

Die Kinetik peroral aufgenommener Zink-65 markierter *Saccharomyces cerevisiae*-Keime im Rattenorganismus

J. Arnoldi, W. Böckeler, Ute Vögtle-Junkert

Einleitung

Auf dem Gebiet der Verdauungsphysiologie wiesen in der Vergangenheit zahlreiche Versuche darauf hin, daß neben der Aufnahme von Substanzen im molekularen Bereich durch das Dünndarmepithel auch ein Übergang von Partikeln im Mikrometer-Größenbereich aus dem Darmlumen in das Zottenstroma zu beobachten war.

HERBST (1844) fand in Blut und Chylus von Hunden einzelne Partikel einer drei Stunden zuvor verfütterten Stärkesuspension (4). HIRSCH (1906) konnte in vergleichbaren Untersuchungen eine Ausscheidung dieser ins Blut übergegangenen Partikel über die Glomeruli der Niere in den Urin der Versuchstiere feststellen (5).

Diese und andere historischen Beobachtungen, auch am Menschen, zeigen, daß korpuskuläre Elemente über das Epithel im Intestinaltrakt in angrenzende Blut- und Lymphgefäße gelangen können. Im Rahmen seiner Untersuchungen gelang es VOLKHEIMER (1964), die Herbst-Experimente zu bestätigen (7). Er begründete den Begriff der Persorption, um diese besondere Form der Aufnahme durch das Dünndarmepithel gegenüber der Resorption molekularer Substanzen abzugrenzen. Bemerkenswert war dabei, daß die untersuchten, persorbierenden Partikel (Stärke-Körner, Parasiteneier, Sporen und Pollen) bereits 10 Minuten nach oraler Applikation in Blut- und Lymphgefäßen aber auch schon in Organen nachzuweisen waren (2, 8).

Eigene Untersuchungen hatten den Schwerpunkt, das Phänomen der Persorption anhand eines radioaktiv markierten, lebenden Mikroorganismus, der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, darzustellen.

Dabei sollten, neben der Bestimmung der Dauer der Darmpassage der Partikel, die von VOLKHEIMER beschriebenen Orte der Persorption im Bereich des Dünndarmes nachgewiesen und der Verbleib der persorbierten Zellen im Rattenorganismus aufgeklärt werden.

Der Weg der oral verabreichten Hefe im Körper der Versuchstiere wurde mit Hilfe einer stabilen, eigens entwickelten, radioaktiven Markierung der Zellen mit dem Isotop Zink-65 verfolgt. Übertrittsstellen im Dünndarmepithel sollten auroradiographisch erfaßbar werden. Für den qualitativen Nachweis der Persorption wurden, exemplarisch für alle Organe, Leberproben kulturell auf eine mögliche Deponierung von Hefezellen untersucht.

Material und Methoden

Radioaktive Markierung

Der hier verwendete Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* Hansen (DG 7014) wurde auf Kimmig-Agar (Fertignährboden Merckoplate Nr. 10421) kultiviert. Die Versuche zur radioaktiven Markierung und für den kulturellen Nachweis der Hefe in der Leber erforderten ein Flüssigmedium. Als geeignet erwies sich ein PYG-Medium (Bacto Pepton, Yeast Extract und Glucose) mit einem pH-Wert von 5,0.

In der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{640} = 0,4$) wurden die Hefekulturen zunächst Aktivitäten von 1,0; 10,0 und 50,0 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ ausgesetzt und die Aufnahme-raten bestimmt. Hierzu wurden pro Kulturansatz (50 ml) 0,5 ml Suspension entnommen, zentrifugiert und das Sediment nach mehrmaligem Waschen im Gamma-Counter (Fa. Canberra, Typ S-90) gemessen. Während der Inkubation des Zink-65 in den Hefekulturen erfolgte stündlich eine photometrische Wachstumskontrolle sowie eine Zellzahlbestimmung.

Versuche zur Persorption

Die mit Zink-65 inkubierten Kulturansätze von je 50 ml wurden zentrifugiert, die Zellmasse isoliert und nach mehrmaligem Waschen in je 1 ml Nährmedium resuspendiert. Den Versuchstieren, weiblichen Wistar-Ratten im Alter von 4 Monaten und einem Gewicht von 250 g, wurde die vorbereitete Hefesuspension ($5,0 \times 10^7$ Zellen) mittels Schlundsonde appliziert. Nach Ablauf verschiedener Inkubationszeiten wurden die Organe Leber, Milz, Nieren, Thymus, Herz und Pankreas sowie der gesamte Dünndarm entnommen. Die gefriergetrockneten Proben wurden im Gamma-Counter gezählt.

In einem Parallelversuch wurde nach 10', 30', 1 h, 2 h, 4 h und 8 h Inkubationszeit der Zink-65 markierten Hefesuspension die Leber der Versuchstiere keimfrei entnommen, homogenisiert und in PYG-Medium bei 30° C für vier Tage inkubiert. Proben der Kulturansätze wurden auf Kimmig-Agar ausplattiert und gewachsene Hefekulturen auf Reis-Agar und durch Radioaktivitätsmessung differenziert.

Autoradiographie

Für die autoradiographische Untersuchung des Dünndarmepithels wurde Versuchstieren, 2 h und 4 h nach einer oralen Applikation einer Zink-65 markierten Hefezell-Suspension, der Dünndarm entnommen und in Zentimeter-Abschnitten zunächst vorsichtig gespült und dann in 70% Ethanol fixiert. Nach Paraffineinbettung und Anfertigung von Serienschnitten (5 μm), erfolgte die Beschichtung mit Photoemulsion (Kodak NTB 2) in der Dipping-Technik. Die Schnittpräparate wurden nach einer Expositionszeit von 14 Tagen entwickelt, fixiert und mit einer PAS-Färbung nach Hotchkiss gegengefärbt.

Ergebnisse

Radioaktive Markierung

Bei Verwendung verschiedener Aktivitäten an Zink-65 im Hefekulturansatz konnte, nach Ablauf der Meßreihen mit Hilfe der Daten über aufgenommene Radioaktivität und Parallel ermittelter Zellzahl, der Zink-65-Transport in die Zellen berechnet werden.

Bei Einsatz von 1 μCi , 10 μCi und 50 μCi erreichte die Aktivität von 10 μCi auf 50 ml Kulturansatz mit 0,48 $\mu\text{mol}/\text{g}/\text{h}$ die höchste Aufnahme-rates. Sie wurde daher im Persorptionsversuch eingesetzt. Nach Inkubationszeiten von 30' bis 8 h waren in der Regel ansteigende Zink-65-Aktivitäten in den gefriergetrockneten Organen der Versuchstiere festzustellen (Abb. 1 und 2).

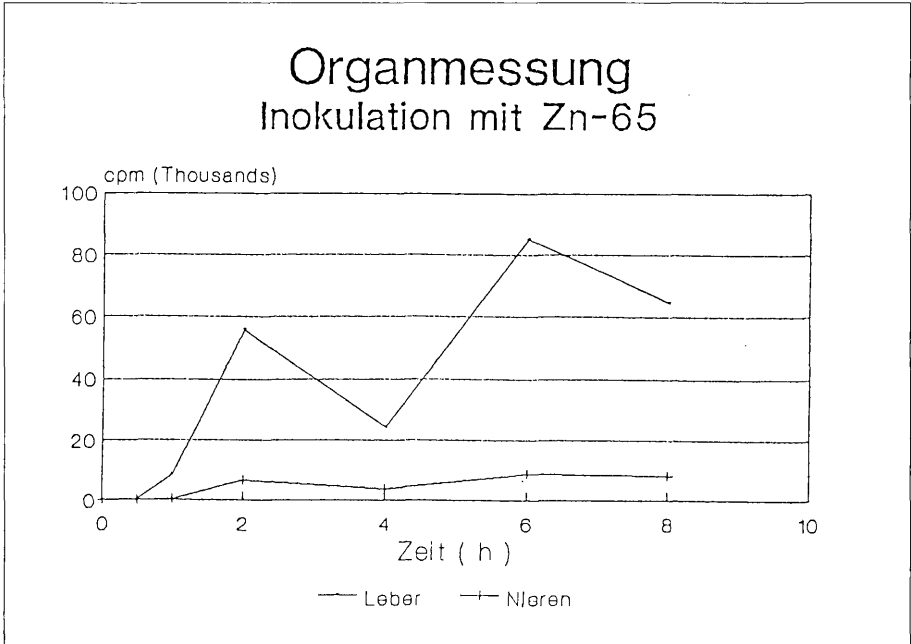


Abb. 1

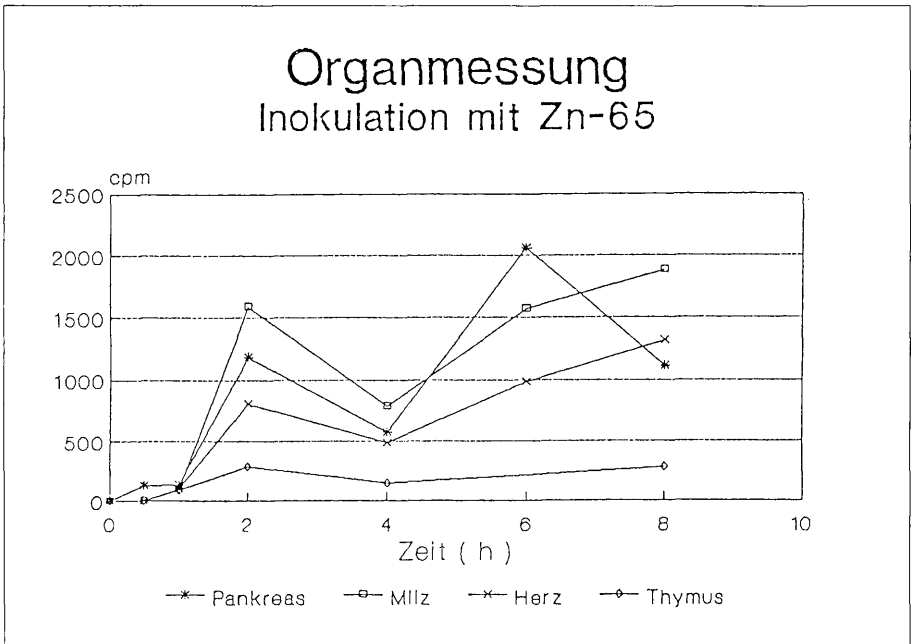


Abb. 2

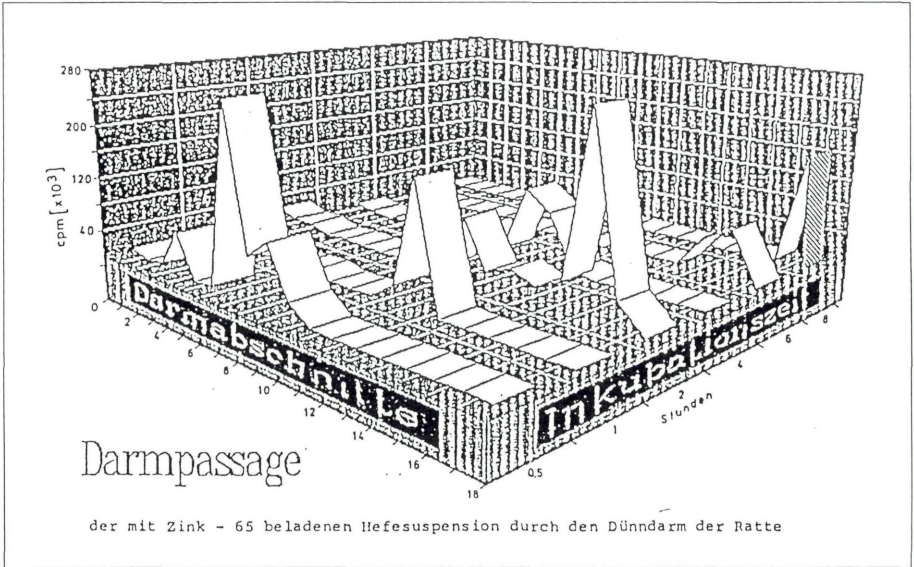


Abb. 3

TABELLE 1
Verteilung der Radioaktivität in den Rattenorganen nach unterschiedlicher Inkubationszeit
der gefütterten Zn⁶⁵-markierten Hefezellen.
(Angaben in cpm; Meßzeit 1 min)

| Organ | Inkubationszeit | | | | | |
|-----------------------|-----------------|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | ½ h | 1 h | 2 h | 4 h | 6 h | 8 h |
| Thymus | 0 | 88 | 289 | 148 | 3916* | 279 |
| Lc. sm. ¹⁾ | 0 | 16 | 70 | 45 | 194 | 507 |
| Ly. l. ²⁾ | 0 | 11 | 23 | 28 | 7 | 27 |
| Herz | 0 | 102 | 806 | 488 | 981 | 1316 |
| Pankreas | 129 | 136 | 1184 | 570 | 2057 | 1108 |
| Nieren | 31/ 65 | 242/ 231 | 3361/ 3354 | 1929/ 1757 | 4345/ 4399 | 4122/ 4304 |
| Milz | 0 | 96 | 1588 | 788 | 567 | 1879 |
| Leber | 283 | 8699 | 55949 | 24260 | 85086 | 64675 |

¹⁾ Lymphocentrum submandibulare

²⁾ Lymphonodi lumbales

* pathologisch vergrößerter Tymus

In der Leber, dem größten Stoffwechselorgan, wurden auch die höchsten Werte an Radioaktivität nach 6 h und 8 h gemessen. Die Ergebnisse der Organmessung gibt die Tabelle 1 wieder.

Die meßtechnische Auswertung des gesamten Dünndarms ermöglichte es, die Dünndarmpassage der Zink-65 markierten Hefezellen über einen Zeitraum von 8 Stunden zu verfolgen (Abb. 3). Aufgrund der durch Leckratenbestimmung festgestellten stabilen Bindung des Zink-65 an die Hefezellen konnten die gemessenen Aktivitäten in den einzelnen Dünndarmsegmenten mit einer entsprechenden Menge an Hefesuspension korreliert werden.

Die Abbildung 3 zeigt, daß bereits 30' nach Applikation die Masse der markierten Suspension ein Drittel des Dünndarmes passiert hat. Nach 8 h ist die Dünndarmpassage beendet, und die höchste Radioaktivität findet sich im Enddarm im bereits geformten Kot.

Versuche zur Persorption

Die hohen Aktivitäten in der Leber ließen auf eine gleichfalls hohe Aufnahme an Hefezellen schließen. Bereits 10' nach Verfütterung der Hefesuspension waren Hefezellen der Gattung *Saccharomyces cerevisiae* aus dem Leberhomogenat kultivierbar. Die anzahlmäßig größten Kulturen wurden 1 h und 2 h nach oraler Applikation festgestellt und noch nach 8 h Inkubationszeit konnten Hefezellen erfolgreich aus der Leber kultiviert werden. Eine eindeutige Differenzierung der Hefe war durch Anzüchtung auf Selektiv-Agar und radioaktiver Messung gewährleistet.

Die nach 2 h bzw. 4 h Inkubationszeit präparierten Dünndarmsegmente ließen, nach autoradiographischer Behandlung und PAS-Färbung, im Duodenumbereich in mehreren Fällen persorbierende Hefezellen erkennen. Markierte Zellen fanden sich zwischen den Enterozyten, im Zottenstroma, in der Tela submucosa in Blut- und Lymphgefäßen und in der Tela muscularis.

Diskussion

Untersuchungen von FUHRMANN (1968) über den Transport von Zink-Ionen in Hefezellen und deren Aufnahme in einen „nicht-austauschbaren“ Pool, führten zur Auswahl dieses Isotopes als Marker der Hefezellen (3).

Der Zink-Transport in die Zellen erfolgte in einer für die Persorptionsversuche ausreichenden Menge, um die Zellen im Rattenorganismus lokalisieren zu können. Die schnelle Aufnahme und der stabile Einbau des Zink-Isotopes favorisierten es gegenüber den üblicherweise zur Markierung eingesetzten Nukliden.

Die Daten aus der Darmpassage der Zn-65 markierten, oral applizierten Hefesuspension belegen einen schubweisen Transport der Zellmasse durch den Dünndarm (Abb. 3). Die bisher angenommene gleichmäßige Verteilung einer oral verabreichten Zellsuspension über den Dünndarmbereich mit einer abschirmenden Wirkung gegenüber, bei Diarrhöen auftretenden Enterobakterien-Infektionen konnte nicht beobachtet werden (1).

Aufgrund der morphologischen Gegebenheiten erscheint zunächst ein Durchtritt von Hefe-Zellen durch das Dünndarmepithel weder auf extrazellulärem noch auf transzellulärem Wege möglich.

TEM-Untersuchungen von MERKER (1969) weisen die "tight junctions" als stabile Permeationsbarrieren zwischen den Enterozyten aus (6). In den vorliegenden Untersuchungen hat es den Anschein, daß sich die Partikel zwischen die Saumzellen schieben und die "tight junctions" aufbrechen. Die Mechanik des Darmtraktes könnte ein Eindringen von Partikeln an lädierten Epithelstellen, sogenannter Desquamationszonen, die durch Mikrotraumen oder Epithelmauserung entstanden sind, begünstigen. Die Hefepartikel gelangen so in die subepitheliale Region der Zotte und von dort mit dem Blut- und Lymphstrom in ableitende Gefäße und Organe.

Die Organmessungen in den Abbildungen 1 und 2 lassen eine mit zunehmender Inkubationszeit ansteigende Deponierung von markierten Hefezellen vermuten.

Ungeklärt ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß die applizierten Partikel bereits nach 10' aus der Leber der Versuchstiere isoliert und kultiviert werden konnten. Die schnelle Deponierung läßt auf einen primär portalen Abtransport der Hefen aus

dem Dünndarm-Bereich schließen. Andererseits muß auch die Möglichkeit einer Persorption bereits im Magen in Betracht gezogen werden.

Während nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden im Dünndarm keine Hefezellen mehr nachzuweisen waren und aufgrund der Verdauung der Masse der Zellen freies Zink-65 in gleichmäßiger Verteilung im gesamten Dünndarmbereich in der Autoradiographie sichtbar gemacht werden konnte, waren persorbierte Hefezellen meist noch intakt und kultivierbar.

Eine Vermehrung der Hefen in den Organen konnte nicht festgestellt werden, doch bleibt zu untersuchen, ob pathogene Organismen gleicher Größe, bei einer vorliegenden Immunsuppression und einer analogen Deponierung in Organen nicht zur Vermehrung kommen und zu Organschädigungen führen können. Festzustellen bleibt, daß die Persorption korpuskulärer Elemente ein in zahlreichen Tierversuchen bestätigbares Phänomen darstellt, welches mit konstanter Regelmäßigkeit auftritt. Es beschreibt dabei weder einen physiologischen noch einen pathologischen Vorgang im engeren Sinne.

Zusammenfassung

In Anlehnung an die Versuche von HERBST (1844) und VOLKHEIMER (1964 ff) zur Aufnahme korpuskulärer Elemente aus dem Dünndarmepithel von Säugern in das Blut- und Lymphgefäßsystem wurde die Persorption von lebenden Hefezellen der Gattung *Saccharomyces cerevisiae* im Intestinaltrakt der Ratte untersucht.

Die zum Nachweis der Hefe in den Versuchstieren entwickelte radioaktive Markierung mit Zink-65 war über die Dauer der Versuche stabil und ausreichend, um die Hefezellen meßtechnisch und autoradiographisch im Rattenorganismus zu erfassen. Bereits 10' nach oraler Applikation konnten markierte Hefezellen in der Leber der Versuchstiere lebend und vermehrungsfähig nachgewiesen werden.

In autoradiographisch untersuchten Dünndarmquerschnitten der Ratte konnten Übertrittsstellen der Hefe-Partikel aus dem Darmlumen in das Zottenstroma lokalisiert werden. Hefezellen fanden sich zwischen den Epithelzellen, in der subepithelialen Region und im Lumen von angrenzenden Blut- und Lymphgefäßen.

Schlüsselwörter

Saccharomyces cerevisiae, Zink-65, Persorption.

Summary

The kinetics of persorbed Zn⁶⁵-labelled *Saccharomyces cerevisiae* in the rat

Following the experiments of HERBST and VOLKHEIMER on the uptake of corpuscular particles from the intestinal epithelium of mammals into the blood and lymphatic system, the persorption of viable *Saccharomyces cerevisiae* was studied.

The radioactive labelling of the yeast cells with zinc-65, was stable for the investigation period and sufficient to recognise single cells by counting and autoradiographic methods in the animals. Ten minutes after oral application, marked yeast cells were demonstrated in the liver by culture.

Autoradiographically studied cross-sections of the small intestine show the passage of yeast cells from the intestinal lumen into the stroma of the villi.

Particles were found between the enterocytes, in the subepithelial region and in the lumen of adjoining blood- and lymphatic vessels.

Key words

Saccharomyces cerevisiae, zinc-65, persorption.

Literatur

1. BÖCKELER, W., ARNOLDI, J., VÖGTLE-JUNKERT, U. (1988):
In-vitro-Versuche zur Wirkung von *Saccharomyces cerevisiae*-Keimen auf Enterobakterien.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. (im Druck).
2. BÖCKELER, W., DREYER, H. P., SASS, W. (1986):
Elektronenmikroskopische Darstellungen von *Saccharomyces cerevisiae* in der Ratte.
GIT Suppl. 6, 73 - 76.
3. FUHRMANN, G. F. (1968):
The transport of Zn^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+} into yeast cells.
Biochem. Biophys. Acta 163, 325 - 330.
4. HERBST, G. (1844):
Das Lymphgefäßsystem und seine Verrichtungen.
Vandenhoeck u. Ruprecht, Göttingen, 1844.
5. HIRSCH, R. (1906):
Über das Vorkommen von Stärkekörnern in Blut und Urin.
Z. exp. Path. Ther. 3, 390.
6. MERKER, H. J. (1969):
Elektronenmikroskopische Morphologie der intestinalen Resorption.
Verh. d. Dtsch. Ges. f. Path., 53. Tagung, 57 - 79.
7. VOLKHEIMER, G. (1964):
Über Resorption und Ausscheidung von intakten Hefezellen.
Zbl. Bakt., 1. Abt. Orig. 192, 121 - 125.
8. VOLKHEIMER, G. (1972):
Persorption.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1972.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dipl. Biol. J. Arnoldi
Forschungsinstitut Borstel, Abt. Mol. Immunologie
Parkallee 1 - 40
D-2061 Borstel · Bundesrepublik Deutschland

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1989

Band/Volume: [11](#)

Autor(en)/Author(s): Arnoldi J., Böckeler Wolfgang, Vögtle-Junkert Ute

Artikel/Article: [Die Kinetik peroral aufgenommenener Zink-65 markierter Saccharomyces cerevisiae-Keime im Rattenorganismus. 223-229](#)