammenhang zwischen den ermittelten Apoptose-Raten und dem Auftreten von Magenzulzera zu erkennen. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Prädisposition zur Entwicklung von Magenzulzera bei Pferden nicht in einer allgemein hohen Apoptose-Rate der Magenschleimhaut begründet ist. Ein weiterer Grund könnte sein, dass Magenzulzera häufig an der Pars nonglandularis lokalisiert sind und dieser Magenabschnitt in dieser Studie nicht auf seine Apoptose-Rate untersucht wurde. Kong und Schusser berichteten in diesem Zusammenhang von einer ansteigenden Apoptose-Rate in der Pars nonglandularis des Pferdemagens nach Futterentzug (2005).

Eine bei Fohlen vorkommende gastrointestinale Funktionsstörung ist die eingangs erwähnte „Fohlenrosse-Diarrhoe“. Schon 1986 vermuteten Masri et al., dass die „Fohlenrosse-

Diarrhoe“ wahrscheinlich durch eine Hypersekretion des Dünndarmes ausgelöst wird, bei der der immature Dickdarm gleichzeitig nicht in der Lage ist, diese Flüssigkeitsmengen und Elektrolyte zurückzuresorbieren. Die Darmsekretion unterstützt die Verdauung und Absorption intraluminaler Nährstoffe und ermöglicht das Entfernen von Pathogenen wie Toxinen aus dem Darm oder fungiert als Vehikel für IgA-Sekretion. Normalerweise wird ein Großteil der Flüssigkeit absorbiert, aber diese Balance kann schnell aus dem Gleichgewicht geraten, wenn die Absorptions-Kapazität von einer hohen Sekretionsrate übertroffen wird. Bei Säuglingen scheint das Kolon eine signifikante Rolle in der Absorption von Wasser und Ionen und in der Aufrechterhaltung der physiologischen Flüssigkeits- und Elektrolyt-Homöostase zu spielen. Diese Rolle mag während des frühen postnatalen Wachstums extrem wichtig sein, da die Absorption im Dünndarm und die Reabsorption der Niere noch nicht voll entwickelt sind (Pacha, 2000). Auch dies könnte das Auftreten von Diarrhoe bei entwicklungsbedingten Veränderungen erklären. Im Zuge dieser Adaptation des noch immaturren Fohlendarmes kann es auch zu pathophysiologischen Veränderungen kommen. Durch die Änderung der Futterqualität und den Beginn der Rauhfutteraufnahme setzen Umbauvorgänge im Dün- und auch im Dickdarm ein. Diese entwicklungsbedingten Veränderungen scheinen mit einer erhöhten Apoptose-Rate einherzugehen. Bei einem Fohlen (F 1) kamen verhältnismäßig viele apoptotische ZK im Bereich der Zottenmitte und der Zottenbasis des Jejunums und im Bereich der Zottenmitte des Ileums vor. Dieser individuelle Unterschied kann möglicherweise mit dem Alter des Fohlens in Zusammenhang gebracht werden. Es handelte sich hierbei um ein 12 Tage altes Fohlen, die anderen beiden Fohlen waren jeweils 7 und 20 Tage alt. Eventuell findet um den 10. Tag ein Reifungsprozess statt, der am 7. Tag noch nicht begonnen und am 20. Tag schon vollzogen ist und mit erhöhter Apoptose-Rate einhergeht. Das Alter von 12 Tagen liegt genau in dem Zeitraum, in dem die Fohlen beginnen Rauhfutter aufzunehmen und die sogenannte „Fohlenrosse-Diarrhoe“ einsetzt. Erhöhte Apoptose-Raten führen zu einem Verlust von absorptionsfähigen Enterozyten und können daher zu Malabsorption von Wasser und Elektrolyten, gleichzeitig zu Hypersekretion von Muzin und damit zu einer Diarrhoe führen (Ikuno et al., 1995; Yamada et al., 2000). Beim Meerschweinchen finden innerhalb der ersten 2 Wochen post natum deutliche Veränderungen in der Morphologie des Darmepithels statt. Es kommt zu einem 40%igem Rückgang der Zottenhöhe und zu einer 25%igen Zunahme der Kryptentiefe (Weaver & Carrick, 1989). Dies hat eine geringere Absorptionsfläche und damit eine geringere Resorptionsfähigkeit des Dün- und Dickdarmes zur Folge und ist damit möglicherweise an der Entstehung einer wässrigen Diarrhoe beteiligt. Beim Schaf zeigen abgesetzte Lämmer bzw. Lämmer, die

Festfutter aufnehmen, eine geringere Zottenhöhe im Jejunum und Ileum (Attaix & Meslin, 1991). Dabei bedeutet das „Absetzen“ die Entwöhnung von der Mutter bzw. der Muttermilch. Während des Absetzens kommt es dabei im Dünndarm zur Villusatrophie, die zu Maldigestion und Malabsorption führt. Ob es infolge dessen zu einer Diarrhoe kommt, hängt von der Flüssigkeitsmenge, die den Dickdarm erreicht, und von der Kapazität des Dickdarmes ab, diesen durch Villusatrophie verursachten Flüssigkeitsverlust durch verstärkte Absorption zu kompensieren (Beer-Schreuers et al., 1998). Bei 5 bis 8 Wochen alten säugenden Lämmern dauerte die Zellerneuerung des Darmepithels 4,5 bis 6,3 bzw. 4 bis 5,3 Tage und damit deutlich länger als bei 1 Woche alten säugenden (2,1 bis 4,0 Tage) oder 8 Wochen alten abgesetzten Lämmern (3,0 bis 3,1 Tage) (Attaix & Meslin, 1991). Dies zeigt, dass die postnatale Adaptation des Darmepithels bei Schafen alters- und futterabhängig ist. Möglicherweise ist dies auch beim Pferd bzw. beim Fohlen der Fall.

Bei Kaninchen unterliegt das gesamte Kolon postnatalen Veränderungen des Natrium (Na^+)-Transportes (O'Loughlin et al., 1990). Auch bei anderen Spezies wurden die stärksten postnatalen Veränderungen am Kolon beschrieben. So nimmt der elektrogene Na^+ -Transport bei unreifen Ratten im distalen Kolon stetig zu und erreicht ein Plateau zwischen dem 20. und 25. Tag post natum. Danach fällt er wieder ab und ist nach dem 30. Tag post natum nicht mehr vorhanden. Diese postnatalen Veränderungen des Na^+ -Transportes sind von der Plasma-Aldosteron-Konzentration und von der Natriumaufnahme abhängig (Pacha et al., 1995). Mit der ansteigenden Plasma-Aldosteron-Konzentration korreliert auch eine Oberflächenzunahme der basolateralen Membranen der Oberflächenepithelzellen. Die Funktion des noch immaturnen Kolon ist also auch mit seiner Morphologie verknüpft (Vagnerova et al., 1997). Vermutlich kann die Resorption von Elektrolyten und Wasser während dieser Veränderungen kurzzeitig gestört sein und dies kann eine Diarrhoe zur Folge haben.

Auch bei Schweinen korrelieren die postnatalen Veränderungen im Na^+ -Transport mit der Plasma-Aldosteron-Konzentration (Ferguson et al., 1979), ebenso ist auch beim menschlichen Säugling Aldosteron für die Entwicklung des Na^+ -Transportes sowohl im Kolon als auch in den Nieren verantwortlich (Jenkins et al., 1990). Möglicherweise besitzt das immature Kolon eine höhere Sensitivität gegenüber Aldosteron als das mature Kolon (Finkel & Aperia, 1986). Während der Absetzphase, die bei den verschiedenen Spezies unterschiedlich einsetzt, verschwindet der elektrogene Na^+ -Transport, der beim Säugling vorhanden ist. Er wird durch den Na^+/H^+ -Austausch, der beim Adulten stattfindet, ersetzt. In dieser Zeit kann es dann

durch hohe Plasma-Aldosteron-Konzentrationen vorübergehend zu einer sekretorischen Diarrhoe kommen.

In der postnatalen Entwicklungsphase fällt die intestinale Transport-Kapazität stark ab. Dieser Abfall wird möglicherweise z.T. dadurch verursacht, dass zu den fetalen Enterozyten neue Zellen hinzukommen, die noch nicht ihre adäquate Zeit hatten, aktive Transporter zu exprimieren (Pacha, 2000). Das bedeutet, dass vermehrt Elektrolyte und Wasser im Darmlumen zurückbleiben und dies vorübergehend zu dem Erscheinungsbild einer Diarrhoe führen kann. Außerdem findet im neonatalen Darm der Nährstofftransport entlang der gesamten Zotten-Krypten-Achse statt, während im adulten Darm die Absorption von Nährstoffen lediglich im oberen Bereich der Zotten stattfindet (Smith, 1981). Da dadurch die Absorptionsfläche im neonatalen Darm relativ größer ist als im adulten Darm, könnte dies im Zuge der Maturation ein Zurückbleiben von Elektrolyten und Wasser im Darmlumen verursachen und eine Diarrhoe zur Folge haben.

Eine weitere Ursache für das Auftreten einer Diarrhoe während entwicklungsbedingter Veränderungen des Darmes stellt die unterschiedliche Resorption von Gallensäuren dar. Gallensäuren werden im Dünndarm reabsorbiert, aber dieser aktive Transportmechanismus im Ileum ist bei der Geburt noch nicht vorhanden, sondern entwickelt sich erst schrittweise während der Säugeperiode. Der immature Dickdarm wird also den sekretionssteigernden Gallensäuren ausgesetzt, scheint aber darauf nicht mit Wasser- und Chlorid-Sekretion zu reagieren. Die Sekretionssteigerung als Antwort auf die Gallensäuren und damit die Sensitivität von cAMP ist in immaturren Enterozyten niedriger als in adulten (Potter et al., 1991). Je nachdem wann die Entwicklung und Differenzierung der Enterozyten stattfindet, kann es dann vorübergehend zu Diarrhoe kommen.

Die infektiöse Diarrhoe ist eine der häufigsten Neugeborenenenerkrankungen. Verantwortlich dafür ist die entwicklungsbedingte Regulation der durch Bakterien bzw. Enterotoxine ausgelösten intestinalen Sekretionssteigerung. Bestimmte Toxine wie z.B. Enterotoxin von *E. coli* oder Cholera-Toxin sind im immaturren Darm effektiver als im maturen (Cohen et al., 1986; Chu et al., 1989; McEvan et al., 1990). Die Ursachen hierfür liegen möglicherweise in einer höheren Anzahl spezifischer Rezeptoren (Cohen et al., 1986), einer noch unterentwickelten Natrium-Pumpe (Chu et al., 1989) oder eventuell der Bildung eines anti-sekretorischen Faktors im adulten Darm (McEvan et al., 1990). Folglich kommt es zur Sekretionssteigerung von Flüssigkeit in das Lumen, da der immature Darm für diese Exotoxine eine höhere Sensitivität aufweist (Pacha, 2000). Dies führt dann zur Diarrhoe.

Postnatale ernährungsbedingte Veränderungen sind auch mit der Entwicklung der intestinalen Mikroflora, vor allem der im Kolon, vergesellschaftet (Swords et al., 1993). Neonaten werden mit einem sterilen MDT geboren, bei dem die mikrobielle Besiedelung sofort nach der Geburt einsetzt und sich schrittweise weiterentwickelt (Murray et al., 1987; Swords et al., 1993). Im Schweinekolon entwickelt sich eine schon fermentativ funktionierende anaerobe Mikroflora innerhalb der ersten 2 Lebenswochen (Murray et al., 1987). Ähnliches könnte für das Fohlen zutreffen, das um den 10. Tag beginnt, Rauhfutter aufzunehmen und auch den Kot der Mutter zur Entwicklung der Darmflora aufnimmt. Bakterien können Apoptose induzieren (Kapitel II., Punkt 5.6.2.) und so könnte auch die physiologische Darmflora des Pferdekolon eine Erklärung für die höheren Apoptose-Raten des Dickdarms im Vergleich zum Magen und Dünndarm bei beiden Altersgruppen sein.

Weiterhin soll auf die Möglichkeit der postoperativen Diagnostik nach Kolikerkrankung bzw. Kolik-Operation zur Überprüfung der Regeneration des Epithels des MDT hingewiesen werden. Dazu müsste man ischämische Darmteile biopsieren oder während der Operation Gewebeproben der geschädigten und verbleibenden Darmteile entnehmen und diese auf ihre Apoptose-Rate untersuchen. Je niedriger die Ergebnisse der Apoptose-Raten ausfallen, desto günstiger ist die Prognose auf Wiederherstellung nach Ischämie.

In dieser Hinsicht gibt es schon Ansätze anderer Arbeitsgruppen. Rowe et al. (2003) untersuchten die Apoptose-Rate in den verschiedenen Schichten des Dün- und Dickdarmes und stellten hohe Apoptose-Raten bei Pferden mit Strangulationen oder Obstruktionen des Darmes fest.

3.2. Lamin A

Zur Sicherung der Ergebnisse der TUNEL-Methode wurde die Lamin A-Färbung durchgeführt. Trotz des hohen Zellumsatzes handelte es sich bei der Apoptose-Rate des MDT bei Pferden um sehr kleine Zahlenwerte. Diese Tatsache entspricht auch den Aussagen anderer Autoren. Das Auftreten der Apoptose im Magen von Ratten ist selten (Benedetti et al., 1990). Ähnliche Verhältnisse werden im Dün- und Dickdarm gefunden (Hall et al., 1994) (siehe Kapitel V., Punkt 3.1.). Auch bei den Ergebnissen der Rate der Lamin A-negativen Zahlenwerten handelt es sich um kleine Zahlenwerte

3.2.1. Magen

In der vorliegenden Studie betrug die Rate der Lamin A-negativen ZK für den Magen (gemittelter geometrischer Mittelwert) beim adulten Pferd 0,457% und beim Fohlen 0,451%. Es war am Magen zwischen adulten Pferden und Fohlen fast kein Unterschied zu erkennen. Dies entsprach weitgehend den durch die TUNEL-Methode ermittelten Verhältnissen, wobei die Zahlenwerte bei den Lamin A-negativen ZK etwas höher waren.

Entsprechend den Ergebnissen der TUNEL-Methode befanden sich die Lamin A-negativen ZK fast ausschließlich im Oberflächenepithel des Magens und kamen nur vereinzelt vor.

Betrachtete man alle drei Abschnitte des Pferdemagens, den Margo plicatus oder Kardiadrüsenregion, die Fundusdrüsenregion und die Pylorusdrüsenregion, so wurde deutlich, dass das Verteilungsmuster der Lamin A-negativen ZK und auch die Rate der Lamin A-negativen ZK relativ gleich blieb.

Am Magen wurden fast keine intraepithelialen Lymphozyten vorgefunden, so dass keine Lamin A-negativen Lymphozyten als falsch negativ mitgezählt werden konnten.

3.2.2. Dünndarm

In dieser Studie betrug die Rate der Lamin A-negativen ZK am Dünndarm (gemittelter geometrischer Mittelwert) bei den adulten Pferden 1,995% und bei Fohlen 1,503% und ist somit bei den adulten Pferden höher als bei den Fohlen.

Entsprechend den Ergebnissen der TUNEL-Methode befanden sich die Lamin A-negativen ZK zum größeren Teil im Oberflächenepithel des Dünndarmes und dabei mehrheitlich an der Zottenspitze. Lamin A-negative ZK kamen aber auch in der Zottenmitte, der Zottenbasis und, wenn auch weniger, in den Krypten vor. Dieses Verteilungsmuster der Lamin A-negativen ZK kam bei den adulten Pferden wie auch bei den Fohlen vor. Jedoch war die Zahl der Lamin A-negativen ZK bei den adulten Pferden höher als bei den Fohlen.

Eine Erklärung für die höhere Rate der Lamin A-negativen ZK bei adulten Pferden könnten die bei dieser Altersgruppe im Dünndarm zahlreich vorhandenen intraepithelial gelegenen Lymphozyten sein, die eventuell als Lamin A-negative ZK von Epithelzellen mitgezählt wurden. Dafür spricht auch das veränderte Verteilungsmuster der Lamin A-negativen ZK im Vergleich mit den TUNEL-positiven ZK. Es befanden sich mehr Lamin A-negative ZK in Bereichen der Zotten-Krypten-Achse, in denen bei der TUNEL-Methode keine vorkamen.

3.2.3. Dickdarm

Im Epithel des Dickdarms betrug die Rate der Lamin A-negativen (gemittelter geometrischer Mittelwert) in dieser Studie bei den adulten Pferden 1,977% und bei den Fohlen 2,624%. Es war ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Altersgruppen festzustellen. Dies entsprach weitgehend den durch die TUNEL-Methode ermittelten Verhältnissen, wobei die Zahlenwerte bei den Lamin A-negativen ZK höher lagen.

Entsprechend den Ergebnissen der TUNEL-Methode befanden sich die Lamin A-negativen ZK zum größeren Teil im Oberflächenepithel des Dickdarmes, aber auch einige in der Kryptenmitte. An der Kryptenbasis waren deutlich weniger Lamin A-negative ZK zu finden. Dieses Verteilungsmuster kam bei beiden Altersgruppen vor, die Anzahl der Lamin A-negativen ZK war jedoch bei den Fohlen höher als bei den adulten Pferden. Bei beiden Altersgruppen konnte man ähnlich wie bei der TUNEL-Methode das Loslösen der Lamin A-negativen Zellen aus dem Zellverband beobachten. Im Gegensatz zum Dünndarm kamen in der vorliegenden Studie im Dickdarm weniger intraepitheliale Lymphozyten vor, die als falsch Lamin A-negative Zellen mitgezählt werden konnten.

3.3. Vergleich der Ergebnisse der TUNEL-Methode mit den Ergebnissen der Lamin A-Färbung

Beim Vergleich der Ergebnisse der TUNEL-Methode mit den Ergebnissen der Lamin A-Färbung wurde deutlich, dass es sich bei beiden Methoden um kleine Zahlenwerte für die Apoptose-Rate handelte. Die Ergebnisse der Lamin A-Färbung waren dabei höher als die der TUNEL-Methode. Diese unterschiedlichen Zahlenwerte (der TUNEL- und der Lamin A-Ergebnisse) können in der zeitlichen Abfolge der Apoptose-Kaskade begründet liegen. Die (vollständige) Fragmentierung der DNA wird als ein spätes Ereignis der Apoptose-Kaskade beschrieben (Cohen et al., 1992; Collins et al., 1997). Die Proteolyse der Lamine stellt dagegen ein relativ frühes Ereignis der Apoptose-Kaskade dar und tritt vor den Kernveränderungen und dem Verlust der Überlebensfähigkeit der Zelle ein (Rao et al., 1996; Grossmann et al., 1998). Dabei scheint die Lamin A-Expression für das Überleben der Zelle wichtiger zu sein als die Lamin B-Expression (Rao et al., 1996). Weiterhin gehen Rao et al. (1996) und auch Patel et al. (1996) davon aus, dass die Funktion der Proteolyse der Lamine darin liegt, die Aktivierung der Nukleasen, die für die DNA-Fragmentation verantwortlich sind, zu ermöglichen. Die Proteolyse der Lamine wäre dann eine Voraussetzung für die DNA-

Fragmentation und liefe dementsprechend zeitlich vor dieser ab. Damit ließen sich die insgesamt höheren Zahlenwerte der Lamin A Auszählung erklären, da das Fehlen von intaktem Lamin A früher sichtbar wird und ZK mit fragmentierter DNA eventuell schon abgeschilfert oder phagozytiert sind, bevor sie TUNEL-positiv werden können.

Speziell bei den Ergebnissen des Dünndarmes wurde deutlich, dass sich die Lamin A-Färbung für den Apoptose-Nachweis am Dünndarm weniger eignet. Am Dünndarm kamen in dieser Arbeit bei den adulten Pferden sehr viele intraepitheliale Lymphozyten vor, deren Differenzierung gegenüber den Epithelzellen im Fluoreszenzmikroskop zum Teil nicht möglich war und die daher als falsch Lamin A-negativ mitgezählt wurden. Dies erklärt die höhere Apoptose-Rate bei den adulten Pferden im Vergleich mit den Fohlen bei der Lamin A-Färbung. Sollte es in Zukunft einen Antikörper geben, mit dem sich die Lymphozyten des Pferdes markieren lassen, so könnte dies in Kombination mit der Lamin A-Färbung sicherere Ergebnisse bezüglich der Apoptose-Rate am Dünndarm liefern. Auch am Dickdarm kommen intraepithelial gelegene Lymphozyten vor, wenn auch nicht so viele wie am Dünndarm, so dass auch hier zur Ermittlung der Apoptose-Rate die TUNEL-Methode geeigneter erscheint, solange kein Lymphozyten-Antikörper für Pferde zur Verfügung steht.

Zusammenfassend stellt die TUNEL-Methode eine gute Methode zum Nachweis von Apoptose am Pferdedarm dar. Nach den Ergebnissen dieser Studie ist sie die Methode der Wahl, die sich auch zur Quantifizierung der Apoptose sehr gut eignet.

4. Schlussfolgerung und Zukunftsperspektiven

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die Apoptose-Raten des Darmepithels bei Pferden den Apoptose-Raten des Darmepithels anderer Spezies sehr ähnlich sind. Es handelt sich um kleine Zahlenwerte und dies trifft für adulte Pferde ebenso zu wie für Fohlen. Der Vergleich der Altersgruppen ergab in dieser Studie niedrigere Apoptose-Raten bei den adulten Pferden. Dieser globale Unterschied zwischen den Altersgruppen war signifikant ($p = 0,010$).

Es ist noch Bedarf eine höhere Anzahl an Fohlen bzw. deren MDT und mehrere Probanden pro Lebensalter zu untersuchen. Dementsprechend ist noch eine Vielzahl weiterer Experimente nötig. Bei zwei bis drei Individuen pro Lebenstag in den Tagen vor, während und nach der Fohlenrosse-Diarrhoe und den Ergebnissen daraus, könnte man gezielte Aussagen bezüglich der Apoptose-Rate bzw. der Reifung des immaturren Darmes erhalten. Diese Untersuchungen im Hinblick auf die Eingrenzung bestimmter Gruppen pro Lebenstag

würden wichtige Informationen liefern, in welchem Lebensalter welche Zellen apoptotisch werden und welche physiologischen oder pathologischen Veränderungen daraus resultieren. Weiterhin ist von Interesse genauer zu klären, welche der verschiedenen Zelltypen die Apoptose-Kaskade durchlaufen. Bei genauer Spezifizierung der apoptotischen Zellen des MDT wäre es möglich, physiologische und auch pathologische Veränderungen bestimmten Zellen und ihrer Funktion zuzuordnen. Damit könnten die Veränderungen exakter beschrieben werden.

VI. Zusammenfassung

Ziel dieser Dissertation war es, die Apoptose-Rate der Epithelzellen des Magen-Darm-Traktes (MDT) von adulten Pferden und Fohlen zu untersuchen.

Die Apoptose spielt eine wichtige Rolle in den physiologischen und dynamischen Vorgängen des Zellumsatzes im Epithel des MDT. Aber auch bei einigen pathologischen Veränderungen des MDT ist die Apoptose von Bedeutung.

Zum Nachweis der Apoptose wurde die TUNEL-Methode und ein Lamin A-Antikörper verwendet. Dabei wurde nicht nur auf organspezifische, sondern auch auf regionale Unterschiede geachtet. Außerdem wurde besonderer Augenmerk auf den Vergleich der Apoptose-Rate beider Altersgruppen gelegt.

Bei 6 adulten Pferden und 3 Fohlen wurden hierzu jeweils 9 definierte Proben aus dem MDT direkt nach dem Tod der Tiere entnommen und kryokonserviert. Anschließend wurden die Proben für eine lichtmikroskopische und darauffolgende immunhistochemische Untersuchung aufbereitet. Apoptotische Zellkerne (ZK) wurden mittels der TUNEL-Methode und der Lamin A-Färbung sichtbar gemacht. Der Anteil der TUNEL-positiven bzw. der Lamin A-negativen ZK/Zellen an der Gesamtpopulation wurde als Apoptose-Rate in % angegeben. Es handelt sich bei den Zahlenwerten um den geometrischen Mittelwert der Apoptose-Rate.

Die Ergebnisse der Apoptose-Rate (A.-R.) mit der TUNEL-Methode für den Magen der adulten Pferde (A.-R. = 0,330%) im Vergleich zu denen der Fohlen (A.-R. = 0,271%) ergaben keine signifikanten Unterschiede. Ebenso verhielt es sich mit der Rate der Lamin A-negativen ZK beim Magen der adulten Pferde (A.-R. = 0,457%) im Vergleich zu den Fohlen (A.-R. = 0,451%).

Dabei befanden sich die apoptotischen ZK bei beiden Methoden hauptsächlich im Oberflächenepithel.

Für den Dünndarm ergaben sich bei der TUNEL-Methode signifikante Unterschiede für die Apoptose-Rate bei den adulten Pferden (A.-R. = 0,103%) im Vergleich zu den Fohlen (A.-R. = 0,522%). Die Apoptose-Rate war bei den adulten Pferden signifikant niedriger als bei den Fohlen ($p = 0,015$). Dagegen war die Apoptose-Rate mit der Lamin A-Methode für die adulten Pferde (A.-R. = 1,995%) höher als für die Fohlen (A.-R. = 1,503%). Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant.

Ebenso wie beim Magen befanden sich die apoptotischen ZK hauptsächlich im Oberflächenepithel und vor allem an den Zottenspitzen. Bei den Lamin A-negativen ZK fiel auf, dass sich hier auch viele markierte ZK in tieferen Bereichen der Schleimhaut befanden.

Die Ergebnisse der Apoptose-Raten für den Dickdarm ergaben bei beiden Methoden im Vergleich zwischen den adulten Pferden und den Fohlen einen nennenswerten Unterschied. Die Apoptose-Rate war mit der TUNEL-Methode bei den adulten Pferden (A.-R. = 0,218%) deutlich niedriger als bei den Fohlen (A.-R. = 0,753%), jedoch nicht signifikant ($p = 0,089$). Die Apoptose-Rate mit der Lamin A-Methode war ebenfalls bei den adulten Pferden (A.-R. = 1,977%) niedriger als bei den Fohlen (A.-R. = 2,624%), jedoch nicht signifikant ($p = 0,140$).

Der Hauptanteil der apoptotischen ZK befand sich auch beim Dickdarm im Oberflächenepithel.

Die TUNEL-Methode stellt eine gute Methode zum Nachweis von Apoptose am Pferdedarm dar. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie ist sie die Methode der Wahl, die sich auch zur Quantifizierung der Apoptose im Schleimhautepithel sehr gut eignet. Die Lamin A-Methode birgt das Risiko, intraepitheliale Lymphozyten als falsch negativ (und damit apoptotisch) zu beurteilen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass die Apoptose-Raten des Darmepithels bei den adulten Pferden niedriger lagen als bei den Fohlen. Dieser globale Unterschied zwischen den Altersgruppen war signifikant ($p = 0,010$). Dies ist wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Entwicklung des noch immaturren Fohlendarmes zu sehen.

In Anbetracht der Tatsache, dass im Untersuchungszeitraum nur 3 Fohlen unterschiedlichen Alters zur Verfügung standen, wird klar, dass noch weitere Studien nötig sind, um die offenen gebliebenen Fragen zu klären.

Weiterhin könnten im Hinblick auf verschiedene Erkrankungen des MDT der Apoptose-Nachweis und die Ermittlung der Apoptose-Raten bezüglich postoperativer Diagnostik und Prognostik für Kolikerkrankungen und begleitender Ischämie auch beim Pferd mehr Bedeutung erlangen.

VII. Summary

The objective of the present study was to investigate apoptosis of epithelial cells in the stomach and the intestine of adult horses and foals.

Apoptosis plays an important role in the physiological dynamic process of cell turnover in the epithelium of the stomach and the intestine. Moreover increased or decreased apoptosis takes place in various pathological alterations of the stomach and the intestine. The apoptotic process is a complex process involving a number of mediators.

For the detection of apoptosis the TUNEL-method and a lamin A-antibody was applied. Special interest was to see if there would be either tissue-specific and/or regional differences. Furthermore there was focus on the differences in apoptosis comparing the gastrointestinal epithelium of adult horses and foals.

Defined epithelium tissue specimen (n = 9) were taken out of the stomach and the intestine of 6 adult horses and 3 foals directly after the animals were killed. Then the tissue was immediately cryopreserved. After that the epithelial specimen were prepared for lightmicroscopical and following immunohistochemical investigation. The TUNEL-method and a lamin A-antibody were used to detect apoptotic nuclei. The part of TUNEL-positive and lamin A-negative nuclei were given by the apoptotic rate in percent. The apoptotic rate was given as geometric mean.

The results of the apoptotic rate of the stomach with the TUNEL-method showed, that there was no significant difference between the adult horses (a. r. = 0,330%) and the foals (a. r. = 0,271%). The results of the apoptotic rate with the lamin A-antibody also demonstrated no significant difference between the adult horses (a. r. = 0,457%) and the foals (a. r. = 0,451%) in the stomach epithelium.

The main part of the apoptotic nuclei was localized at the surface epithelium of the stomach for both methods.

In the small intestine the TUNEL-method showed a significant difference in the epithelial apoptotic rate of the adult horses (a. r. = 0,103%) in comparison with the foals (a. r. = 0,522%). The apoptotic rate was significantly lower in adult horses than in foals ($p = 0,015$). In contrast the lamin A-method demonstrated an increased apoptotic rate in the small intestinal epithelium of the adult horses (a. r. = 1,995%) in comparison with the foals (a. r. = 1,503%), but this difference was not significant.

Like in the stomach the main part of the apoptotic nuclei was localized within the surface epithelium of the small intestine, especially at the tip of the villi. Certainly the lamin A-method showed more apoptotic nuclei in other locations.

The results for the apoptotic rates of the large intestine showed in both methods a visible difference between the adult horses and the foals. The apoptotic rate for the large intestine with the TUNEL-method was lower in the adult horses (a. r. = 0,218%) compared to the foals (a. r. = 0,753%), but the difference was not significant ($p = 0,089$). The results of the apoptotic rate with the lamin A-method also demonstrated a lower apoptotic rate in the adult horses (a. r. = 1,977%) compared to the foals (a. r. = 2,624%), but this difference was also not significant ($p = 0,140$).

In the large intestine the main part of the apoptotic nuclei was also localized in the surface epithelium for both methods.

The TUNEL-method is a good method for detection of apoptotic nuclei in the epithelium of the equine intestine. As the present study showed, the TUNEL-method is very suitable for quantification of apoptotic nuclei in the intestinal mucosa. The lamin A-method brings a possible risk of counting intraepithelial lymphocytes as false negative (and apoptotic).

In conclusion the results of this study demonstrated that the apoptotic rates of the intestinal epithelium were lower in adult horses compared with foals. This global difference between the two ages was significant ($p = 0,010$). This is probably due to developmental changes of the immature intestine of foals.

Considering the fact that there were only three foals with different ages at our disposal it is quite evident that further studies are necessary to elucidate the role of apoptosis in the developing intestine of foals.

Furthermore considering gastrointestinal diseases in horses apoptosis may become more important in the future concerning post operative diagnostics and prognostics.

VIII. Anhang

1. Tabellen

1.1. Tabelle der TUNEL-Auszählung bei den adulten Pferden

ADULTES Nummer	Alter in Jahren	Abschnitt MDT	Fein-Lokalisation	Apoptotische Zellkerne	Apoptose-Rate in %
1.1.	4	Margo plicatus	OEZ IZ DZ	4 0 0	0,019
1.1.	4	Fundus	OEZ IZ DZ	83 0 0	0,429
1.1.	4	Pylorus	OEZ IZ DZ	76 2 2	0,424
1.2.	22	Duodenum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	46 18 3 0 0 0	0,580
1.2.	22	Jejunum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	9 1 0 0 0 0	0,072
1.2.	22	Ileum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	7 7 1 0 0 0	0,069
1.3.	18	Caecum	EZ KO EZ KM EZ KB	4 0 0	0,048
1.3.	18	Colon ascendens	EZ KO EZ KM EZ KB	5 1 2	0,049
1.3.	18	Colon descendens	EZ KO EZ KM EZ KB	18 3 0	0,133
2.1.	6	Margo plicatus	OEZ IZ DZ	199 0 0	1,155
2.1.	6	Fundus	OEZ IZ DZ	74 7 13	0,605

2.1.	6	Pylorus	OEZ IZ DZ	97 0 0	0,575
2.2.	9	Duodenum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	3 0 0 0 0 0	0,019
2.2.	9	Jejunum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	15 2 0 0 0 0	0,080
2.2.	9	Ileum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	3 2 0 0 0 0	0,030
2.3.	6	Caecum	EZ KO EZ KM EZ KB	15 0 0	0,158
2.3.	6	Colon ascendens	EZ KO EZ KM EZ KB	82 4 0	0,696
2.3.	6	Colon descendens	EZ KO EZ KM EZ KB	92 1 0	0,681
3.1.	12	Margo plicatus	OEZ IZ DZ	11 2 1	0,068
3.1.	12	Fundus	OEZ IZ DZ	18 0 0	0,088
3.1.	12	Pylorus	OEZ IZ DZ	185 1 0	0,949
3.2.	17	Duodenum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	2 1 0 0 1 0	0,022
3.2.	17	Jejunum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	15 0 0 0 0 0	0,080

3.2.	17	Ileum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	4 1 0 0 0 0	0,023
3.3.	10	Caecum	EZ KO EZ KM EZ KB	26 1 0	0,238
3.3.	10	Colon ascendens	EZ KO EZ KM EZ KB	169 1 0	1,068
3.3.	10	Colon descendens	EZ KO EZ KM EZ KB	35 3 0	0,217
4.1.	12	Margo plicatus	OEZ IZ DZ	129 1 0	0,651
4.1.	12	Fundus	OEZ IZ DZ	32 2 0	0,224
4.1.	12	Pylorus	OEZ IZ DZ	18 0 1	0,092
4.2.	12	Duodenum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	13 1 0 0 0 0	0,101
4.2.	12	Jejunum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	12 12 3 0 0 0	0,152
4.2.	12	Ileum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	21 1 5 0 0 0	0,186
4.3.	17	Caecum	EZ KO EZ KM EZ KB	7 2 0	0,091
4.3.	17	Colon ascendens	EZ KO EZ KM EZ KB	16 0 0	0,168
4.3.	17	Colon descendens	EZ KO EZ KM EZ KB	47 0 0	0,382

5.1.	25	Margo plicatus	OEZ IZ DZ	17 8 0	0,166
5.1.	25	Fundus	OEZ IZ DZ	54 0 0	0,336
5.1.	25	Pylorus	OEZ IZ DZ	16 2 0	0,112
5.2.	30	Duodenum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	6 0 0 0 0 0	0,045
5.2.	30	Jejunum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	18 5 0 0 0 0	0,129
5.2.	30	Ileum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	26 2 0 0 0 0	0,181
5.3.	8	Caecum	EZ KO EZ KM EZ KB	12 3 0	0,136
5.3.	8	Colon ascendens	EZ KO EZ KM EZ KB	7 3 0	0,065
5.3.	8	Colon descendens	EZ KO EZ KM EZ KB	15 0 0	0,112
6.1.	16	Margo plicatus	OEZ IZ DZ	34 0 0	0,219
6.1.	16	Fundus	OEZ IZ DZ	89 0 0	0,430
6.1.	16	Pylorus	OEZ IZ DZ	6 1 1	0,046
6.2.	13	Duodenum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	15 2 0 0 0 0	0,173

6.2.	13	Jejunum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	15 4 0 0 0 0	0,125
6.2.	13	Ileum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	28 2 0 0 0 0	0,170
6.3.	14	Caecum	EZ KO EZ KM EZ KB	11 2 0	0,151
6.3.	14	Colon ascendens	EZ KO EZ KM EZ KB	17 1 0	0,170
6.3.	14	Colon descendens	EZ KO EZ KM EZ KB	6 1 0	0,050

1.2. Tabelle der TUNEL-Auszählung bei den Fohlen

FOHLEN Nummer	Alter in Tagen	Abschnitt MDT	Fein- Lokalisation	Apoptotische Zellkerne	Apoptose- Rate in %
1.	12	Margo plicatus	OEZ IZ DZ	39 0 1	0,214
1.	12	Fundus	OEZ IZ DZ	127 7 18	0,995
1.	12	Pylorus	OEZ IZ DZ	126 0 5	1,024
1.	12	Duodenum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	20 18 0 0 0 2	0,299
1.	12	Jejunum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	153 151 48 1 0 0	2,010
1.	12	Ileum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO	33 38 6 0	0,369

			EZ KM EZ KB	0 0	
1.	12	Caecum	EZ KO EZ KM EZ KB	*	*
1.	12	Colon ascendens	EZ KO EZ KM EZ KB	327 17 0	2,910
1.	12	Colon descendens	EZ KO EZ KM EZ KB	248 8 0	1,842
2.	7	Margo plicatus	OEZ IZ DZ	17 5 4	0,155
2.	7	Fundus	OEZ IZ DZ	21 9 0	0,213
2.	7	Pylorus	OEZ IZ DZ	13 11 3	0,176
2.	7	Duodenum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	117 26 0 0 0 0	1,161
2.	7	Jejunum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	14 2 1 0 0 0	0,176
2.	7	Ileum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	19 0 0 0 0 0	0,111
2.	7	Caecum	EZ KO EZ KM EZ KB	*	*
2.	7	Colon ascendens	EZ KO EZ KM EZ KB	39 1 0	0,382
2.	7	Colon descendens	EZ KO EZ KM EZ KB	60 1 0	0,437
3.	20	Margo plicatus	OEZ IZ DZ	38 4 2	0,223
3.	20	Fundus	OEZ	27	0,172

			IZ DZ	5 1	
3.	20	Pylorus	OEZ IZ DZ	8 0 0	0,046
3.	20	Duodenum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	83 10 0 0 0 0	0,616
3.	20	Jejunum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	28 7 0 0 0 0	0,179
3.	20	Ileum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	37 4 0 0 0 0	0,199
3.	20	Caecum	EZ KO EZ KM EZ KB	15 1 1	0,290
3.	20	Colon ascendens	EZ KO EZ KM EZ KB	45 2 0	0,528
3.	20	Colon descendens	EZ KO EZ KM EZ KB	39 1 0	0,348

1.3. Tabelle der Lamin A-Auszählung bei den adulten Pferden

ADULTES Nummer	Alter in Jahren	Abschnitt MDT	Fein- Lokalisation	Lamin A- neg. Zellkerne	Rate der Lamin A- neg. ZK in %
1.1.	4	Margo plicatus	OEZ IZ DZ	39 16 1	0,354
1.1.	4	Fundus	OEZ IZ DZ	31 15 6	0,377
1.1.	4	Pylorus	OEZ IZ DZ	18 10 4	0,207
1.2.	22	Duodenum	EZ ZS EZ ZM	38 33	1,178

			EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	23 13 8 1	
1.2.	22	Jejunum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	70 48 29 12 11 2	1,885
1.2.	22	Ileum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	50 39 37 19 9 0	1,554
1.3.	18	Caecum	EZ KO EZ KM EZ KB	42 15 11	1,583
1.3.	18	Colon ascendens	EZ KO EZ KM EZ KB	75 36 11	2,179
1.3.	18	Colon descendens	EZ KO EZ KM EZ KB	88 35 12	1,696
2.1.	6	Margo plicatus	OEZ IZ DZ	71 18 5	0,995
2.1.	6	Fundus	OEZ IZ DZ	41 8 0	0,383
2.1.	6	Pylorus	OEZ IZ DZ	38 12 1	0,375
2.2.	9	Duodenum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	33 21 15 10 5 2	1,042
2.2.	9	Jejunum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	131 92 63 28 6 0	2,618
2.2.	9	Ileum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM	87 73 53 10 0	1,883

			EZ KB	0	
2.3.	6	Caecum	EZ KO EZ KM EZ KB	88 20 7	2,384
2.3.	6	Colon ascendens	EZ KO EZ KM EZ KB	127 46 5	2,522
2.3.	6	Colon descendens	EZ KO EZ KM EZ KB	71 24 6	1,444
3.1.	12	Margo plicatus	OEZ IZ DZ	35 21 9	0,397
3.1.	12	Fundus	OEZ IZ DZ	32 18 3	0,318
3.1.	12	Pylorus	OEZ IZ DZ	26 12 1	0,291
3.2.	17	Duodenum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	39 33 22 11 7 10	1,442
3.2.	17	Jejunum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	110 84 42 19 10 2	2,325
3.2.	17	Ileum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	86 74 41 22 9 2	2,329
3.3.		Caecum	EZ KO EZ KM EZ KB	77 38 24	2,442
3.3.		Colon ascendens	EZ KO EZ KM EZ KB	77 42 12	1,842
3.3.		Colon descendens	EZ KO EZ KM EZ KB	52 32 16	1,299
4.1.	12	Margo plicatus	OEZ IZ DZ	35 17 14	0,481
4.1.	12	Fundus	OEZ IZ	29 15	0,407

			DZ	7	
4.1.	12	Pylorus	OEZ IZ DZ	23 14 7	0,313
4.2.	12	Duodenum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	67 49 31 11 10 2	2,336
4.2.	12	Jejunum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	106 88 50 18 2 0	2,653
4.2.	12	Ileum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	96 92 58 28 5 0	2,918
4.3.	17	Caecum	EZ KO EZ KM EZ KB	144 51 16	3,006
4.3.	17	Colon ascendens	EZ KO EZ KM EZ KB	106 41 19	2,377
4.3.	17	Colon descendens	EZ KO EZ KM EZ KB	43 33 9	1,199
5.1.	25	Margo plicatus	OEZ IZ DZ	53 46 25	0,863
5.1.	25	Fundus	OEZ IZ DZ	46 29 12	0,564
5.1.	25	Pylorus	OEZ IZ DZ	59 47 21	0,710
5.2.	30	Duodenum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	96 66 40 12 1 0	1,698
5.2.	30	Jejunum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM	148 109 61 10 0	2,257

			EZ KB	0	
5.2.	30	Ileum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	200 149 108 48 3 0	3,145
5.3.	8	Caecum	EZ KO EZ KM EZ KB	170 87 41	4,396
5.3.	8	Colon ascendens	EZ KO EZ KM EZ KB	186 74 33	2,821
5.3.	8	Colon descendens	EZ KO EZ KM EZ KB	98 41 13	1,947
6.1.	16	Margo plicatus	OEZ IZ DZ	15 14 15	0,300
6.1.	16	Fundus	OEZ IZ DZ	46 29 16	0,484
6.1.	16	Pylorus	OEZ IZ DZ	49 56 30	0,773
6.2.	13	Duodenum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	83 83 57 11 0 0	1,809
6.2.	13	Jejunum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	80 81 48 2 0 0	1,810
6.2.	13	Ileum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	73 101 51 34 8 0	1,661
6.3.	14	Caecum	EZ KO EZ KM EZ KB	68 24 4	1,374
6.3.	14	Colon ascendens	EZ KO EZ KM EZ KB	163 67 0	2,726
6.3.	14	Colon descendens	EZ KO EZ KM	156 124	1,941

			EZ KB	12	
--	--	--	-------	----	--

1.4. Tabelle der Lamin A-Auszählung bei den Fohlen

FOHLEN Nummer	Alter in Tagen	Abschnitt MDT	Fein-Lokalisation	Lamin A-neg. Zellkerne	Rate der Lamin A-neg. ZK in %
1.	12	Margo plicatus	OEZ IZ DZ	30 4 0	0,282
1.	12	Fundus	OEZ IZ DZ	59 11 1	0,709
1.	12	Pylorus	OEZ IZ DZ	54 23 5	0,708
1.	12	Duodenum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	47 33 23 14 7 2	1,183
1.	12	Jejunum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	111 85 58 30 2 0	2,926
1.	12	Ileum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	106 75 39 21 5 0	2,111
1.	12	Caecum	EZ KO EZ KM EZ KB	*	*
1.	12	Colon ascendens	EZ KO EZ KM EZ KB	173 74 23	4,446
1.	12	Colon descendens	EZ KO EZ KM EZ KB	196 56 11	3,857
2.	7	Margo plicatus	OEZ IZ DZ	32 17 0	0,425
2.	7	Fundus	OEZ IZ DZ	57 6 0	0,483
2.	7	Pylorus	OEZ IZ	37 8	0,391

			DZ	0	
2.	7	Duodenum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	47 34 17 7 2 0	1,216
2.	7	Jejunum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	30 24 12 4 0 0	0,779
2.	7	Ileum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	47 36 25 13 0 0	1,098
2.	7	Caecum	EZ KO EZ KM EZ KB	*	*
2.	7	Colon ascendens	EZ KO EZ KM EZ KB	65 39 27	2,098
2.	7	Colon descendens	EZ KO EZ KM EZ KB	94 38 12	1,882
3.	20	Margo plicatus	OEZ IZ DZ	37 9 0	0,395
3.	20	Fundus	OEZ IZ DZ	30 18 4	0,321
3.	20	Pylorus	OEZ IZ DZ	35 10 1	0,403
3.	20	Duodenum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	42 34 19 9 5 1	1,321
3.	20	Jejunum	EZ ZS EZ ZM EZ ZB EZ KO EZ KM EZ KB	118 75 45 19 0 0	1,989
3.	20	Ileum	EZ ZS EZ ZM	85 56	1,440

			EZ ZB	36	
			EZ KO	14	
			EZ KM	1	
			EZ KB	0	
3.	20	Caecum	EZ KO	44	1,864
			EZ KM	26	
			EZ KB	4	
3.	20	Colon ascendens	EZ KO	117	2,594
			EZ KM	45	
			EZ KB	8	
3.	20	Colon descendens	EZ KO	69	1,792
			EZ KM	37	
			EZ KB	7	

** Proben konnten aufgrund autolytischer Gewebeschäden nicht verwendet werden*

OEZ = Oberflächenepithelzellen
IZ = Epithelzellen des Isthmus
DZ = Epithelzellen der Drüsen
EZ ZS = Epithelzellen der Zottenspitze
EZ ZM = Epithelzellen der Zottenmitte
EZ ZB = Epithelzellen der Zottenbasis
EZ KO = Epithelzellen der Kryptenoberfläche
EZ KM = Epithelzellen der Kryptenmitte
EZ KB = Epithelzellen der Kryptenbasis

IX. Literaturverzeichnis

- Acland HM, Gunson DE, Gillette DM. Ulcerative duodenitis in foals. *Vet Pathol.* 1983;20:653-61.
- Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med.* 1997;3(8):917-21.
- Arai N, Mitomi H, Ohtani Y, Igarashi M, Kakita A, Okayasu I. Enhanced epithelial cell turnover associated with p53 accumulation and high p21 WAF1-CIP1 expression in ulcerative colitis. *Mod Pathol.* 1999;12:604-11.
- Archambault D & St-Laurent G. Induction of apoptosis by equine arteritis virus infection. *Virus Gene.* 2000;20(2):143-7.
- Atilasoy E & Holt PR. Gastrointestinal proliferation and aging. *J Gerontology.* 1993;48(2):B43-9.
- Attaix D & Meslin JC. Changes in small intestinal mucosa morphology and cell renewal in suckling, prolonged-suckling, and weaned lambs. *Am J Physiol.* 1991;261(4):R811-8.
- Avivi-Green C, Polak-charcon S, Madar Z, Schwartz B. Dietary regulation and localisation of apoptosis cascade proteins in the colonic crypt. *J Cell Biochem.* 2000;77:18-29.
- Backway KL, McCulloch EA, Chow S, Hedley DW. Relationships between the mitochondrial permeability transition and oxidative stress during ara-C toxicity. *Cancer Res.* 1997;57(12):2446-51.
- Bellamy COC, Malcomson RDG, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: The biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biol.* 1995;6:3-16.
- Benard O., Madesh M., Anup R., Balsubramanian KA. Apoptotic process in the monkey small intestinal epithelium. 1. Association with glutathione level and its efflux. *Free Rad Biol Med.* 1999;26:245-52.
- Benedetti A, Mancini R, Marucci L, Paolucci F, Jezequel AM, Orlandi F. Quantitative study of apoptosis in normal rat gastroduodenal mucosa. *J Gastroenterol Hepatol.* 1990;5(4):369-74.
- Bernassola F, Rossi A, Melino G. Regulation of transglutaminases by nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;887:83-91.
- Berrebi D, Sautet A, Flejou JF, Dauge MC, Peuchmaur M, Potet F. Ticlopidine induced colitis: A histopathological study including apoptosis. *J Clin Pathol.* 1998;51(4):280-3.
- Bessis MC. Death of a Cell. In: *Swift Motion Picture Laboratories*; 1958.

- Boirivant M, Marini M, Di Felice G. Functional status of intestinal T lymphocytes, regulatory mechanisms, and their variations in the course of Crohn disease and ulcerative colitis. *Ann Ist Super Sanita*. 1999a;35(2):283-9.
- Boirivant M, Marini M, Di Felice G, Pronio AM, Montesani C, Tersigni R, Strober W. Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology*. 1999b;116:557-65.
- Boshuizen JA, Reimerink JHJ, Korteland-van Male AM, van Ham VJJ, Koopmans MPG, Büller HA, Dekker J, Einerhand AWC. Changes in small intestinal homeostasis, morphology, and gene expression during rotavirus infection of infant mice. *J Virol*. 2003;77(24):13005-16.
- Broers JL, Bronnenberg NM, Kuijpers HJ, Schutte B, Hutchison CJ, Ramaeckers FC. Partial cleavage of A-type lamins with their total disintegration from the nuclear lamina during apoptosis. *Eur J Cell Biol*. 2002;81(12):677-91.
- Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH. Apoptosis and necrosis. *Arch Pathol Lab Med*. 1993;117:1208-14.
- Buttke TM & Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today*. 1994;15(1):7-10.
- Buttke TM & Sandstrom PA. Redox regulation of programmed cell death in lymphocytes. *Free Radic Res*. 1995;22(5):389-97.
- Cao BH, Mortensen K, Tornehave D, Larsson LI. Apoptosis in rat gastric antrum: Evidence that regulation by food intake depends on nitric oxide synthase. *J Histochem & Cytochem*. 2000;48(1):123-31.
- Casiano CA, Martin SJ, Green DR, Tan EM. Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/Apo-1)-mediated T cell apoptosis. *J Exp Med*. 1996;184:765-70.
- Casiano CA, Ochs RL, Tan EM. Distinct cleavage products of nuclear proteins in apoptosis and necrosis revealed by autoantibody probes. *Cell Death Diff*. 1998;5:183-90.
- Chang TW, Bartlett JG, Gorbach SL, Onderdonk AB. Clindamycin-induced enterocolitis in hamsters as a model of pseudomembranous colitis in patients. *Infect Immun*. 1978;20(2):526-9.
- Chen G, Sordillo EM, Ramey WG, Reidy J, Holt PR, Krajewski S, Reed JC, Blaser MJ, Moss SF. Apoptosis in gastric epithelial cells is induced by *Helicobacter pylori* and accompanied by increased expression of BAK. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;239(2):626-32.
- Chu SH, Ely IG, Walker WA. Age and cortisone alter host responsiveness to cholera toxin in the developing gut. *Am J Physiol*. 1989;256(1):G220-5.

- Cohen GM, Sun XM, Snowden RT, Dinsdale D, Skilleter DN. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem J.* 1992;286(Pt 2):331-4.
- Cohen MB, Moyer MS, Luttrell M, Giannella RA. The immature rat small intestine exhibits an increased sensitivity and response to Escherichia coli heat-stable enterotoxin. *Pediatr Res.* 1986;20(6):555-60.
- Coles HS, Burne JF, Raff MC. Large-scale normal cell death in the developing rat kidney and its reduction by epidermal growth factor. *Development.* 1993;118(3):777-84.
- Collins JA, Schandl CA, Young KK, Vesely J, Willingham MC. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem.* 1997;45:923-34.
- Colony PC, Kois JM, Peiffer LP. Structural and enzymatic changes during colonic maturation in the fetal and suckling rat. *Gastroenterology.* 1989;97(2):338-47.
- Coopersmith CM & Gordon JI. Gamma-ray induced apoptosis in transgenic mice with proliferative abnormalities in their intestinal epithelium: Re-entry of villus enterocytes into the cell cycle does not affect their radio-resistance but enhances the radiosensitivity of the crypt by inducing p53. *Oncogene.* 1997;15:131-41.
- Cory S & Adams JM. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science.* 1998;281:1322-6.
- Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene.* 2003;22(53):8590-607.
- Dabareiner RM, Sullins KE, White NA, Snyder JR. Serosal injury in the equine jejunum and ascending colon after ischemia-reperfusion or intraluminal distention and decompression. *Vet Surg.* 2001;30(2):114-25.
- Davies MJ. Apoptosis in cardiovascular disease. *Heart.* 1997;77:498-501.
- Davis E, Rush BR, Cox J, DeBey B, Kapil S. Neonatal enterocolitis associated with coronavirus infection in a foal: a case report. *J Vet Diagn Invest.* 2000;12(2):153-6.
- DelCacho E, Gallego M, Lopez-Bernad F, Quilez J, Sanchez-Acedo C. Expression of anti-apoptotic factors in cells parasitized by second-generation schizonts of Eimeria tenella and Eimeria necatrix. *Vet Parasitol.* 2004;125(3-4):287-300.
- Desagher S & Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology.* 2000;10:369-77.
- Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature.* 1997;388:300-4.
- Didenko VV & Hornsby PJ. Presence of double-strand breaks with single-base 3' overhangs in cells undergoing apoptosis but not necrosis. *J Cell Biol.* 1996;135(5):1369-76.

Dietz O & Huskamp B. Handbuch Pferde Praxis. 2. Auflage Ferdinand Enke Verlag Stuttgart. 1999;159-66;411-88.

Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cystein protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med.* 1997;185(4):601-7.

Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Luinetti O, Ricevuti L, Morera R, Solcia E, Corazza GR. Increased enterocyte apoptosis in inflamed areas of Crohn's disease. *Dis Colon Rectum.* 2003;46(11):1498-507.

DosReis GA, Barcinski MA. Apoptosis and parasitism: from the parasite to the host immune response. *Adv Parasitol.* 2001;49:133-61.

Ducket CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, Van Dongen JL, Gilfil MC, Shiels H, Hardwick JM, Thompson CB. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.* 1996;15(11):2685-94.

Duke RC, Ojcius DM, Ding J. Die Apoptose-Regeln und Fehler beim Zellselbstmord. *Spektrum der Wissenschaft.* 1997:26-35.

Dyer JA, Kill IR, Pugh G, Quinlan RA, Lane EB, Hutchison CJ. Cell cycle changes in A-type lamin associations detected in human dermal fibroblasts using monoclonal antibodies. *Chromosome Res.* 1997;5(6):383-94.

Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *An Rev Biochem.* 1999;68:383-424.

East LM, Savage CJ, Traub-Dargatz JL, Dickinson CE, Ellis RP. Enterocolitis associated with *Clostridium perfringens* infection in neonatal foals: 54 cases (1988-1997). *J Am Vet Med Assoc.* 1998;212(11):1751-6.

Eléouet JF, Chilmonczyk S, Besnardeau L, Laude H. Transmissible gastroenteritis coronavirus induces programmed cell death in infected cells through a caspase-dependent pathway. *J Virol.* 1998;72(6):4918-24.

Eléouet JF, Slee EA, Saurini F, Castagné N, Poncet D, Garrido C, Solary E, Martin SJ. The viral nucleocapsid protein of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) is cleaved by caspase-6 and-7 during TGEV-induced apoptosis. *J Virol.* 2000;74(9):3975-83.

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 1998;391:43-50.

Eskes R, Antonsson B, Osen-Sand A, Montessuit S, Richter C, Sadoul R, Mazzei G, Nichols A, Martinou JC. Bax-induced cytochrom c release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *J Cell Biol.* 1998;143(1):217-24.

- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.* 1992;148(7):2207-16.
- Ferguson DR, James PS, Paterson JY, Saunders JC, Smith MW. Aldosterone induced changes in colonic sodium transport occurring naturally during development in the neonatal pig. *J Physiol.* 1979;292:495-504.
- Ferrari D, Stepczynska A, Los M, Wesselsborg S, Schulze-Osthoff K. Differential regulation and ATP requirement for caspase-8 and caspase-3 activation during CD95- and anticancer drug-induced apoptosis. *J Exp Med.* 1998;188(5):979-84.
- Fesus L, Thomazi V, Falus A. Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett.* 1987;224(1):104-8.
- Finkel Y & Aperia A. Role of aldosterone for control of colonic NaKATPase activity in weanling rats. *Pediatr Res.* 1986;20(3):242-5.
- Fiorentini C, Fabbri A, Falzano L, Fattorossi A, Matarrese P, Rivabene R, Donelli G. Clostridium difficile toxin B induces apoptosis in intestinal cultured cells. *Infect Immun.* 1998;66:2660-5.
- Fishbein TM, Liu J, Wang L, Li Y, Boros P. Increased apoptosis is specific for acute rejection in rat small bowel transplant. *J Surg Res.* 2004;119(1):51-5.
- Flemming W. Ueber die Bildung von Richtfiguren in Saegethiereiern beim Uebergang Graaf'scher Follikel. *Arch Anat EntwGesch.* 1885:221-44.
- Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermann R, Ullmann C, Lorenz-Meyer S, Schaper J. Apoptosis is initiated by myokardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:197-208.
- Friend DS, Gurish MF, Austen KF, Hunt J, Stevens RL. Senescent jejunal mast cells and eosinophils in the mouse preferentially translocate to the splen and draining lymph node, respectively, during the recovery phase of helminth infection. *J Immunol.* 2000;165(1):344-52.
- Fukuyama K, Iwakiri R, Noda T, Kojima M, Utsumi H, Tsunada S, Sakata H, Ootani A, Fujimoto K. Apoptosis induced by ischemia-reperfusion and fasting in gastric mucosa compared to small intestinal mucosa in rats. *Dig Dis Sci.* 2001;46(3):545-9.
- Furr MO, Murray MJ, Ferguson DC. The effects of stress on gastric ulceration, T3, T4, reverse T3 and cortisol in neonatal foals. *Equine Vet J.* 1992;24(1):37-40.
- Gardner ML & Steele DL. Is there circadian variation in villus height in rat small intestine? *Q J Exp Physiol.* 1989;74(3):257-65.

- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 1992;119:493-501.
- Gavrilescu LC, Denkers EY. Apoptosis and the balance of homeostatic and pathologic responses to protozoen infection. *Am Soc Microbiol Infect Immunol.* 2003;71(11):6109-15.
- Gerard MP, Blikslager AT, Roberts MC, Tate LP Jr, Argenzio RA. The characteristics of intestinal injury peripheral to strangulating obstruction lesions in the equine small intestine. *Equine Vet J.* 1999;31(4):331-5.
- Gianini M, Sutter O, Burger D, Bracher V. Gastrointestinal and endocrine function during "foal heat diarrhoea" in healthy foals. *J Repr Fert Ltd.* 2000;56:717-24.
- Goebel S, Gross U, Luder CGK. Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly(ADP-ribose)-polymerase expression. *J Cell Sci.* 2001;114:3495-3505.
- Gonzales DH & Neupert W. Biogenesis of mitochondrial c-type cytochromes. *J Bioenerg Biomembr.* 1990;22(6):753-68.
- Goping IS, Gross A, Lavoie JN, Nguyen M, Jemmerson R, Roth K, Korsmeyer SJ, Shore GC. Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol.* 1998;143(1):207-15.
- Grant TD, Specian RD. Epithelial cell dynamics in rabbit cecum and proximal colon P1. *Anat Rec.* 2001;264(4):427-37.
- Groos S, Hunefeld G, Luciano L. Epithelial cell turnover – extracellular matrix relationship in the small intestine of human adults. *Ital J Anat Embryol.* 2001;106:353-61.
- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Develop.* 1999;13:1899-911.
- Grossman J, Fiocchi C, Levine AD. Extracellular matrix (ECM) orchestrates death and survival of human intestinal epithelial cells (IEC). *Gastroenterology.* 1997;112:A987.
- Grossman J, Mohr S, Lapetina EG, Fiocchi C, Levine AD. Sequential and rapid activation of select caspases during apoptosis of normal intestinal epithelial cells. *Am J Physiol.* 1998;274:G1117-24.
- Grossmann J, Walther K, Artinger M, Rummele P, Woenckhaus M, Scholmerich J. Induction of apoptosis before shedding of human intestinal epithelial cells. *Am J Gastroenterol.* 2002;97(6):1421-8.
- Grummer B, Bendfeldt S, Wagner B, Greiser-Wilke I. Induction of intrinsic apoptotic pathway in cells infected with cytopathic bovine virus diarrhoea virus. *Virus Res.* 2002;90(1-2):143-53.
- Guilly MN, Bensusan A, Bourge JF, Bornens M, Courvalin JC. A human T lymphoblastic cell line lacks lamins A and C. *EMBO J.* 1987;6(12):3795-9.

- Guy-Grand D, DiSanto JP, Henchoz P, Malassis-Seris M, Vassalli P. Small bowel enteropathy: Role of intraepithelial lymphocytes and of cytokines (IL-12, IFN-gamma, TNF) in the induction of epithelial cell death and renewal. *Eur J Immunol.* 1998;28:730-44.
- Guy JS, Breslin JJ, Breuhaus B, Vivrette S, Smith LG. Charakterization of a coronavirus isolated from a diarrheic foal. *J Clin Microbiol.* 2000;38(12):4523-6.
- Häcker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000;301(1):5-17.
- Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: The importance of apoptosis. *J Cell Sci.* 1994;107:3569-77.
- Hass R, Busche R, Luciano L, Reale E, Engelhardt WV. Lack of butyrate is associated with induction of bax and subsequent apoptosis in proximal colon of guinea pig. *Gastroenterology.* 1997;112:1036-40.
- Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanism and implications for cardiovascular disease. *Circulation Research.* 1998;82:1111-29.
- Helmrath MA, Erwin CR, Shin CE, Warner BW. Enterocyte apoptosis is increased following small bowel resection. *J Gastrointest Surg.* 1998;2(1):44-9.
- Herholz C, Miserez R, Nicolet J, Frey J, Pophoff M, Gibert M, Gerber H, Straub R. Prevalence of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. *J Clin Microbiol.* 1999;37(2):358-61.
- Hinnebusch BF, Ma Q, Henderson JW, Siddique A, Archer SY, Hodin RA. Enterocyte response to ischemia is dependent on differentiation state. *J Gastrointest Surg.* 2002;6:403-9.
- Hirasawa R, Tatsuta M, Iishi H, Yano H, Baba M, Uedo N, Sakai N. Increase in apoptosis and decrease in ornithine decarboxylase activity of the gastric mucosa in patients with atrophic gastritis and gastric ulcer after successful eradication of *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol.* 1999;94(9):2398-402.
- Holland RE, Grimes SD, Walker RD, Wilson RA. Experimental inoculation of foals and pigs with an enterotoxigenic *E. Coli* isolated from a foal. *Vet Microbiol.* 1996;52(3-4):249-57.
- Holt PR & Yeh KY. Colonic proliferation is increased in senescent rats. *Gastroenterology.* 1988;95(6):1556-63.
- Hotchkiss RS, Schmiege RE Jr, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Karl IE, Buchman TG. Rapid onset of intestinal epithelial and lymphocyte apoptotic cell death in patients with trauma and shock. *Crit Care Med.* 2000;28(9):3207-17.
- Houghton J, Korah RM, Condon MR, Kim KH. Apoptosis in *Helicobacter pylori*-associated gastric and duodenal ulcer disease is mediated via the Fas antigen pathway. *Dig Dis Sci.* 1999;44(3):465-78.

Hurle JM, Ros MA, Climent V, Garcia-Martinez V. Morphology and significance of programmed cell death in the developing limb bud of the vertebrate embryo. *Micro Res Tech.* 1996;34:236-46.

Hurle JM, Ros MA, Garcia-Martinez V, Macias D, Ganán Y. Cell death in the embryonic developing limb. *Scan Micro.* 1995;9(2):519-34.

Hyoh Y, Ishizaka S, Horii T, Fujiwara A, Tegoshi T, Yamada M, Arizono N. Activation of caspases in intestinal villus epithelial cells of normal and nematode infected rats. *Gut.* 2002;50:71-7.

Hyoh Y, Nishida M, Tegoshi T, Yamada M, Uchikawa R, Matsuda S, Arizono N. Enhancement of apoptosis with loss of cellular adherence in the villus epithelium of the small intestine after infection with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis* in rats. *Parasitology.* 1999;119:199-207.

Ikeda H, Suzuki Y, Suzuki M, Koike M, Tamura J, Tong J, Nomura, Itoh G. Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium. *Gut.* 1998;42(4):530-7.

Ikuno N, Soda H, Watanabe M, Oka M. Irinotecan (CPT-11) and characteristic mucosal changes in the mouse ileum and cecum. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(24):1876-83.

Ishizuka S, Martin K, Booth C, Potten CS, deMurcia G, Bürkle A, Kirkwood TBL. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a survival factor for radiation-exposed intestinal epithelial stem cells *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(21):6198-205.

Iwakiri R, Gotoh Y, Noda T, Sugihara H, Fujimoto K, Fuseler J, Aw TY. Programmed cell death in rat intestine: effect of feeding and fasting. *Scand J Gastroenterol.* 2001;36(1):39-47.

Iwamoto M, Koji T, Makiyama K, Kobayashi N, Nakane PK. Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis. *J Pathol.* 1996;180(2):152-9.

Iwamoto M, Makiyama K, Koji T, Nakane PK. Expression of Fas and Fas-ligand in epithelium of ulcerative colitis. *Nippon Rinsho.* 1996;54:1970-4.

Iwanaga T. The involvement of macrophages and lymphocytes in the apoptosis of enterocytes. *Arch Histol Cytol.* 1995;58:151-9.

Iwanaga T, Hoshi O, Han H, Takahashi-Iwanaga H, Uchiyama Y, Fujita T. Lamina propria macrophages involved in cell death (apoptosis) of enterocytes in the small intestine of rats. *Arch Histol Cytol.* 1994;57(3):267-76.

Jacobs DM & Ackerman SH. Differential growth rate of rat gastric mucosal cells during postnatal ontogeny. *Am J Physiol.* 1984;247(6):G645-50.

- Jenkins HR, Fenton TR, McIntosh N, Dillon MJ, Milla PJ. Development of colonic sodium transport in early childhood and its regulation by aldosterone. *Gut*. 1990;31(2):194-7.
- Jones RL. Clostridial enterocolitis. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2000;16(3):471-85.
- Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest*. 1995;95(1):55-65.
- Jürgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrom c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(9):4997-5002.
- Keenam KP, Sharpnack DD, Collins H, Formal SB, O'Brian AD. Morphologic evaluation of the effects of Shiga toxin and E. coli Shiga-like toxin on the rabbit intestine. *Am J Pathol*. 1986;125:69-80.
- Kerr JFR. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol*. 1971;105:13-20.
- Kerr JFR, Searle J, Harmon BV, Bishop CJ. Apoptosis. In perspectives on mammalian cell death. Potten CS, editor. *Oxford University Press*. 1987:93-128.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239-57.
- Kidd VJ. Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annu Rev Physiol*. 1998;60:533-73.
- Kiechle FL & Zhang X. Apoptosis: A brief review. *J Clin Ligand Assay*. 1998;21(1):58-61.
- Kim B, Kim O, Tai JH, Chae C. Transmissible gastroenteritis virus induces apoptosis in swine testicular cell line but not in intestinal enterocytes. *J Comp Path*. 2000;123:64-6.
- Kim JM, Eckmann L, Savidge TC, Lowe DC, Witthoft T, Kagnoff MF. Apoptosis of human intestinal epithelial cells after bacterial invasion. *J Clin Invest*. 1998;102:1815-23.
- Kim YM, Kim TH, Seol DW, Talanian RV, Billiar TR. Nitric oxide suppression of apoptosis occurs in association with an inhibition of bcl-2 cleavage and cytochrom c release. *J Biol Chem*. 1998;273(47):31437-41.
- Kim YM, Talanian RV, Billiar TR. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem*. 1997;272(49):31138-48.
- Kirsch DG, Doseff A, Chau BN, Lim DS, deSouza-Pinto N, Hansford R, Kastan MB, Lazebnik YA, Hardwick JM. Caspase-3-dependent cleavage of bcl-2 promotes release of cytochrom c. *J Biol Chem*. 1999;274(30):21155-61.

- Kliche KO, Clement JH, Höffken K. Apoptose Mechanismen, Regulation und therapeutische Modulation als klinische Perspektive. *Onkologie*. 1999;5:891-897.
- Kong M & Schusser GF. Do different diets and food deprivation influence apoptosis in the squamous mucosa of the equine stomach. *Tierärztl Praxis, 3. Leipziger Tierärztekongress 2005*;G 6/2004:81.
- Konturek PC, Brzozowski T, Duda A, Kwiecien S, Lober S, Dembinski A, Hahn EG, Konturek SJ. Epidermal growth factor and prostaglandin E(2) accelerate mucosal recovery from stress-induced gastric lesions via inhibition of apoptosis. *J Physiol Paris*. 2001;95(1-6):361-7.
- Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Pajdo R, Konturek JE, Kwiecien S, Taut A, Hahn EG. Apoptosis in gastric mucosa with stress-induced gastric ulcers. *J Physiol Pharmacol*. 1999;50(2):211-25.
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*. 1998;60:619-42.
- Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssière JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J*. 1995;9:1277-87.
- Kuwana T, Smith JJ, Muzio M, Dixit V, Newmeyer DD, Kornbluth S. Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrom c. *J Biol Chem*. 1998;273(26):16589-94.
- Lavoie JP, Drolet R, Parsons D, Leguillette R, Sauvageau R, Shapiro J, Houle L, Halle G, Gebhart CJ. Equine proliferative enteropathy: a cause of weight loss, colic, diarrhoea and hypoproteinaemia in foals on three breeding farms in Canada. *Equine Vet J*. 2000;32(5):418-25.
- Lazebnik YA, Cole S, Cooke CA, Nelson WG, Earnshaw WC. Nuclear events of apoptosis *in vitro* in cell-free mitotic extracts: A model system for analysis of the active phase of apoptosis. *J Cell Biol*. 1993;123(1):7-22.
- Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*. 1994;371:346-7.
- Lazebnik YA, Takahashi A, Moir RD, Goldman RD, Poirier GG, Kaufmann SH, Earnshaw WC. Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995a;92:9042-46.
- Lazebnik YA, Takahashi A, Poirier GG, Kaufmann SH, Earnshaw WC. Charakterization of the executive phase of apoptosis *in vitro* using extracts from condemned-phase cells. *J Cell Sci Suppl*. 1995b;19:41-9.
- Lee FD. Importance of apoptosis in the histopathology of drug related lesions in the large intestine. *J Clin Pathol*. 1993;46(2):118-22.

- LeGrand EK. Implications of early apoptosis of infected cells as an important host defense. *Medical Hypothesis*. 2000;54(4):591-6.
- Legrottalgie R, Agrimi P. Rotavirus infection in horses. Genom profile analysis of a rotavirus isolated from an infected foal. *Microbiologica*. 1992;15(2):209-12.
- Leist M, Single B, Castoldi F, Kühnle S, Nicotera P. Intracellular adenosin triphosphat (ATP) concentration: A switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med*. 1997;185(8):1481-86.
- Leist M, Single B, Naumann H, Fava E, Simon B, Kühnle S, Nicotera P. Nitric oxide inhibits execution of apoptosis at two distinct ATP-dependent Steps upstream and downstream of mitochondrial cytochrom c release. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;258:215-21.
- Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B. The mitochondrial permeability transition in cell death: A common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochem Biophys Acta*. 1998;1366(1-2):177-96.
- Le'Negrate G, Selva E, Auberger P, Rossi B, Hofman P. Sustained polymorphonuclear leucocyte transmigration induces apoptosis in T84 intestinal epithelial cells. *J of Cell Biol*. 2000;150:1479-88.
- Liebich HG. Funktionelle Histologie. Farbatlas und Kurzlehrbuch der mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere. 2. Auflage, Schattauer. 1993;165-93.
- Liesenfeld O, Kosek JC, Suzuki Y. Gamma interferon induces Fas-dependent apoptosis of peyer's patch T cells in mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*. 1997;65(11):4682-9.
- Lin C, Holland RE Jr, Donofrio JC, McCoy MH, Tudor LR, Chamber TM. Caspase activation in equine influenza virus induced apoptotic cell death. *Vet Microbiol*. 2002;84(4):357-65.
- Lindahl T, Satoh MS, Poirier GG, Klungland A. Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem Sci*. 1995;20(10):405-11.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrom c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997;91:479-89.
- Liu J, Li ZS, Wan XJ, Wang W. Expression and function of apoptosis-related genes Bcl-2/Bax and Fas/FasL in the course of stress ulcer. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2003;83(6):504-9.
- Liu LU, Holt PR, Krivosheyev V, Moss SF. Human right and left colon differ in epithelial cell apoptosis and in expression of Bak, a pro-apoptotic Bcl-2 homologue. *Gut*. 1999;45(1):45-50.

- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrom c. *Cell*. 1996;86:147-57.
- Liu X, Li P, Widlak P, Zou H, Xu L, Garrard WT, Wang X. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:8461-66.
- Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*. 1997;89(2):175-84.
- Lonnroth I, Lange S. Toxin A of *Clostridium difficile*: production, purification and effect in mouse intestine. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 1983;91(6):395-400.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a bcl-2 interacting protein, mediates cytochrom c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998;94:481-90.
- MacAllister CG, Morgan SJ, Borne AT, Pollet RA. Comparison of adverse effects of phenylbutazone, flunixin meglumine, and ketoprofen in horses. *J Am Vet Med Assoc*. 1993;202(1):71-7.
- Madesh M, Benard O, Balasubramanian KA. Apoptotic process in the monkey small intestinal epithelium: 2. Possible role of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 1999;26:431-8.
- Madesh M, Bhaskar L, Balasubramanian KA. Enterocyte viability and mitochondrial function after graded intestinal ischemia and reperfusion in rats. *Mol Cell Biochem*. 1997;167:81-7.
- Mahida YR, Galvin A, Makh S, Hyde S, Sanfilippo L, Borriello SP, Sewell HF. Effect of *Clostridium difficile* toxin A on human colonic lamina propria cells: Early loss of macrophages followed by T-cell apoptosis. *Infect and Immunol*. 1998;66(11):5462-69.
- Mahida YR, Makh S, Hyde S, Gray T, Borriello SP. Effect of *Clostridium difficile* toxin A on human intestinal epithelial cells: Induction of interleukin-8 production and apoptosis after cell detachment. *Gut*. 1996;38:337-47.
- Majno G & Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 1995;146(1):3-15.
- Mannick JB, Miao XQ, Stamler JS. Nitric oxide inhibits Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 1997;272(39):24125-8.
- Martin SJ & Green DR. Protease activation during apoptosis: Death by a thousand cuts? *Cell*. 1995;82:349-52.
- Martins LM & Earnshaw WC. Apoptosis: Alive or kicking in 1997. *Cell Biol*. 1997;7:111-4.

- Masri MD, Merrit AM, Gronwall R, Burrows CF. Faecal composition in foal heat diarrhoea. *Equine Vet J.* 1986;18(4):301-6.
- Mayer A, Neupert W, Lill R. Translocation of apocytochrom c across the outer membrane of mitochondria. *J Biochem.* 1995;270(21):12390-7.
- Mayhew TM, Myklebust R, Whybrow A, Jenkins R. Epithelial integrity, cell death and cell loss in mammalian small intestine. *Histol Histopathol.* 1999;14(1):257-67.
- McEvan GT, Schousboe B, Nielsen CG, Skadhauge E. Effect of age on the secretory capacity of pig small intestine in vivo and in vitro. *Am J Physiol.* 1990;259(3):G474-80.
- Melino G, Bernassola F, Knight RA, Corasaniti MT, Nistico G, Finazzi-Agro A. S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature.* 1997;388:432-3.
- Melino G & Piacentini M. Tissue transglutaminase in cell death: A downstream or a multifunctional upstream effector? *FEBS Lett.* 1998;430:59-63.
- Menard D, Dagenais P, Calvert R. Morphological changes and cellular proliferation in mouse colon during fetal and postnatal development. *Anat Rec.* 1994;238(3):349-59.
- Mentschel J, Claus R. Increased butyrate formation in the pig colon by feeding raw potato starch leads to a reduction of colonocyte apoptosis and shift to stem cell compartment. *Metabolism Clinical and Experimental.* 2003;52:11.
- Meschter CL, Gilbert M, Krook L, Maylin G, Corradino R. The effects of phenylbutazone on the intestinal mucosa of the horse: a morphological, ultrastructural and biochemical study. *Equine Vet J.* 1990;22(4):255-63.
- Messam CA, Pittman RN. Asynchrony and commitment to die during apoptosis. *Exp Cell Res.* 1998;238:389-98.
- Miller DK. The role of the caspase family of cysteine proteases in apoptosis. *Immunol.* 1997;9:35-49.
- Mohr S, Zech B, Lapetina EG, Brune B. Inhibition of caspase-3 by s-nitrosylation and oxidation caused by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;238:387-91.
- Mosimann W & Kohler T. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere. *Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.* 1990;168-74.
- Moss SF, Agarwal B, Arber N, Guan RJ, Krajewska M, Krajewski S, Reed JC, Holt PR. Increased intestinal Bax expression results in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996a;223(1):199-203.
- Moss SF, Attia L, Scholes JV, Walters JR, Holt PR. Increased small intestinal apoptosis in coeliac disease. *Gut.* 1996b;39(96):811-7.
- Moss SF, Calam J, Agarwal B, Wang S, Holt PR. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut.* 1996c;38(4):498-501.

Murray MJ, Murray CM, Sweeney HJ, Weld J, Digby NJ, Stoneham SJ. Prevalence of gastric lesions in foals without signs of gastric disease: an endoscopic survey. *Equine Vet J.* 1990;22:6-8.

Murray MJ. Endoscopic appearance of gastric lesions in foals: 94 cases (1987-1988). *J Am Vet Assoc.* 1989;195(8):1135-41.

Murray MJ, Grodinsky C, Anderson CW, Radue PF, Schmidt GR. Gastric ulcers in horses: a comparison of endoscopic findings in horses with and without clinical signs. *Equine Vet J Suppl.* 1989;(7):68-72.

Murray MJ, Schaudies RP, Cavey DM. Epidermal growth factor-like activity in mares' milk. *Am J Vet Res.* 1992;53(10):1729-31.

Murray RD, McClung HJ, Li BU, Ailabouni A. Short-chain fatty acid profile in the colon of newborn piglets using fecal water analysis. *Pediatr Res.* 1987;22(6):720-4.

Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/Apo-1) death-inducing signaling complex. *Cell.* 1996;85(6):817-27.

Nagata S & Golstein P. The Fas death factor. *Science.* 1995;267(5203):1449-56.

Nash PB, Purner MB, Leon RP, Clarke P, Duke RC, Curiel TJ. Toxoplasma gondii-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J Immunol.* 1998;160:1824-30.

Netherwood T, Binns M, Townsend H, Wood JL, Mumford JA, Chanter N. The Clostridium perfringens enterotoxin from equine isolates; its characterization, sequence and role in foal diarrhoea. *Epidemiol Infect.* 1998;120(2):193-200.

Netherwood T, Wood JL, Townsend HG, Mumford JA, Chanter N. Foal diarrhoea between 1991 and 1994 in the United Kingdom associated with Clostridium perfringens, rotavirus, Strongyloides westeri, and Cryptosporidium spp. *Epidemiol Infect.* 1996;117(2):375-83.

Nickel R, Schummer A, Seiferle E. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere; Band II Eingeweide. 7. Auflage, Blackwell Wissenschafts-Verlag. 1995;103-17;194-208.

Nigg EA. Assembly and cell cycle dynamics of the nuclear lamina. *Semin. Cell Biol.* 1992;3(4):245-53.

Nishikawa M, Takeda K, Sato EF, Kuroki T, Inoue M. Nitric oxide regulates energy metabolism and bcl-2 expression in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1998;274:G797-801.

Noda T; Iwakiri R, Fujimoto K, Matsuo S, Aw TY. Programmed cell death induced by ischemia-reperfusion in rat intestinal mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1998;274:G270-6.

- Oberhammer FA, Hochegger K, Fröschl G, Tiefenbacher R, Pavelka M. Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+B, without enhanced activation of cdc2 Kinase. *J Cell Biol.* 1994;126(4):827-37.
- Ogura E, Senzaki H, Yamamoto D, Yoshida R, Takada H, Hioki K, Tsubura A. Prognostic significance of Bcl-2, Bcl-xL/S, Bax and Bak expression in colorectal carcinomas. *Oncol Rep.* 1999;6:365-9.
- Ojcius DM, Perfettini JL, Bonnin A, Laurent F. Caspase-dependent apoptosis during infection with *Cryptosporidium parvum*. *Microbes Infect.* 1999;1(14):1163-8.
- Okuno S, Shimizu S, Ito T, Nomura M, Hamada E, Tsujimoto Y, Matsuda H. Bcl-2 prevents caspase independent cell death. *J Biol Chem.* 1998;273:34272-7.
- O'Loughlin EV, Hunt DM, Kreutzmann D. Postnatal development of colonic electrolyte transport in rabbits. *Am J Physiol.* 1990;258(3):G447-53.
- Otha C, Hoshi A, Gota H, Tsunoda N, Tagami M, Akita H. Epizootiological and virological studies of foal diarrhea associated with serotype 3 rotavirus. *Nippon Juigaku Zasshi.* 1990;52(5):1049-56.
- Pacha J. Development of intestinal transport function in mammals. *Physiol Rev.* 2000;80(4):1633-67.
- Pacha J, Pohlova I, Karen P. Regulation of amilorid-sensitive Na⁺ transport in immature rat distal colon by aldosterone. *Pediatr Res.* 1995;38(3):356-60.
- Papaconstantinou HT, Hwang KO, Rajaraman S, Hellmich MR, Townsend JrCM, Ko TC. Glutamin deprivation induces apoptosis in intestinal epithelial cells. *Surgery.* 1998;124:152-60.
- Patel T, Gores GJ, Kaufmann SH. The role of proteases during apoptosis. *FASEB J.* 1996;10:587-97.
- Paulin-Levasseur M, Scherbarth A, Traub U, Traub P. Lack of lamins A and C in mammalian hemopoetic cell lines devoid of intermediate filament proteins. *Eur J Cell Biol.* 1988;47(1):121-31.
- Piguet PT, Vesin C, Donati Y, Barazzone C. TNF-induced enterocyte apoptosis and detachment in mice: Induction of caspases and prevention by a caspase inhibitor, ZVAD-fmk *Lab Invest.* 1999;79:495-500.
- Pompeiano M, Hvola M, Chun J. Onset of apoptotic DNA fragmentation can precede cell elimination by days in the small intestinal villus cells. *Cell Death Differ.* 1998;5:702-9.
- Porter AG & Janicke RU. Emerging roles of caspase 3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999;6:99-104.

- Potten CS, Al-Barwari SE, Hume WJ, Searle J. C rhythm of presumptive stem cells in three different epithelia of the mouse. *Cell Tissue Kinet.* 1977;10(6):557-68.
- Potten CS & Loeffler M. Stem cells: Attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development.* 1990;110:1001-20.
- Potten CS, Meritt A, Hickman J, Hall P, Faranda A. Characterization of radiation-induced apoptosis in the small intestine and its biological implications. *Int J Radiat Biol.* 1994;65(1):71-8.
- Potten CS, Wilson JW, Booth C. Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium. *Stem Cells.* 1997;15(2):82-93.
- Potter GD, Sellin JH, Burlingame SM. Bile acid stimulation of cyclic AMP and ion transport in developing rabbit colon. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1991;13(4):335-41.
- Price AB. Pathology of drug-associated gastrointestinal disease. *Brit J Clin Pharmacol.* 2003;56(5):477.
- Ramachandran A, Madesh M, Balasubramanian KA.** Apoptosis in the intestinal epithelium: Its relevance in normal and pathophysiological conditions. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000;15:109-120.
- Rampino N, Yamamoto H, Inov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M. Somatic frameshift mutations in the Bax gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science.* 1997;275:967-9.
- Ramzy PI, Wolf SE, Irtun O, Hart DW, Thompson JC, Herndon DN. Gut epithelial apoptosis after severe burn: effects of gut hypoperfusion. *J Am Coll Surg.* 2000;190(3):281-7.
- Rao L, Perez D, White E. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol.* 1996;135(6):1441-55.
- Richter RA, Freeman DE, Wallig M, Whittam T, Baker GJ. *In vitro* anion transport alterations and apoptosis induced by phenylbutazone in the right dorsal colon of ponies. *Am J Vet Res.* 2002;63(7):934-41.
- Rober RA, Gieseler RK, Peters JH, Weber K, Osborn M. Induction of nuclear lamins A/C in macrophages in vitro cultures of rat bone marrow precursor cells and human blood monocytes, and in macrophages elicited in vivo by thioglycollate stimulation. *Exp Cell Res.* 1990a;190(2):185-94.
- Rober RA, Sauter H, Weber K, Osborn M. Cells of the cellular immune and hemopoetic system of the mouse lack lamins A/C: distinction versus other somatic cells. *J Cell Sci.* 1990b;95(4):587-98.
- Robinson NE. Current Therapy in Equine Medicine. 4th Ed., W.B. Saunders c.o., Philadelphia;1997;627-36.

- Roffler B, Fäh A, Sauter SN, Hammon HM, Gallmann P, Brem G, Blum JW. Intestinal morphology, epithelial cell proliferation, and absorptive capacity in neonatal calves fed milk-born insulin-like growth factor-1 or a colostrum extract. *J Dairy Sci.* 2003;86:1797-1806.
- Rossig L, Fichtlscherer B, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM, Mulsch A, Dimmeler S. Nitric oxide inhibits caspase-3 by s-nitrosylation *in vivo*. *J Biol Chem.* 1999;274(11):6823-6.
- Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel pro related to baculoviral inhibitor of apoptosis protein. *Cell.* 1995;83(7):1243-52.
- Rowe EL, White NA, Buechner-Maxwell V, Robertson JL, Ward DL. Detection of apoptotic cells in intestines from horses with and without gastrointestinal tract disease. *Am J Vet Res.* 2003;64(8):982-8.
- Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani-Baird S, Besner-Johnston A, Lefebvre C, Kang X, et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell.* 1995;80(1):167-78.
- Rubio CA, Hubbard GB, Frost P. Apoptotic colonic disease: A new entity in a primate. *In vivo.* 2001;15(1):35-7.
- Rubio CA, Jacobsson B. Apoptotic colonic disease: A new clinico-pathological entity. *In vivo.* 2001;16(4):235-7.
- Ruemmele FM & Seidman EG. Cytokine-intestinal epithelial cell interactions: Implications for immune mediated bowel disorders. *Zhonghua Min Guo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi.* 1998;39:1-8.
- Ruifrok AC, Mason KA, Lozano G, Thames HD. Spatial and temporal Patterns of expression of epidermal growth factor, transforming growth factor alpha and transforming growth factor beta 1-3 and their receptors in mouse jejunum after radiation treatment. *Radiat Research.* 1997;147:1-12.
- Sandoval M, Zhang XJ, Liu X, Mannick EE, Clark DA, Miller MJS. Peroxynitrite-induced apoptosis in T84 and RAW 264.7 cells: Attenuation by L-ascorbic acid. *Free Radic Biol Med.* 1997;22(3):489-95.
- Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research.* 2000;45(3):528-37.
- Schaper J, Lorenz-Meyer S, Suzuki K. The role of apoptosis in dilated cardiomyopathy. *Herz.* 1999;24(3):219-24.
- Scheving LA, Jin WH, Chong KM, Gardner W, Cope FO. Dying enterocytes downregulate signaling pathways converging on Ras: Rescue by protease inhibition. *Am J Physiol.* 1998;274:C1363-72.

- Schiefer HB. Equine colitis "X", still an enigma? *Can Vet J.* 1981;22(5):162-5.
- Schmitz GG, Walter T, Seibel R, Kessler C. Nonradioactive labeling of oligonucleotides *in vitro* with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal Biochem.* 1991;192(1):222-31.
- Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem.* 1998;254:439-59.
- Schweizer M, Peterhans E. Oxidative stress in cells infected with bovine viral diarrhoea virus: a crucial step in the induction of apoptosis. *J Gen Virol.* 1999;80:1147-55.
- Sgonc R & Gruber J. Apoptosis detection: An overview. *Exp Gerontol.* 1998;33(6):525-33.
- Sgonc R & Wick G. Methods for the detection of apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 1994;105(4):327-32.
- Shah KA, Shurey S, Green CJ. Apoptosis after intestinal ischemia-reperfusion injury: a morphological study. *Transplantation.* 1997;64(10):1393-7.
- Shibahara T, Sato N, Waguri S et al. The fate of effete epithelial cells at the villus tips of the human small intestine. *Arch Histol Cytol.* 1995;58:205-19.
- Sinai AP, Payne TM, Carmen JC, Hardi L, Watson SJ, Molestina RE. Mechanism underlying the manipulation of host apoptotic pathways by *Toxoplasma gondii*. *Inter J Parasitol.* 2004;34:381-91.
- Sipos F, Zagoni T, Molnar B, Tulassay Z. Changes in the proliferation and apoptosis of colonic epithelial cells in correlation with histologic activity of ulcerative Colitis. *Orv Hetil.* 2002;143:2485-8.
- Skulachev VP. Cytochrom c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Letters.* 1998;423:275-80.
- Smith BP. Equine salmonellosis: a contemporary view. *Equine Vet J.* 1981;13(3):147-51.
- Smith MW. Autoradiographic analysis of alanine uptake by newborn pig intestine. *Experientia.* 1981;37(8):868-70.
- Solary E, Bertrand R, Kohn KW, Pommier Y. Differential induction of apoptosis in undifferentiated and differentiated HL-60 cells by DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Blood.* 1993;81(5):1359-68.
- Sommer U & Kressin M. Proliferation in the gastric epithelium of the bovine abomasum during foetal development as revealed by Ki-67 immunocytochemistry. *Anat Histol Embryol.* 2001;30:169-73.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: The Fas/Apo-1 protease Mch5 is a CrmA-

inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:14486-91.

Stachura J, Tarnawski A, Dabros W. Apoptosis: genetically programmed physiologic cell loss in normal gastric oxyntic mucosa and in mucosa of grossly healed gastric ulcer. *J Clin Gastroenterol*. 1993;17(1):S70-7.

Sterle M & Pipan N. Analysis of the cell death in the mucoid epithelium of mouse stomach. *Folia Histochem et Cytobiol*. 1994;32(3):155-60.

Stern LE, Falcone RA Jr, Huang F, Kemp CJ, Erwin CR, Warner BW. Epidermal growth factor alters the bax: bcl-w ratio following massive small bowel resection. *J Surg Res*. 2000;91(1):38-42.

Stevenson NR, Day SE, Sitren H. Circadian rhythmicity in rat intestinal villus length and cell number. *Int J Chronobiol*. 1979;6(1):1-12.

Strater J, Wellisch I, Riedl S, Walczak H, Koretz K, Tandara A, Krammer PH, Moller P. CD95 (Apo-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1997;113(1):160-7.

Sullins KE, White NA, Lundin CS, Dabareiner R, Gaulin G. Prevention of ischemia-induced small intestinal adhesions in foals. *Equine Vet J*. 2004;36(5):370-5.

Sun Z, Wang X, Deng X, Lasson A, Wallen R, Hallberg E, Andersson R. The influence of intestinal ischemia and reperfusion on bidirectional intestinal barrier permeability, cellular membrane integrity, proteinase inhibitors, and cell death in rats. *Shock*. 1998a;10:203-12.

Sun Z, Wang X, Wallen R, Deng X, Du X, Hallberg E, Andersson R. The influence of apoptosis on intestinal barrier integrity in rats. *Scand J Gastroenterol*. 1998b;33:415-22.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999;397:441-6.

Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochem Biophys Acta*. 1998;1366:151-65.

Suzuki Y, Mori K, Iwanaga T. Intraepithelial gamma delta T cells are closely associated with apoptotic enterocytes in the bovine intestine. *Arch Histol Cytol*. 1997;60(4):319-28.

Swords WE, Wu CC, Champlin FR, Buddington RK. Postnatal changes in selected bacterial groups of the pig colonic microflora. *Biol Neonate*. 1993;63(3):191-200.

Takahashi A, Alnemri ES, Lazebnik YA, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Moir RD, Goldman RD, Poirier GG, Kaufmann SH, Earnshaw WC. Cleavage of lamin A by Mch2a but not CPP32: Multiple interleukin 1b-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:8395-400.

- Takeuchi T, Kitagawa H, Imagawa T, Uehara M. Apoptosis of villous epithelial cells and follicle associated epithelial cells in chicken caecum. *J Vet Med Sci.* 1999;61:149-54.
- Thompson JS & Barent B. Effects of intestinal resection on enterocyte apoptosis. *J Gastrointest Surg.* 1999;3(6):672-7.
- Traub-Dargatz JL, Gay CC, Evermann JF, Ward AC, Zeglen ME, Gallina AM, Salman MD. Epidemiologic survey of diarrhea in foals. *J Am Vet Med Assoc.* 1988;192(11):1553-6.
- Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes to Cells.* 1998;3:697-707.
- Ueda N & Shah SV. Apoptosis. *J Lab Clin Med.* 1994;124(2):169-77.
- Vachon AM, Fischer AT. Small intestinal herniation through the epiploic foramen: 53 cases (1987-1993). *Equine Vet J.* 1995;27(5):373-80.
- Vachon PH, Cardin E, Harnois C, Reed JC, Vezina A. Early establishment of epithelial apoptosis in the developing human small intestine. *Int J Biol.* 2000;44(8):891-8.
- Vagnerova R, Kubinova L, Pacha J. Correlation of function and structure in developing rat distal colon. *Cell Tissue Res.* 1997;288:95-99.
- Van Beers-Schreurs HMG, Nabuurs MJA, Vellenga L, Kalsbeek-van der Valk HJ, Wensing T, Breukink HJ. Weaning and the weanling diet influence the villus height and crypt depth in the small intestine of pigs and alter the concentrations of short-chain fatty acids in the large intestine and blood. *J Nutr.* 1998;128:947-53.
- Van Cruchten S & Van den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol.* 2002;31:214-23.
- Van den Wollenberg L, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM. Gastric ulceration in horses: etiology, diagnosis, and therapie: a review. *Tijdschr Diergeneeskd.* 2000;125:642-7.
- Vatistas NJ, Nieto JE, Van Hoogmoed L, Gardner I, Snyder JR. Use of an isolated intestinal circuit to evaluate the effect of ischemia and reperfusion on mucosal permeability of the equine jejunum. *Vet Surg.* 2003;32(1):52-61.
- Von Engelhardt W & Breves G. Physiologie der Haustiere. *Enke Verlag Stuttgart.* 2. Auflage 2004;405-8.
- Wada Y, Mori K, Iwanaga T. Apoptosis of enterocytes induced by inoculation of a strain of attaching and effacing Escherichia coli and verotoxin. *J Vet Med Sci.* 1997;59:815-18.

- Wagner S, Beil W, Westermann J, Lagan RP, Bock CT, Trautwein C, Bleck JS, Manns MP. Regulation of gastric epithelial cell growth by *Helicobacter pylori*: Evidence for a major role of apoptosis. *Gastroenterology*. 1997;113(6):1836-47.
- Wang L, Li J, Li Q, Zhang J, Duan XL. Morphological changes of cell proliferation and apoptosis in rat jejunal mucosa at different ages. *World J Gastroenterol*. 2003;9(9):2060-64.
- Weaver LT & Carrick BM. Changes in upper intestinal epithelial morphology and kinetics in the growing guinea pig. *Pediatr Res*. 1989;26(1):31-3.
- Weese JS, Staempfli HR, Prescott JF. A prospective study of the roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in equine diarrhoea. *Equine Vet J*. 2001;33(4):403-9.
- Westcarr S, Farshori P, Wyche J, Anderson WA. Apoptosis and differentiation in the crypt-villus unit of the rat small intestine. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1999;31:1530.
- Whitlock RH. Colitis: differential diagnosis and treatment. *Equine Vet J*. 1986;18(4):278-83.
- Wilson DA, MacFadden KE, Green EM, Crabill M, Frankeny RL, Thorne JG. Case control and historical cohort study of diarrhea associated with administration of trimethoprim-potentiated sulphonamides to horses and ponies. *J Vet Intern Med*. 1996;10(4):258-64.
- Witthöft T, Eckmann L, Kim JM, Kagnoff MF. Enteroinvasive bacteria directly activate expression of iNOS and NO production in human colon epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1998;275:G564-71.
- Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle R. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol*. 1997;139(5):1281-92.
- Wong WM & Wright NA. Cell proliferation in gastrointestinal mucosa. *J Clin Pathol*. 1999;52:321-33.
- Wong WM & Wright NA. Epidermal growth factor, epidermal growth factor receptors, intestinal growth, and adaptation. *J Parenter Enteral Nutr*. 1999;23(5):S83-8.
- Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 1980;284:555-6.
- Xiao ZQ, Moragoda L, Jaszewski R, Hatfield JA, Fligel SE, Majumdar AP. Aging is associated with increased proliferation and decreased apoptosis in the colonic mucosa. *Mech Ageing Dev*. 2001;122(15):1849-64.
- Yamada M, Kobayashi Y, Furuoka H, Matsui T. Comparison of enterotoxicity between autumn crocus (*Colchicum autumnale* L.) and colchicine in the guinea pig and mouse:

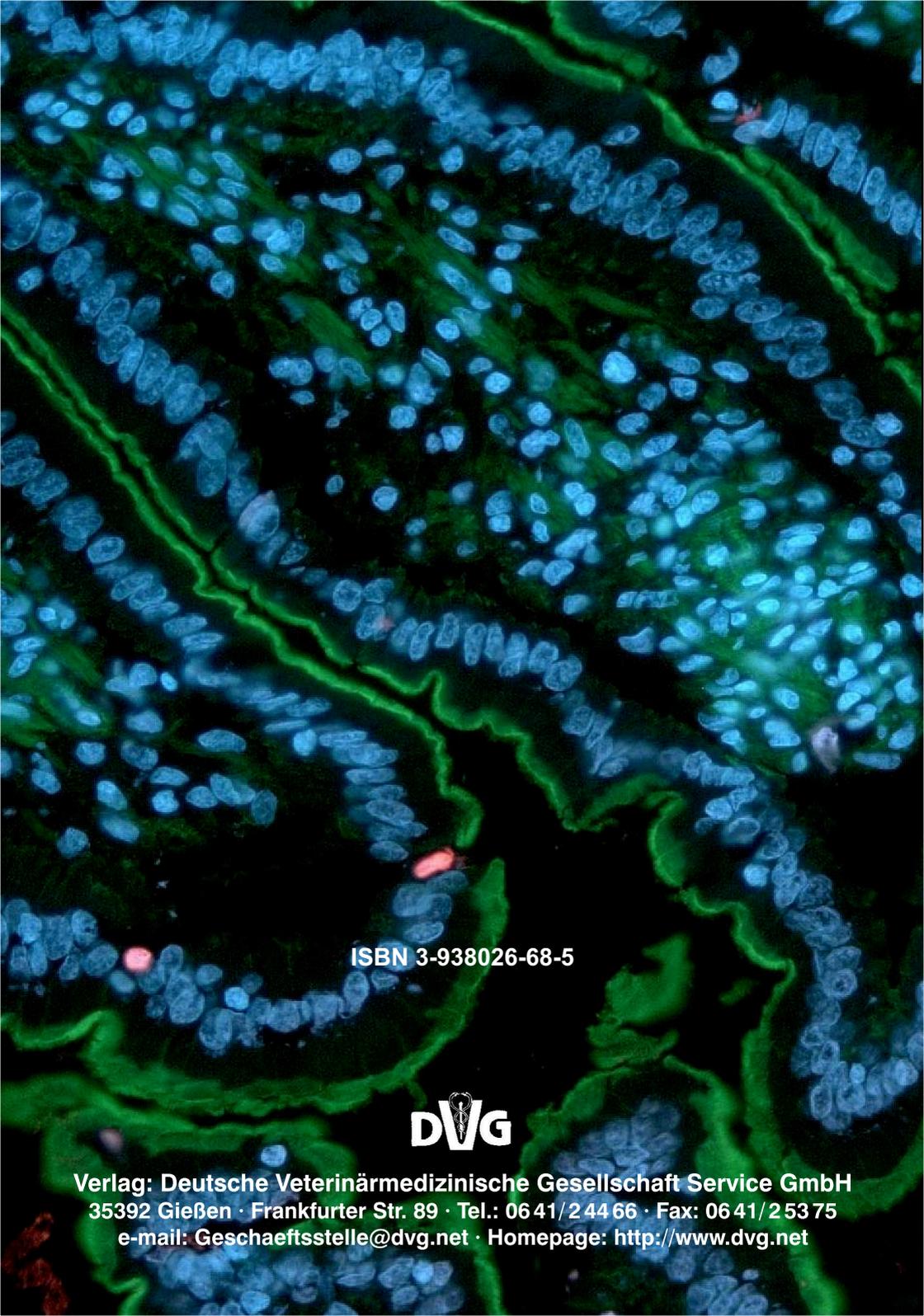
- Enterotoxicity in the guinea pig differs from that in the mouse. *J Vet Med Sci.* 2000;62(8):809-13.
- Yamamoto H, Sawai H, Perucho M. Frameshift somatic mutations in gastrointestinal cancer of the microsatellite type. *Cancer Res.* 1997;57:4420-6.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by bcl-2: Release of cytochrom c from mitochondria blocked. *Science.* 1997;275:1129-32.
- Yao X-H, Sugihara H, Hattori T, Katsura K, Takamatsu T. Regulation of apoptotic cell death in the pyloric glands of the canine stomach. *Virchows Arch.* 1998;433:275-280.
- Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Apoptosis in relevant clinical situations: contribution of apoptosis in myocardial function. *Cardiovascular Research.* 2000;45(3):630-41.
- Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Zanin C, Vayssière JL, Petit PX, Kroemer G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death *in vivo*. *J Exp Med.* 1995;181:1661-72.
- Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey, Castedo M, Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 1996;183:1533-44.
- Zhao J, Wang D, Zhao H, Lin W. Comparative study on apoptosis induction of SMMC7721 and Vero cells by Clostridium difficile toxin A. *Ai Zheng.* 2003;22(7):719-24.
- Zhivotovsky B, Gahm A, Orrenius S. Two different proteases are involved in the proteolysis of lamin durino apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;233:96-101.
- Zoratti M, Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochem Biophys Acta.* 1995;1241:139-76.
- Zychlinsky A, Kenny B, Menard R, Prevost MC, Holland IB, Sansonetti PJ. IpaB mediates macrophage apoptosis induced by Shigella flexneri. *Mol Microbiol.* 1994;11(4):619-27.
- Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ. Shigella flexneri induces Apoptosis in infected macrophages. *Nature.* 1992;358:167-9.

X. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt all den Menschen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Außerdem gilt mein besonderer Dank folgenden Personen:

- Frau Professor Dr. Monika Kressin für die Überlassung des interessanten Themas, die besonders freundliche Arbeitsatmosphäre und die Betreuung bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit
- Frau Professor Dr. Dr. h.c. Jutta Schaper für die spontane Bereitschaft, mir die Durchführung des gesamten experimentellen Teils und der histologischen Auswertung am Max-Planck-Institut für Experimentelle Kardiologie in Bad Nauheim zu ermöglichen
- Beate Grohmann und Brigitte Matzke aus dem Max-Planck-Institut für die Einarbeitung im Labor und die häufige und schnelle Hilfe
- Brigitte Matzke für die Hilfe beim Anfertigen der Fotografien, für die moralische Unterstützung und für ihre Freundschaft
- Dr. Manolo Rodriguez für die Diskussionen rund um das Thema Apoptose, für all die nicht-fachlichen Gespräche und für seine Freundschaft
- Gunther Schuster für die Hilfe bei sämtlichen Problemen rund um den Computer und bei der Bildbearbeitung
- Dr. Cornelia Fink für die tatkräftige Unterstützung beim Gewinnen der Proben und bei der Korrektur dieser Arbeit
- Dr. Failing und den Mitarbeitern des Instituts für Biomathematik der Justus-Liebig-Universität für die statistischen Analyse meiner Arbeit und die Hilfe bei der Erstellung der Grafiken
- „Blakey“ für den „Tip“, der zur Annahme dieser Arbeit geführt hat und für seine immer freundliche Art
- Ralf Seidel für die Hilfe beim Einscannen der Abbildungen
- Dr. Kerstin Broich für Korrekturlesen des Manuskriptes
- Außerdem bei allen Mitarbeitern und Doktoranden des Max-Planck-Instituts für Kardiologie in Bad Nauheim für die gute Zusammenarbeit, die tatkräftige Hilfe und die freundliche Arbeitsatmosphäre
- Meinen Freunden, die mich in guten wie in schlechten Zeiten immer wieder motiviert haben
- Meinen Eltern für die unermüdliche und liebevolle Unterstützung



ISBN 3-938026-68-5



Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Frankfurter Str. 89 · Tel.: 06 41/2 44 66 · Fax: 06 41/2 53 75
e-mail: Geschaeftsstelle@dvg.net · Homepage: <http://www.dvg.net>