

## Untersuchungen zur Ultrastruktur des Dünndarms keimfrei aufzogener FW 49-Ratten\*

### 1. Epitheliale Befunde unter besonderer Berücksichtigung der Paneth-Zellen

Herwart F. Otto und Ingelis Lewerenz

Pathologisches Institut der Universität Hamburg (Direktor: Prof. Dr. med. G. Seifert)

Eingegangen am 13. April 1973

#### Investigations on the Ultrastructure of the Small Intestine of FW 49-Rats Reared in Germfree Conditions

##### 1. Epithelial Findings with Special Reference to Paneth Cells

*Summary.* The present study reports light and electron microscope findings in the entero-epithelial system of germfree rats. Studies were made on the small intestine (duodenum, jejunum, ileum), the cecum and the colon ascendens of FW 49-rats reared in germfree conditions at the age of 10, 14, 21, 28 and 35 days and one mother rat. The postnatal maturation of the mucosal villi and crypts is complete by about the 21st day of their lives. Up to this time the essential baso-apical differentiation of the enterocytes is in progress. The ratio of villous height to cryptal depth is distinctly higher in rats reared in germfree conditions than in conventional animals. The height of the enterocytes is about  $40 \pm 2 \mu\text{m}$  more than comparable mean values in conventional rats.

The main feature of the ultrastructure is a considerable meander-like interlock of the lateral cellular membrane of enterocytes. Generally the basal part of intercellular spaces is widely expanded. Maculae adhaerentes of the cecum and the colon are extremely well developed. Resorbent cells are connected with cecal distension or with pronounced intestinal filling, mostly at the bottom of the crypts.

Paneth cells are abundantly filled with degeneratively changed granules. Output of granules does not take place. The ultrastructure of Paneth cells indicates a lack of exogenous functional stimulation.

Interepithelial lymphocytes are conspicuously rare, while eosinophil granulocytes are rather more frequent.

The findings in the entero-epithelial system do not show any qualitative differences from those in conventional animals. The purely quantitative differences are obviously due to the absence of microbial intestinal flora.

*Zusammenfassung.* In der vorliegenden Arbeit wird über licht- und elektronenmikroskopische Befunde am entero-epithelialen System keimfreier Ratten berichtet. Untersucht wurden Dünndarm (Duodenum, Jejunum, Ileum), Coecum und Colon ascendens von keimfrei aufgezogenen FW 49-Ratten im Alter von 10, 14, 21, 28 und 35 Tagen sowie von einem ausgewachsenen Muttertier. Die postnatale Ausreifung der Mucosazotten und -krypten ist etwa mit dem 21. Lebenstag abgeschlossen. Bis zu diesem Zeitpunkt vollzieht sich auch die wesentliche baso-apikale Differenzierung der Enterocyten. Der Quotient aus Zottenhöhe und Kryptentiefe liegt bei keimfreien Ratten ( $Q=6-8$ ) deutlich über dem konventioneller Tiere. Auch die Höhe der Enterocyten liegt mit  $40 \pm 2 \mu$  über vergleichbaren Mittelwerten herkömmlicher Ratten.

\* Mit dankenswerter Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Ultrastrukturell findet man vor allem eine starke mäanderartige Verfängerung der lateralen enterocytären Zellgrenzen. Dabei ist der basale Anteil des Interzellularraumes in der Regel stark erweitert. Im Coecum und Colon sind die Maculae adhaerentes überaus kräftig entwickelt. In Verbindung mit der Coecumdistension bzw. der prallen Darmfüllung sind resorbierende Zellen vorwiegend im Kryptengrund zu finden.

Paneth-Zellen sind prall mit degenerativ veränderten Granula angefüllt. Eine Granulaausschleusung erfolgt nicht. Die Ultrastruktur der Paneth-Zellen deutet auf eine fehlende „exogene“ Funktionsstimulation.

Interepitheliale Lymphocyten sind auffallend spärlich, etwas häufiger finden sich interepithelial gelegene eosinophile Granulocyten.

Die Befunde am entero-epithelialen System lassen insgesamt keine qualitativen Unterschiede zu konventionellen Tieren erkennen. Die rein quantitativen Variabilitäten sind offenbar Folge der fehlenden mikrobiellen Darmbesiedlung.

Keimfrei, in Bezug auf höhere Lebewesen, bedeutet Dasein in nicht verunreinigter, kontrollierter Umgebung, ohne Beziehung zu anderen (mikrobiellen) Lebewesen (Pasteur, 1885; Gustafsson, 1948; Reyniers, 1959; Gordon, 1968; Pleasants, 1968; u.a.). Keimfrei aufgezogene Tiere stellen gewissermaßen ein standardisiertes biologisches System mit vergleichbaren Parametern dar. Die zahllosen Imponderabilien konventionell gehaltener Laboratoriumstiere sind weithin durch die Kenntnis des genetischen Materials und durch normierte Ernährungs- und Umweltverhältnisse ausgeschaltet.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Struktur des *Dünndarms* keimfrei aufzogener Ratten sind vergleichsweise selten (Nakao u. Levenson, 1967). Wohl unter dem Eindruck einer massiven Coecum- und Colondilatation (Gustafsson, 1959; Abrams u. Bishop, 1961; Gustafsson u. Maunsbach, 1971) keimfreier Tiere, wurden überwiegend nur diese Darmabschnitte untersucht (Dupont u. Mitarb., 1965; Gustafsson u. Maunsbach, 1971). Besonders im Hinblick auf die von uns mehrfach vertretene (Übersicht: Otto, 1972 und 1973a) antibakterielle Funktion der Paneth-Zellen (sog. *Lysozym*-Theorie) wurden die folgenden Untersuchungen an keimfrei aufgezogenen Ratten durchgeführt. Da sich aus Untersuchungen zur experimentellen Salmonellose (Otto, 1972) Hinweise einer exogenen Funktionsstimulation der Paneth-Zellen ergeben hatten, stand die Frage nach der Ultrastruktur dieser Zellen bei keimfreien Ratten zunächst ganz im Vordergrund.

### Material und Methode

Untersucht wurden keimfrei aufgezogene FW 49-Ratten<sup>1</sup> im Alter von 10, 14, 21, 28 und 35 Tagen sowie ein ausgewachsenes Muttertier von 220 g. Die Tiere wurden in Äther- oder Nembuthalnarkose laparotomiert. Folgende Darmabschnitte wurden untersucht: 1. Duodenum (2–3 cm postpylorisch), 2. mittleres Jejunum, 3. Ileum (4–7 cm oberhalb der Ileocoecalclappe), 4. Coecum und 5. Colon ascendens. Das Gewebe wurde 1. in 3% Glutaraldehyd/Na-Cacodylatpuffer (pH 7,2–7,4), nachfolgend in OsO<sub>4</sub>, und 2. in Daltonscher Lösung (Dalton, 1955) fixiert. Zum Teil wurde der Fixierlösung Ruthenium-Rot (Methode: Luft, 1971a, b; Szubinska u. Luft, 1971) zugegeben. Stufenweise Dehydrierung in Alkohol und Propylenoxyd. Einbettung in Epon 812 nach Luft (1961). Feinschnitte, hergestellt mit dem Ultramikrotom Om U 2, Reichert, wurden mit Bleicitrat und Uranylacetat nachkontrastiert (Watson, 1958; Reynolds, 1963) und mit dem Zeiss EM 9A mikroskopiert.

<sup>1</sup> Für die Überlassung des Tiermaterials danken wir Herrn Dr. Schulz von der Dr. Karl Thomae GmbH, 795 Biberach a.d. Riß, sehr herzlich.

### Ergebnisse

**Makroskopie.** Bei allen Tieren fand sich eine extreme Distension von Coecum und Colon. Beide Darmabschnitte waren prall mit einer grünlich-schwarzen, zäh-viscösen, meconiumartigen Masse angefüllt. Magen und Dünndarm erschienen makroskopisch weitgehend unauffällig.

Schon Nuttall und Thierfelder (1896) hatten auf das Phänomen der Coecum-Dilatation aufmerksam gemacht. In der Folgezeit wurde es wiederholt beschrieben. Für die cöcale Aus-sackung wurden ursächlich verschiedene Faktoren angeschuldigt. Gordon (1959, 1968), Phillips u. Mitarb. (1959) sowie Hudson u. Mitarb. (1964) fanden einen verringerten Muskeltonus mit mangelhafter Darmperistaltik. Gustafsson u. Mitarb. (1970) stellten eine reduzierte Sensibilität gegenüber biogenen Aminen sowie ein Fehlen spontaner Muskelaktivität im Bereich des Coecum fest. Der Mucingehalt des Coecuminhaltes war bei keimfreien Ratten in der Regel stark erhöht.

**Lichtmikroskopie.** Gegenüber der (normalen) Dünndarmschleimhaut konventionell aufgezogener Ratten fielen bei keimfreien Tieren mehrere Besonderheiten auf: 1. Der Quotient aus Zottenlänge und Kryptentiefe beträgt bei jungen FW 49-Ratten etwa 14, d.h. die Zotten sind extrem lang, die Krypten sehr kurz (Abb. 1 und 2a). Mit fortschreitender postnataler Reifung verkürzen sich die Dünndarmzotten bei gleichzeitiger Kryptenvertiefung. Der Quotient pendelt sich um Werte zwischen 6 bis 8 ein. Damit liegt er noch immer über dem konventioneller Tiere ( $Q=3-4$ ). 2. In Verbindung mit dieser Quotientenverschiebung tritt eine deutliche baso-apikale Differenzierung des enterocytären Epithels auf (Abb. 2b). Die baso-apikale Zellhöhe nimmt zu. Sie erreicht bis zum 28. Lebens-tag einen mittleren Wert von  $40 \pm 2 \mu$  und liegt damit über vergleichbaren Werten konventionell aufgezogener Ratten. 3. Paneth-Zellen sind extrem selten. 4. Interepitheliale Lymphocyten waren gelegentlich, besonders bei älteren Tieren zu finden. Lichtmikroskopisch imponieren sie als kleine, chromatindichte und cytoplasmaarme Zellen. In Relation zu interepithelialen Lymphocyten sind eosinophile Granulocyten im enterocytären Epithelverband vergleichsweise „häufig“.

Tabelle 1. Zelldifferenzierungen keimfrei aufgezogener FW 49-Ratten

Tier- gruppe	Alter (Tage)	Zellulation				
		Becher- Zellen	Entero- chromaffine Zellen	Paneth- Zellen	Interepitheliale	
					Lymphocyten	Leukocyten
1	10	+	+	—	—	—
2	14	+	+	—	—	+
3	21	+	+	—	(+)	+
4	28	+	+	—	(+)	+
5	35	+	+	(+)	(+)	+
6	120	+	+	+	(+)	+

Bezüglich der Becher- und enterochromaffinen Zellen waren wesentliche Unterschiede zu konventionell aufgezogenen Ratten nicht nachweisbar (s. auch Tabelle 1).

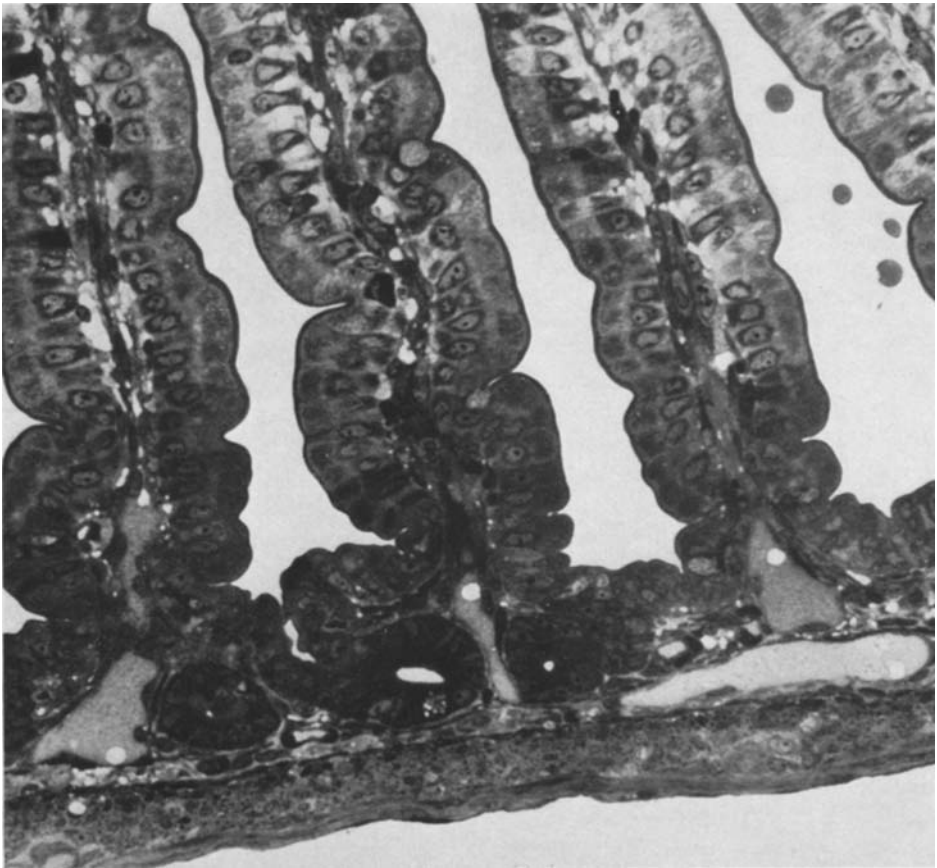


Abb. 1. Jejunum einer 10 Tage alten FW 49-Ratte. Stark verlängerte Zotten, extrem kurze Krypten. Keine Paneth-Zellen. Semidünnschnitt nach Ruthenium-Rotfärbung, Toluidinblau. 615 $\times$

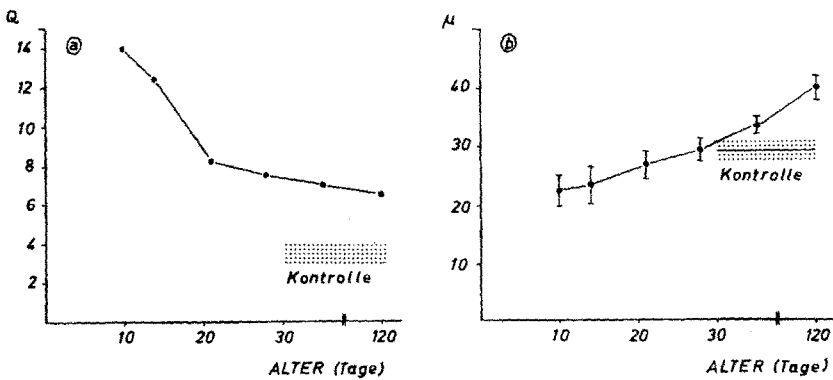


Abb. 2a u. b. Keimfreie FW 49-Ratten. a Postnatale Differenzierung von Zotten und Krypten, dargestellt an Hand der Zotten-Kryptenrelation ( $Q$ ). b Postnatale, baso-apikale Differenzierung der Enterocyten

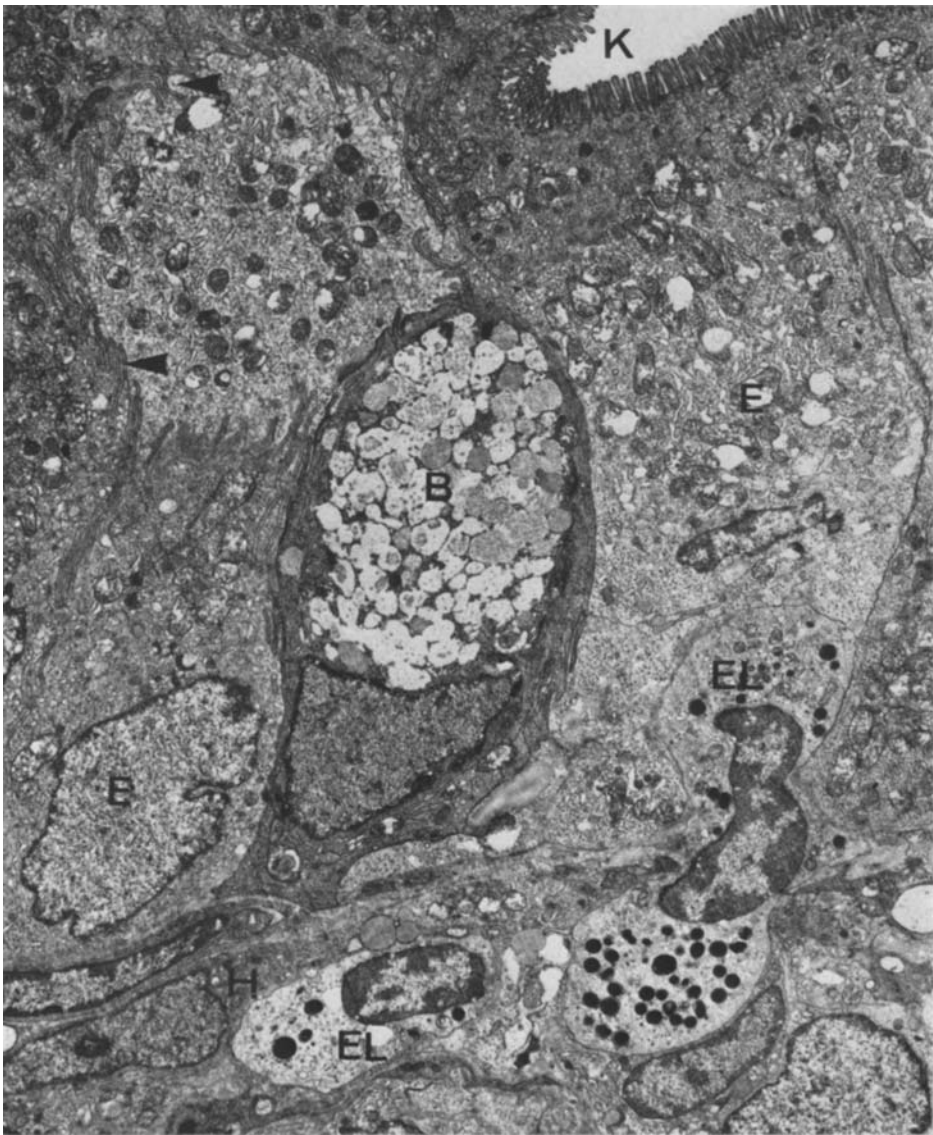


Abb. 3. Jejunum einer 10 Tage alten FW 49-Ratte. Starke mäanderartige Verzahnung der lateralen Zellgrenzen (►). Mitochondrienreiche Enterocyten (E). Becherzellen (B). Krypten- bzw. Darmlumen (K). Eosinophile Leukocyten (EL). Subepithelial histiocytäre Zellformen (H). Glutaraldehyd-OsO<sub>4</sub>. 4920×

Bei allen untersuchten Altersgruppen enthalten Ileum und Coecum eine besondere Zellart, die offenbar in enger Beziehung zur prallen, meconiumartigen Darmfüllung steht. Es handelt sich um baso-apikal differenzierte Zellen, die vorwiegend in der Tiefe der Mucosakrypten liegen. Das Cytoplasma dieser Zellen

enthält zahlreiche, unterschiedlich große Granula, die ubiquitär über die ganze Zelle verteilt sind. Derartige Granula finden sich auch zwischen den Zotten, im Darm- bzw. Kryptenlumen, teils auch subepithelial in Lymphspalten und phagocytierenden Makrophagen.

*Elektronenmikroskopie.* Die Lamina epithelialis mucosae auch keimfrei aufgezogener Ratten besteht aus dicht gepackten, einschichtig geordneten Zellen, die einer Basalmembran aufsitzen. Apikalwärts finden sich Mikrovilli und Strukturen des „surface coat“. Die lateralen Zellgrenzen sind in der Regel mäanderartig verfingernt (Abb. 3). Im apiko-lateralen Zellbereich sind regelmäßig Zonulae occludentes, den intercellulären Spaltraum offenbar abdichtende Kontaktstellen, entwickelt. Basal dieser „tight junctions“ liegen Desmosomen, die durch hohe Adhäsionskräfte den epithelialen Zusammenhalt garantieren. Besonders intensiv sind derartige Maculae adhaerentes im stark dilatierten Coecum und im proximalen Colon entwickelt. Der basale intercelluläre Spaltraum ist oft ballonartig erweitert (Abb. 4). Schmale, cytoplasmatische Ausläufer von Epithelzellen ragen fingerförmig in dieses Spatium hinein.

*Enterocyten* zeigen noch eine deutliche postnatale Entwicklung. Sie besteht vorwiegend in einer baso-apikalen (polaren) Differenzierung. Auch die Länge der Mikrovilli nimmt in der Postnatalzeit noch zu. Bei 10 Tage alten keimfreien Ratten fanden wir plumpe Enterocyten, die eine typische baso-apikale Achsenausrichtung noch nicht erkennen ließen. Bezüglich des „Längenwachstums“ der Enterocyten verweisen wir auf Abb. 2b. Die Mikrovilli 10 Tage alter Tiere sind in der Regel kurz, stummelförmig und ungeordnet. Ihre postnatale Ausreifung ist etwa mit dem 21. Lebenstag abgeschlossen. Die mittlere Höhe der Mikrovilli nach dem 21. Lebenstag liegt zwischen 1,5 und 1,7  $\mu$  (mittlerer Normwert konventioneller Tiere etwa 1,5  $\mu$ ; s. auch Forssmann u. Baumann, 1967; Vollrath, 1969). Eine wesentliche Längendifferenz der Mikrovilli zwischen keimfreien und konventionellen Ratten, wie sie von Gustafsson und Maunsbach (1971) für das Coecum angegeben wurde, besteht also nicht. Die Mikrovilli enthalten Filamentbündel, die z.T. tief in das Cytoplasma der Enterocyten einstrahlen. Am Grunde der Mikrovilli finden sich vermehrt „zungenförmige“ Einkerbungen in das apikale enterocytäre Plasma. Diese Einkerbungen führen im weiteren offenbar zu vesiculären Abschnürungen.

Insgesamt lassen ausdifferenzierte Enterocyten keimfrei aufgezogener Ratten keine sicheren Unterschiede im ultrastrukturellen Bereich zu konventionellen Tieren erkennen. Auch Becherzellen und basale gekörnte, enterochromaffine Zellen zeigen keine wesentlichen Unterschiede zwischen keimfreien und konventionellen Ratten.

Von Enterocyten abzugrenzen, sind jene Zelle, die nach unserer Meinung in enger funktioneller Beziehung zum besonderen Darminhalt keimfreier Ratten stehen. Sie unterscheiden sich von Enterocyten durch ihre Lokalisation (vorwiegend im Kryptengrund) und durch intracytoplasmatische, ubiquitär verteilte Vacuolen (Abb. 4, 6 und 7). Diese Vacuolen sind in Semidünnschnitten intensiv toluidinblau. Die bei Fettvacuolen oft anzutreffende Metachromasie fehlt. In der Dalton-Fixierung erscheinen die Vacuolen weitgehend osmiophob, von feinchagriner Matrix. In der Glutaraldehydfixierung findet sich eine ausgeprägte Affinität zu Osmium. Entsprechende Vacuolen liegen im Kryptenlumen (Abb. 6a),

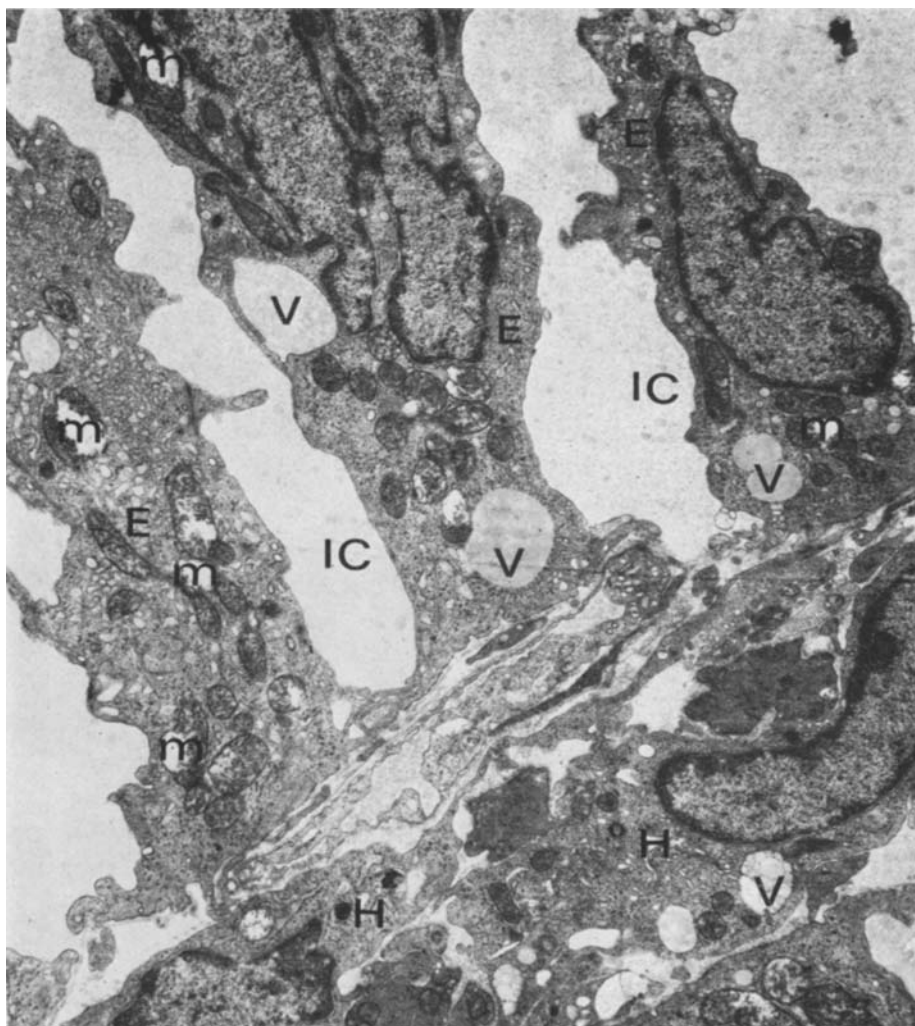


Abb. 4. Ileum einer 21 Tage alten FW 49-Ratte. Kryptenanschnitt mit baso-apikal differenzierten Zellen (*E*) mit Mitochondrien (*m*) und Resorptionsvacuolen (*V*), die z.T. auch subepithelial in histiocytären Zellformen liegen. Ballonartig erweiterte Interzellularräume (*IC*). Dalton, 7260 $\times$

im intercellulären Raum des Epithelverbandes (Abb. 6 c, d und 7) und, subepithelial, in Lymphspalten und Makrophagen (Abb. 4 und 7).

Die Zellen sind, ähnlich den Enterocyten, gekennzeichnet durch eine polare, baso-apikale Differenzierung. Die Zellkerne sind plump, unregelmäßig konturiert und nur selten baso-apikal ausgerichtet. Vielfach finden sich tiefere Kerninvaginationen und periphere Chromatinkondensationen. An weiteren Zellorganellen lassen sich reichlich Mitochondrien und Lamellen des rauhen endoplasmatischen Reticulum nachweisen. Das Golgi-Feld ist in der Regel kräftig entfaltet. Die

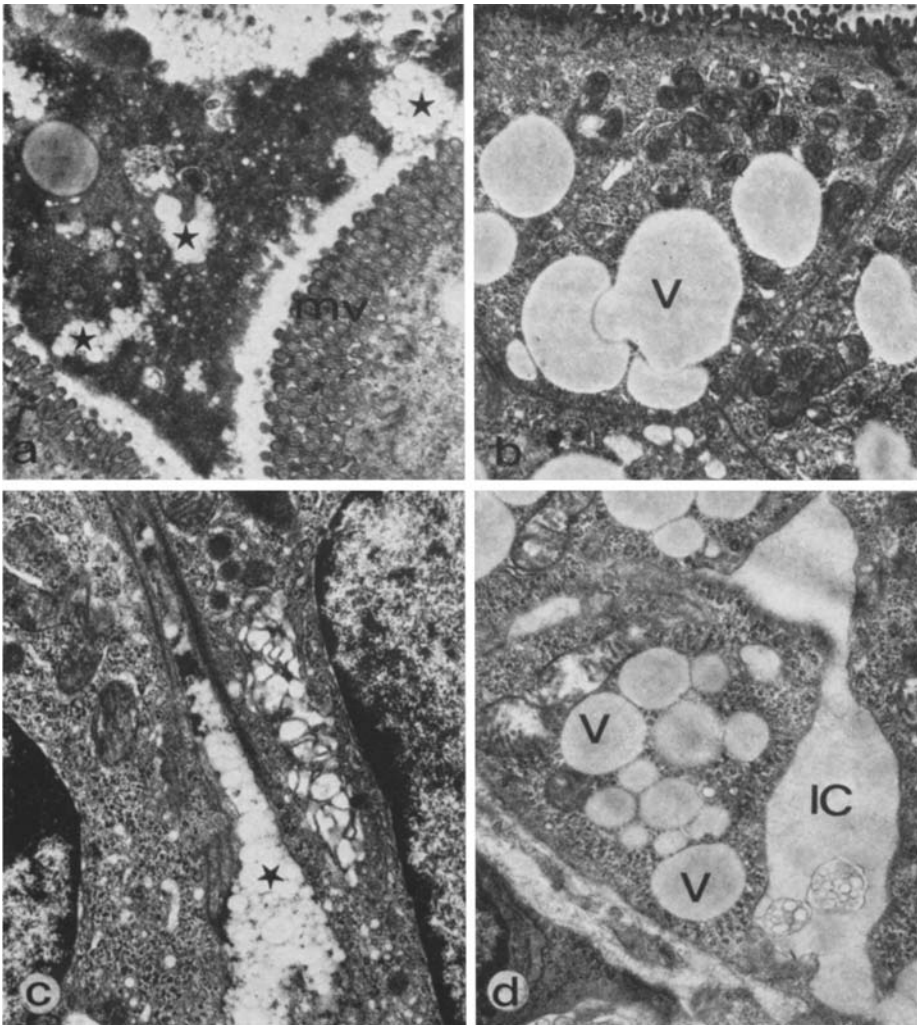


Abb. 5a—d. Terminales Ileum einer 21 Tage alten FW 49-Ratte. a Kryptenlumen mit Darminhalt, z.T. in feintropfigen Agglomeraten (\*). Unregelmäßige und kleine Mikrovilli (*mv*). b Apikaler Zellpol einer im Kryptengrund gelegenen resorbierenden Zelle mit zahlreichen Resorptionsvacuolen. c Mittlerer Interzellularraum, angefüllt mit resorbiertem Material (\*). d Basaler Zellpol mit Resorptionsvacuolen (*V*). Erweiterter Interzellularraum (*IC*), der elektronenoptisch gleiches Material enthält wie die Vacuolen. Dalton. 9000×

Mikrovilli sind deutlich kleiner als bei ausdifferenzierten Enterocyten. Zwischen den Mikrovilli finden sich kleine Invaginationen der Zelloberfläche. Das sog. „terminal web“ ist lückenhaft und unregelmäßig angeordnet. Die lateralen Zellgrenzen weisen eine ausgeprägte mäanderartige Verzahnung auf.

*Paneth-Zellen* keimfrei aufgezogener FW 49-Ratten sind strotzend mit Sekretgranula angefüllt (Abb. 8—10). Eine Granulaextrusion fehlt weitgehend. Die



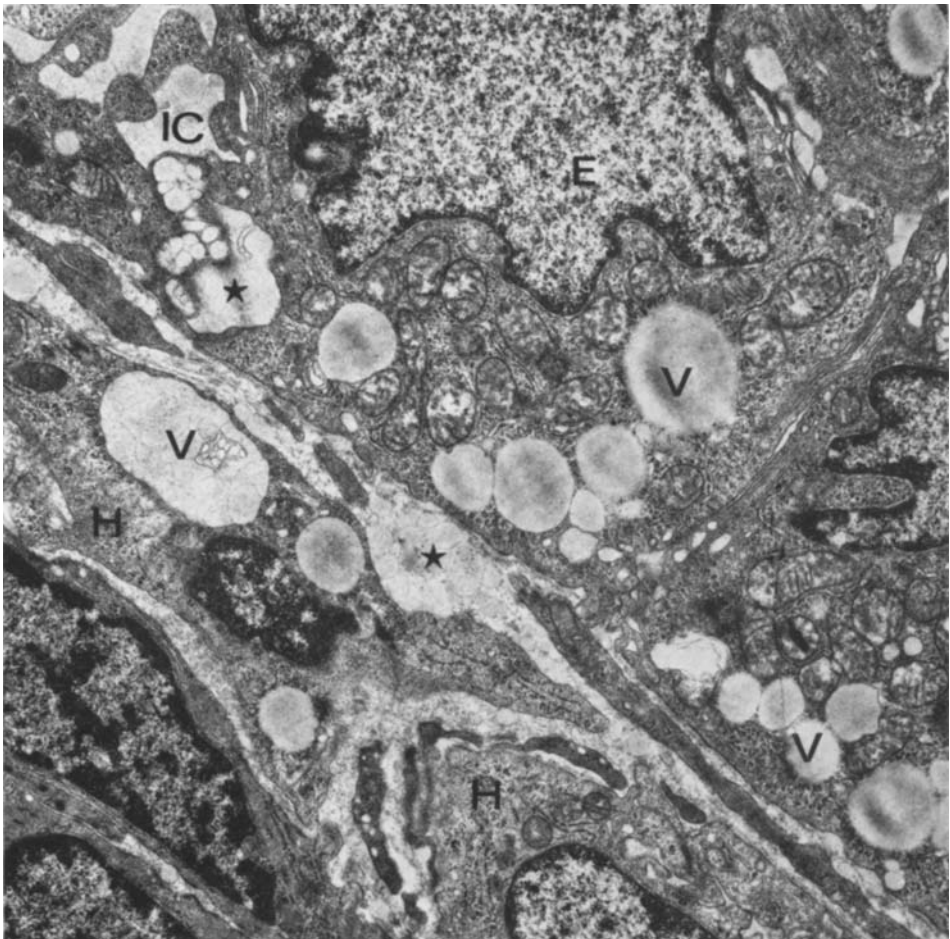


Abb. 6. Terminales Ileum einer 35 Tage alten FW 49-Ratte. Basaler Kryptenanschnitt. Resorbierende Kryptenzellen (*E*) mit zahlreichen Resorptionsvacuolen (*V*); z.T. erweiterte Interzellularräume (*IC*) mit resorbiertem Material (\*). Subepithelial teils extracellulär (\*), teils intracellulär (*V*) gleichartiges Material. Histiocytäre Zellformen (*H*). Dalton. 11700×

Granulamatrix ist ausgesprochen heteromorph: die Granula sind unterschiedlich groß, teils osmiophil, teils osmiophob. Vielfach findet man eine granuläre Konfluenz. Es entstehen Riesengranula mit kristalloiden und/oder myelinartigen Strukturen. In zahlreichen Granula kommt es offenbar zur Sekretverflüssigung (Sekretolyse). Durch die extreme Granulafülle sind die unregelmäßig konturierten Zellkerne stark basalwärts verdrängt. Lamellen des rauen endoplasmatischen Reticulum sind spärlich, vorwiegend im basalen und randlich-intermediären Zellbereich, z.T. vesiculär transformiert. Golgi-Felder sind kaum entfaltet, Mitochondrien selten. Vielfach ist der apikale Zellpol nach Art einer „Kuppenblase“ vorgewölbt. Diese „Kuppenblase“ enthält helles, strukturloses Cytoplasma, ver-



Abb. 7. Ileum eines ausgewachsenen keimfreien Muttertieres. Paneth-Zellen (*P*) mit heteromorphen, z.T. degenerativ veränderten Sekretgranula. Weit basal verdrängter Zellkern. Enterochromaffine Zelle (*EC*). Glutaraldehyd-OsO<sub>4</sub>. 8120×

einzelnt auch kleine Sekretgranula. Es scheint, daß derartige Blasen sich gelegentlich ins Kryptenlumen abschnüren.

*Interepitheliale Lymphocyten.* Diese in präformierten Spalträumen zwischen jeweils 2 Epithelzellen gelegenen lymphocytären Zellen sind bei keimfreien Ratten außerordentlich selten. Sie zeigen in der Regel einen engen Membrankontakt zu begrenzenden Epithelzellen (Abb. 11). Das Cytoplasma ist zu meist organellenarm. Vereinzelt findet man Golgi-Strukturen, Mitochondrien und, gleichsam bruchstückhaft, kurze Lamellen von endoplasmatischem Reticulum. Gelegentlich enthält das Cytoplasma einzelne, membranbegrenzte, lysosomenartige Einschlüsse. Interepitheliale Lymphocyten liegen, gemessen an der polaren Differenzierung der Enterocyten, überwiegend infranucleär (basal) und intermediär.

*Interepitheliale Leukocyten.* Bemerkenswert ist die relativ große Zahl interepithelial gelegener eosinophiler Granulocyten, sowohl in Relation zu interepithelialen Lymphocyten als auch im Vergleich zu konventionell aufgezogenen Ratten. Auch die Granulocyten zeigen einen engen Membrankontakt zu be-



Abb. 8. Ileum einer 35 Tage alten FW 49-Ratte. Tangentialanschnitt des Kryptenhalses mit Paneth-Zellen (P), enterocytär differenzierten Zellen (E) und weitgehend unauffälligen enterochromaffinen Zellen (EC). Subepithelial histiocytäre Zellformen (H). Glutaraldehyd-OsO<sub>4</sub>. 8550×

grenzenden Epithelzellen. Sie liegen im interepithelialen Spaltraum, vergleichbar den Lymphocyten, vorwiegend basal und intermediär.

Neutrophile oder basophile Granulocyten, Plasmazellen oder Mastzellen konnten im interepithelialen Spatium nicht beobachtet werden.

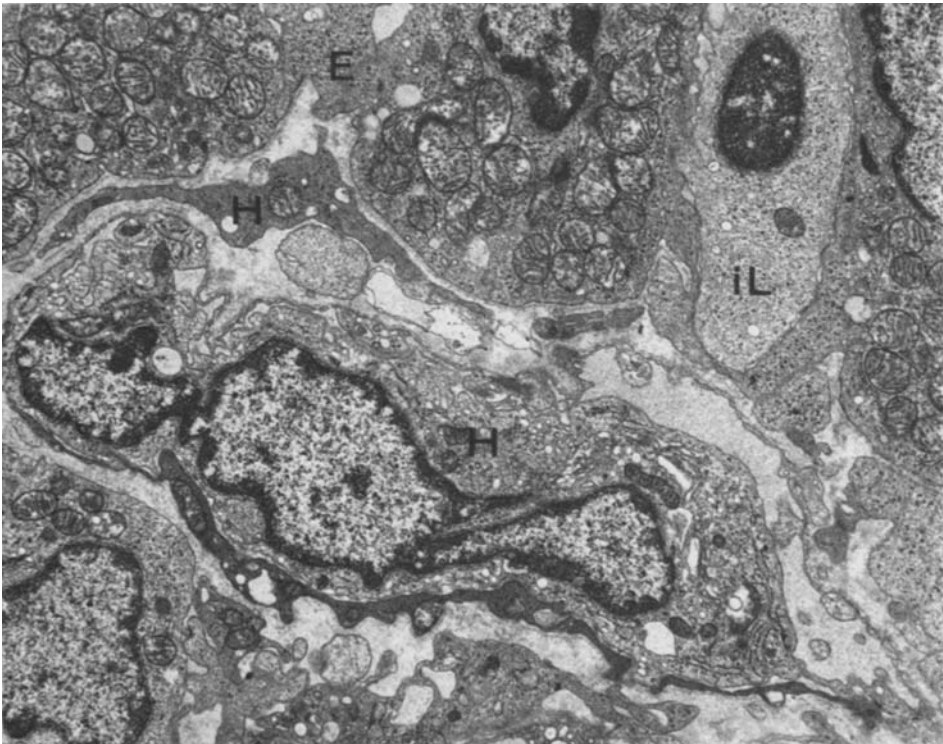


Abb. 9. Terminales Ileum einer 21 Tage alten FW 49-Ratte. Kleiner interepithelialer Lymphocyt (*iL*) mit organellenarmem Cytoplasma. Mitochondrienreiche Epithelzellen (*E*). Subepithelial große histiocytäre Zellformen (*H*). Glutaraldehyd-OsO<sub>4</sub>. 9240×

Die entero-epitheliale Basalmembran ist in der Regel unauffällig. Auf Fragmentationen der Basalmembran im Rahmen der sog. Herniation und der lympholeukocytären Migration in die Lamina epithelialis mucosae wird in der folgenden Befundbesprechung eingegangen.

### Diskussion

Die bisher mitgeteilten Befunde zur entero-epithelialen Ultrastruktur keimfrei aufgezogener Tiere sind zum großen Teil recht widersprüchlich. Nakao und Levenson (1967) fanden elektronenmikroskopisch bei 3 Monate alten keimfreien Ratten lediglich mitochondriale Veränderungen. Insbesondere wurden 2 Mitochondrienformen beschrieben: 1. rundlich-ovale Mitochondrien mit zumeist mehreren, keilförmigen Einkerbungen von cytoplasmareicher, z.T. mikrovesiculärer Grundsubstanz; 2. Mitochondrien mit intakter äußerer Membran, aber einer unregelmäßig-vesiculären Transformation der mitochondrialen Matrix. Diese Befunde konnten von anderen Autoren (Gustafsson u. Mitarb., 1970) nicht bestätigt werden. Auch im eigenen Material ließen sie sich nicht verifizieren.

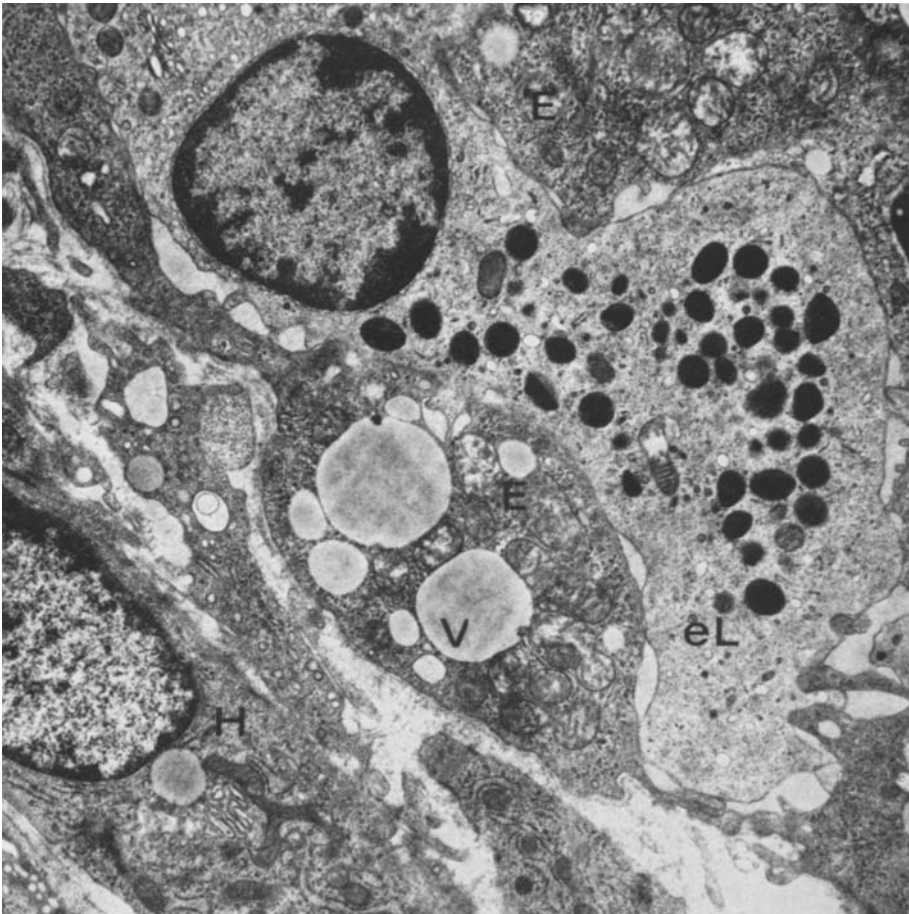


Abb. 10. Terminales Ileum einer 35 Tage alten FW 49-Ratte. Interepithelial gelegener eosinophiler Leukozyt (*eL*). Angrenzend z.T. resorbierende Kryptenzellen (*E*) mit Resorptionsvacuolen (*V*). Subepithelial histiocytäre Zellformen (*H*). Dalton. 9000 $\times$

Kenworthy (1970) fand in seinen Untersuchungen keimfreier Schweine (germfree and gnotobiotic pigs) vermehrt glattwandige Vesikel im apikalen Zellpol der Enterocyten. Im weiteren weisen Kenworthy u. Mitarb. (1966, 1970) besonders auf laterale Epithelinterdigitationen hin.

Die Mitteilungen von Gustafsson und Maunsbach (1971) über die cöcale Ultrastruktur keimfreier Ratten sind sicher nur bedingt mit Befunden am Dünndarm zu vergleichen.

Die eigenen Untersuchungen lassen einen prinzipiellen Strukturunterschied weder der einzelnen enteroepithelialen Zellen, noch des ganzen Verbandes der Lamina epithelialis mucosae zwischen keimfrei aufgezogenen und konventionellen Ratten erkennen. Die nachweisbaren Unterschiede sind rein quantitativer Art. Das betrifft vor allem die Höhe der Enterocyten (Abb. 2b). Bemerkenswert er-

scheint uns auch die Quotientenverschiebung aus Zottenlänge und Kryptentiefe. Immerhin liegt dieser Quotient bei ausgewachsenen keimfreien Ratten mit 6 bis 8 deutlich über vergleichbaren Werten konventioneller Tiere. Die Schleimhautkrypten aller 3 Darmabschnitte sind verkürzt. Das deutet auf eine nur schmale Proliferationszone. Autoradiographische Untersuchungen von Abrams u. Mitarb. (1963) sowie von Leshner u. Mitarb. (1964) haben gezeigt, daß die epitheliale Turnover-Rate im Ileum keimfreier Ratten etwa um die Hälfte reduziert ist. Die verkürzte Wanderungsstrecke in der Zeiteinheit zur Zottenspitze und die in diesem Bereich nur sehr geringe Zelldesquamation sind ganz offensichtlich Folge der fehlenden Bakterienbesiedlung des Darmes. Die gleichsam überhöhte Epithelzellwanderung von der Proliferations- bzw. Differenzierungszone zur Zottenspitze bei konventionell gehaltenen Tierarten korreliert, wenigstens z.T., mit einer in der Regel apathogenen, physiologischen Keimbesiedlung des Darmes. Gleichbedeutend für den entero-epithelialen Zellersatz sind Darmmotilität und die vielfach als „physiologische Entzündung“ (Rössle, 1923; vgl. auch Eder, 1966 und 1969) bezeichnete lympho-retikuläre Infiltration der Lamina propria mucosae.

Gordon (1968) fand ein Absinken verschiedener physiologischer Normwerte bei keimfreien Tieren. In Bezug auf den Gastrointestinaltrakt war eine Akkumulation von „intestinalen Metaboliten“ festzustellen, vermutlich als Folge reduzierter Stoffwechselprozesse unter keimfreien Bedingungen. Nach Gordon (1968) ist für die geänderte Stoffwechsellage keimfreier Tiere allein das Fehlen der intestinalen mikrobiellen Flora verantwortlich.

Die Ultrastruktur der Paneth-Zellen deutet auf eine fehlende Granulaextrusion. Seit den Untersuchungen von Speece (1964), Deckx u. Mitarb. (1967, 1972) sowie Ghoo und Vantrappen (1971) wird den Paneth-Zellen eine antibakterielle Funktion im Rahmen einer regulierten bakteriellen Homöostase des Dünndarms zugeschrieben (s. auch Otto, 1972 und 1973a). Deckx (1972) spricht von einer „unspezifischen, immunologischen Funktion“ der Paneth-Zellen. Diese Funktionsinterpretation der Paneth-Zellen gründet sich auf den hohen Lysozymgehalt der Granula. In Untersuchungen zur experimentellen Salmonellose konnten wir zeigen, daß Paneth-Zellen bezüglich ihrer Funktionsintensität offenbar einer „exogenen“ Stimulation unterliegen (Otto, 1972). Die orale Kontamination mit verschiedenen Salmonella-Typen führt zu einer extremen Funktionssteigerung, d.h. zu einer überstürzten Granulaausschleusung, der letztlich eine irreversible Erschöpfung und Nekrose der Paneth-Zellen folgt. Ultrastrukturbefunde an keimfrei aufgezogenen Ratten untermauern die Vermutung einer „exogenen“ Funktionsstimulation der Paneth-Zellen. Die fehlende Granulaextrusion ist vermutlich Folge der fehlenden Keimbesiedlung des Darmes. Die Paneth-Zellen sind mit Sekretgranula gleichsam „überfüllt“. Die einzelnen Granula zeigen ausgeprägte degenerative Veränderungen. Die als physiologisch angesehene bakterielle Keimbesiedlung des Darmes beeinflußt nicht nur die Cytoarchitektur der einzelnen Paneth-Zelle, sondern offenbar auch die „Proliferationskinetik“ bzw. Differenzierung des Paneth-Zellverbandes. Unter keimfreien Bedingungen ist die Zahl der Paneth-Zellen, statistisch hoch signifikant, verringert. Es ist also anzunehmen, daß die bakterielle Keimbesiedlung des Darmes einen Differenzierungsreiz auf undifferenzierte Kryptenzellen (als den „Vorläufern“ der Paneth-Zellen) ausübt und die Differenzierungsrichtung induziert.

Interepitheliale Lymphocyten sind bei keimfreien Ratten außerordentlich selten. Unterschiede bezüglich der Anzahl oder Cytoarchitektur der Lymphocyten innerhalb der untersuchten Darmabschnitte bestehen nicht. Aus der Topographie und dem Membranverhalten der interepithelialen Lymphocyten zu den begrenzenden Epithelzellen entwickelten Toner u. Mitarb. (1971) das funktionelle Konzept, daß der Kontakt zwischen Epithelzellen und Lymphocyten wichtig sei für die Induktion der immunologischen Kompetenz unreifer Lymphocyten. Entsprechend dieser Konzeption könnten die interepithelialen lymphoiden Zellen auch der keimfreien Darmschleimhaut das morphologische Äquivalent einer „low-grade immune response“ (Toner u. Ferguson, 1971; Toner u. Mitarb., 1971) gegen verschiedene Nahrungsmittelantigene sein.

Gegenüber den interepithelialen Lymphocyten einerseits und im Vergleich zu konventionellen Tieren ist der Gehalt an interepithelialen Leukocyten bei keimfreien Tieren relativ hoch. Dabei handelt es sich ausnahmslos um eosinophile Granulocyten. Beide Zelltypen, Lymphocyten und Granulocyten, entstammen der Lamina propria mucosae. Besonders im Hinblick auf eosinophile Granulocyten findet man nicht selten „aktive“ Migrationsvorgänge mit Fragmentierung der Basalmembran und Epithelherniation. Bezüglich der Verweildauer interepithelialer Lymphocyten und Leukocyten ist an Hand des vorliegenden Materials und auf Grund der Methode keine Aussage möglich. Epitheldurchwanderungen ließen sich nicht verifizieren (s. auch Otto, 1973b). Hinsichtlich dieser nicht-epithelialen Zellen innerhalb der Lamina epithelialis mucosae fällt die Diskrepanz der einzelnen, bisher mitgeteilten Untersuchungsergebnisse besonders auf. Nach Glimstedt (1933), Hellman (1934) und Stenqvist (1934) ist die Lamina epithelialis mucosae frei von lympho-retikulären Zellen. Gordon (1959) fand eosinophile und basophile Granulocyten, Lymphocyten, Monocyten und Makrophagen. Die Anzahl der jeweiligen Zellen war gegenüber konventionellen Kontrolltieren allerdings stark reduziert (s. auch Gordon u. Bruckner-Kardoss, 1961a, b). Die Ursache der Diskrepanzen ist letztlich unklar. Methodische Verfahrensweisen scheinen keine Rolle zu spielen. Möglicherweise sind unterschiedlich verwandte Diäten von Bedeutung. Es gilt heute als gesichert, daß die intestinale Mucosa strukturell durch verschiedene Diäten beeinflußt werden kann (Sprinz, 1962; Abrams u. Mitarb., 1963; Kennworthy u. Mitarb., 1966; Kennworthy, 1970).

Die wesentlichen morphologischen Charakteristika keimfrei aufgezogener Ratten resultieren aus der fehlenden bakteriellen Stimulation (Gordon, 1959; Sprinz, 1962; Gordon u. Mitarb., 1966). Diese Charakteristika sind gegenüber herkömmlichen, konventionell aufgezogenen Kontrolltieren lediglich quantitativer Art. Mikrobielle Kontaminationen führen zur „Strukturnormalisierung“ des primär keimfreien Darmes.

### Literatur

- Abrams, G. D., Bauer, H., Sprinz, H.: Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice. *Lab. Invest.* **12**, 355—364 (1963)
- Abrams, G. D., Bishop, J. E.: Germfree techniques in experimental pathology: A survey of the morphologic changes in, and the research potential of, the germfree guinea pig. *Univ. Mich. Med. Bull.* **27**, 136—147 (1961)
- Dalton, A. J.: A chrome-osmium fixative for electron microscopy. *Anat. Rec.* **121**, 281 (1955)

- Deckx, R.: Further evidence of an immunological role of the Paneth cells and concentration of zinc in their granules. 14th Czechoslovak Cong. of Gastroenterol., p. 59. Prague, June 25—29, 1972
- Deckx, R., Vantrappen, G. R., Parein, M. M.: Localization of lysozyme activity in a Paneth cell granule fraction. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **139**, 204—207 (1967)
- Dupont, J.-R., Jervis, H. R., Sprinz, H.: Auerbach's plexus of the rat cecum in relation to the germfree state. *J. comp. Neurol.* **125**, 11—18 (1965)
- Eder, M.: Zellerneuerung am Magen-Darmtrakt. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **50**, 75—90 (1966)
- Eder, M.: Die Bedeutung des „Turnover“ von Epithelersatz und -differenzierung für die Orthologie und Pathologie der Dünndarmfunktion. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **53**, 45—55 (1969)
- Forssmann, W. G., Baumann, M.: Zur Ultrastruktur des Stäbchensaumes im Duodenum der Ratte. *Morph. Jb.* **111**, 250 (1967)
- Ghoos, Y., Vantrappen, G.: The cytochemical localization of lysozyme in Paneth cell granules. *Histochem. J.* **3**, 175—178 (1971)
- Glimstedt, E. G.: Nagra nya rön baserade på jämförelse mellan sterilt uppfödda djur och kontrolldjur. *Med. För. Tidskrift* **11**, 271—277 (1933)
- Gordon, H. A.: Morphological and physiological characterization of germfree life. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **78**, 208—220 (1959)
- Gordon, H. A.: Is the germ-free animal normal? A review of its anomalies in young and old age. In: *The germfree animal research*. London-New York: Academic Press 1968
- Gordon, H. A., Bruckner-Kardoss, E.: Effects of the normal microbial flora on various tissue elements of the small intestine. *Acta anat. (Basel)* **44**, 210—225 (1961a)
- Gordon, H. A., Bruckner-Kardoss, E.: Effects of normal microbial flora on intestinal surface area. *Amer. J. Physiol.* **201**, 175 (1961b)
- Gustafsson, B.: Germfree rearing of rats. *Acta path. microbiol. scand., Suppl.* **73** (1948)
- Gustafsson, B.: Germfree research at the Institute of Histology, University of Lund. In: *Recent progress in microbiology*. VIIth Intern. Congr. for Microbiology. Stockholm: Almqvist & Wiksell 1959
- Gustafsson, B., Maunsbach, A. B.: Ultrastructure of the enlarged cecum in germfree rats. *Z. Zellforsch.* **120**, 555—578 (1971)
- Gustafsson, B., Midtvedt, T., Strandberg, K.: Effects of microbial contamination on the cecum enlargement of germfree rats. *Scand. J. Gastroent.* **5**, 309—314 (1970)
- Hellman, T.: Die Einlagerung von Zellen in Schleimhäuten und Epithel. Antwort an J. Sobotta. *Anat. Anz.* **78**, 65—68 (1934)
- Hudson, J. A., Luckey, T. D.: Bacteria induced morphologic changes. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **116**, 628—631 (1964)
- Kenworthy, A.: Effect of *Escherichia coli* on germfree and gnotobiotic pigs. I. Light and electron microscopy of the small intestine. *J. comp. Path.* **80**, 53—63 (1970)
- Kenworthy, A., Allen, W. D.: Influence of diet and bacteria on small intestinal morphology, with special reference to early weaning and *Escherichia coli*. Studies with germfree and gnotobiotic pigs. *J. comp. Path.* **76**, 291—296 (1966)
- Leshner, S., Walburg, H. E., Sacher, G. A.: Generation cycle in the duodenal crypt cells of germ-free and conventional mice. *Nature (Lond.)* **202**, 884 (1964)
- Luft, H. J.: Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. biophys. biochem. Cytol.* **9**, 409—414 (1961)
- Luft, H. J.: Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat. Rec.* **171**, 347—368 (1971a)
- Luft, H. J.: Ruthenium red and violet. II. Fine structural localization in animal tissues. *Anat. Rec.* **171**, 369—416 (1971b)
- Nakao, K., Levenson, S. M.: Atypical mitochondrial morphology of the intestinal absorptive cells of the germ-free rat. *Experientia (Basel)* **23**, 494—496 (1967)
- Nuttall, G. H. F., Thierfelder, H.: Tierisches Leben ohne Bakterien im Verdauungskanal. *Hoppe Seylers Z. physiol. Chem.* **22**, 62—73 (1896)
- Otto, H. F.: Die intestinale Paneth-Zelle. Zytomorphologie, Ultrastrukturpathologie und funktionelle Bedeutung. Ein Beitrag zur Lysozym-Theorie. Habilitationsschrift, Hamburg 1972



- Otto, H. F.: Zur funktionellen Bedeutung der intestinalen Paneth-Zellen. Dtsch. med. Wschr. **98**, 220—226 (1973a)
- Otto, H. F.: The interepithelial lymphocytes of the intestine. Morphological observations and immunologic aspects of intestinal enteropathy. In: Curr. Top. Pathology **57**, 81—121 (1973b)
- Phillips, B. P., Wolfe, T. A., Gordon, H. A.: Studies on rearing the guinea pig germfree. Ann. N.Y. Acad. Sci. **78**, 183—207 (1959)
- Pleasant, J. R.: Characteristics of the germ-free animal. In: The germ-free animal in research. London-New York: Academic Press 1968
- Reyniers, J. A.: The pure-culture concept and gnotobiotics. Ann. N.Y. Acad. Sci. **78**, 3—16 (1959)
- Reynolds, E. S.: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. **17**, 208—212 (1963)
- Rössle, R.: Referat über Entzündung. Verh. dtsch. Ges. Path. **19**, 18—68 (1923)
- Speece, A. J.: Histochemical distribution of lysozyme activity in organs of normal mice and radiation chimeras. J. Histochem. Cytochem. **12**, 384—391 (1964)
- Sprinz, H.: Morphological response of intestinal mucosa to enteric bacteria and its implication for sprue and asiatic cholera. Fed. Proc. **21**, 57—64 (1962)
- Stenqvist, H.: Die „Zellwanderung“ durch das Darmepithel. Anat. Anz. **78**, 68—79 (1934)
- Szubinska, B., Luft, H. J.: Ruthenium red and violet. III. Fine structure of the plasma membrane and extraneous coats in Amoebae (*A. proteus* and *Chaos chaos*). Anat. Rec. **171**, 417—442 (1971)
- Toner, P. G., Ferguson, A.: Intraepithelial cells in the human intestinal mucosa. J. Ultrastruct. Res. **34**, 329—344 (1971)
- Toner, P. G., Carr, K. E., Wyburn, G. M.: The digestive system — an ultrastructural atlas and review. London: Butterworths 1971
- Vollrath, L.: Über die Entwicklung des Dünndarms der Ratte. Morphologische, histochemische und experimentelle Untersuchungen. In: Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch. Bd. 41/2. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1969
- Watson, M. L.: Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 475—478 (1958)

Priv.-Doz. Dr. Herwart F. Otto  
UKE, Pathologisches Institut  
D-2000 Hamburg 20, Martinistr. 52  
Bundesrepublik Deutschland