

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Diaplazentare Deoxynivalenolintoxikation bei Schweinefeten. Lassen sich am 70.
Trächtigkeitstag histomorphologisch und immunhistologisch diagnostisch verwertbare
Befunde erheben?**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Wolf Wippermann
aus Bielefeld

Leipzig, 2011

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Uwe Truyen

Betreuer: Prof. Dr. Heinz-Adolf Schoon

Gutachter: Prof. Dr. Heinz-Adolf Schoon
Institut für Veterinär-Pathologie der
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Max M. Wittenbrink
Institut für Veterinärbakteriologie der
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Zürich

Tag der Verteidigung: 30.11.2010

Meinen Eltern

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	2
2.1 Mykotoxine.....	2
2.1.1 Deoxynivalenol.....	2
2.1.1.1 Trichothecene und ihr Vorkommen	2
2.1.1.2 Wirkungsmechanismen.....	4
2.1.1.3 Einfluss von Deoxynivalenol auf das Schwein und andere Spezies.....	5
2.1.1.4 Metabolismus	7
2.1.1.5 Inhibition der Proteinsynthese	8
2.1.1.6 MAP-Kinasen (mitogenaktivierte Proteinkinasen).....	9
2.1.1.7 Einfluss von DON auf die MAP-Kinasen.....	9
2.1.1.8 Apoptose- und Survival-Signalweg	10
2.1.1.9 Einfluss von DON auf den Apoptose- und Survival-Signalweg	12
2.1.1.10 Plazentarer Transfer von Deoxynivalenol und anderen Mykotoxinen	13
2.1.2 Zearalenon	14
2.1.2.1 Vorkommen und allgemeine Wirkungsprinzipien.....	14
2.1.2.2 Metabolismus und Wirkung im Tierkörper	14
2.2 Hämatopoese bei Schweinefeten	15
2.2.1 Phasen der Hämatopoese in der intrauterinen Entwicklung.....	15
2.2.2 Allgemeine Charakteristika der Hämatopoese	15
2.2.3 T-Lymphozyten	16
2.2.3.1 T-Zell-Lymphopoese in Schweinefeten.....	16
2.2.3.2 Histologischer Nachweis von T-Lymphozyten in porzinem Gewebe	16
2.2.4 B-Lymphozyten	17
2.2.4.1 B-Zell-Lymphopoese in Schweinefeten	17
2.2.4.2 Histologischer Nachweis von B-Lymphozyten in porzinem Gewebe	18
2.2.5 Monozyten	19
2.2.5.1 Monopoese	19
2.2.5.2 Histologische Nachweismöglichkeiten der Monozyten in porzinem Gewebe mittels „Myeloid/Histiocyte“-Antigen 386 (MAC 387) sowie mit Lysozym	19
2.3 Histologischer Nachweis proliferierender Zellen in porzinem Gewebe mittels dem Ki-67 Antigen bzw. dem Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	19
2.4 Nachweismöglichkeiten der Apoptose an porzinem Gewebe	20

2.4.1 Histomorphologischer Nachweis der Apoptose	20
2.4.2 Immunhistologischer bzw. Immunfluoreszenz-Nachweis der an der Apoptose beteiligten Enzyme (p-p38 u. p-53 MAP-Kinase, Cytochrom, Bad, Bax, Caspase 9 u. 3).....	20
2.4.3 TUNEL-Methode (TdT-mediated UTP-biotin nick end labeling)	22
2.5 Histologischer Nachweis des Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α) an porzinem Gewebe	22
2.6 Embryonale/Fetale Entwicklung des Schweins unter besonderer Berücksichtigung des 70. Trächtigkeitstages (= Tag der Euthanasie in der eigenen Versuchsanordnung).....	23
2.6.1 Lymphknoten.....	24
2.6.1.1 Fetale Entwicklung der Lymphknoten.....	24
2.6.1.2 Morphologische Charakterisierung der Lymphknoten.....	24
2.6.2 Thymus	25
2.6.2.1 Fetale Entwicklung des Thymus.....	25
2.6.2.2 Morphologische Charakterisierung des Thymus	25
2.6.3 Milz	26
2.6.3.1 Fetale Entwicklung der Milz.....	26
2.6.3.2 Morphologische Charakterisierung der Milz	26
2.6.4 Leber	27
2.6.4.1 Fetale Entwicklung der Leber.....	27
2.6.4.2 Morphologische Charakterisierung der Leber	27
2.6.5 Knochenmark.....	28
2.6.5.1 Fetale Entwicklung des Knochenmarks.....	28
2.6.5.2 Morphologische Charakterisierung des Knochenmarks	28
2.6.6 Dünndarm	28
2.6.6.1 Fetale Entwicklung des Dünndarms	28
2.6.6.2 Morphologische Charakterisierung des Dünndarms.....	29
2.7 Fazit aus der Literatur, bezogen auf die initiale Fragestellung dieser Arbeit.....	29
3 MATERIAL UND METHODEN	30
3.1 Tiergut, Material und Methoden	30
3.1.1 Tiergut, Material und Probenherkunft.....	30
3.1.1.1 Versuchsaufbau und Durchführung nach TIEMANN et al. (2008).....	31
3.1.2 Probenentnahme und Probenaufbereitung.....	32

3.1.2.1 Anatomische Präparation und pathologisch-anatomische Untersuchungen ..	32
3.1.3 Lichtmikroskopische Untersuchungen	32
3.1.4 Immunhistologische Methoden	34
3.1.4.1 Auswertung der immunhistologischen Untersuchungen	36
3.1.5 Statistische Auswertung	38
4 ERGEBNISSE	39
4.1 Makroskopische Untersuchungsbefunde	39
4.2 Histologische Untersuchungsbefunde.....	39
4.2.1 Histologische Untersuchungsbefunde der Lymphknoten.....	39
4.2.2 Histologische Untersuchungsbefunde des Thymus.....	41
4.2.3 Histologische Untersuchungsbefunde der Milz.....	42
4.2.4 Histologische Untersuchungsbefunde der Leber.....	43
4.2.5 Histologische Untersuchungsbefunde des Knochenmarks.....	44
4.2.6 Histologische Untersuchungsbefunde des Dünndarms	45
4.3 Immunhistologische Untersuchungsbefunde.....	48
4.3.1 Immunhistologische Untersuchungsbefunde der Mesenteriallymphknoten.....	48
4.3.2 Immunhistologische Untersuchungsbefunde der Mediastinallymphknoten.....	49
4.3.3 Immunhistologische Untersuchungsbefunde des Thymus	50
4.3.4 Immunhistologische Untersuchungsbefunde der Milz.....	50
4.3.5 Immunhistologische Untersuchungsbefunde der Leber	52
4.3.6 Immunhistologische Untersuchungsbefunde des Knochenmarks	53
4.3.7 Immunhistologische Untersuchungsbefunde des Dünndarms.....	54
4.4 Statistische Auswertung der immunhistologischen Untersuchung.....	59
5 DISKUSSION	60
5.1 Ziel dieser Arbeit.....	60
5.2 Kritische Beurteilung des Untersuchungsmaterials und der Untersuchungsmethoden.....	60
5.3 Histomorphologische und immunhistologische Befunde.....	61
5.3.1 Histomorphologische und immunhistologische Untersuchung der Lymphknoten	62
5.3.2 Histomorphologische und immunhistologische Untersuchung des Thymus.....	63
5.3.3 Histomorphologische und immunhistologische Untersuchung der Milz	64
5.3.4 Histomorphologische und immunhistologische Untersuchung der Leber.....	64
5.3.5 Histomorphologische und immunhistologische Untersuchung des Knochenmarks	65

5.3.6 Histomorphologische und immunhistologische Untersuchung des Dünndarms ...	66
5.4 Abschließende Betrachtung	67
6 ZUSAMMENFASSUNG	68
7 SUMMARY	70
8 LITERATURVERZEICHNIS	72
9 ANHANG	95
9.1 Futtermittelzusammensetzung und Analyse nach GOYARTS et al. 2007	95
9.2 Analyseergebnisse einiger Kontroll- und Versuchstiere	96
9.3 Charakterisierung der Kontrollschweine	97
9.4 Verfahrensschritte der immunhistologischen Untersuchungen	98
9.4.1 Vorbehandlung an Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten.....	98
9.4.2 Besondere Verfahren	98
9.4.3 Antigennachweis mittels monoklonaler AK nach der Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP)-Methode.....	99
9.4.4 Antigennachweis mittels monoklonaler Antikörper in einem 2-Schritt- Detektionssystem (EnVision™)	99
9.4.5 Antigennachweis mittels polyklonaler AK nach der Peroxidase anti-Peroxidase (PAP)-Methode.....	99
9.4.6 Antigennachweis mittels indirekter Peroxidase.....	100
9.4.7 Standard zur Nachbehandlung.....	100
9.5 Verwendete mono- und polyklonale Antikörper und Seren	101
9.5.1 Lösungen und Puffer	102
9.6 Bewertungsschema der Expression von MAC 387, Ki-67 Antigen, CD3 und CD79a	103
9.7 Tabellen der statistischen Auswertung	104
10 DANKSAGUNG	127

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	alpha
Aa.	Arterien
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AKT	Serin-/Threonin-Proteinkinase B
Apaf	apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
Asp	Aspartat
β	beta
Bad	Bcl-2-Antagonist of Cell Death
Bax	pro apoptotisches Protein
Bcl	stammt von „B-Zell-Lymphom“ ab
BML	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
δ	delta
DAB	3,3`Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DAS	Diacetoxyscirpenol
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DON	Deoxynivalenol
ε	epsilon
ERK	extracellular signal regulated protein kinase
et al.	et alii
F.	Fusarium
Fa.	Firma
FAL	Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft
FBN	Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere
FKRH	forkhead transcription factor

FSR	fraktionale Syntheserate
γ	gamma
g	Gramm
h	Stunde
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase
Hck	hämatopoetische Zellkinase
H.-E.-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HPLC	high performance liquid chromatography
HSD	Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase
ICE	Interleucine-converting-enzyme
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Inc.	incorporated
inkl.	inklusive
Int.	international
IRS	immunreaktiver Score
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
krist.	kristallin
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
M	molare Masse
MAP-Kinase	mitogenaktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
min.	Minuten
MJ	Megajoule
ml	Milliliter
mM	Millimol
mOsm	Milliosmol
MPS-System	mononukleäres Phagozytosesystem

mRNS	Messenger-Ribonukleinsäure
n	Anzahl
ng	Nanogramm
Nr.	Nummer
p	phosphoryliert
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase-Methode
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion
PBS	phosphate-buffered saline
p.c.	post conceptionem
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PKR	double-stranded RNA-(dsRNA)-activated protein kinase
ppm	parts per million
s.	siehe
s.u.	siehe unten
S.	Seite
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
sek	Sekunde(n)
sog.	so genannt
spp.	Subspezies
SSL	Scheitel-Steiß-Länge
s.u.	siehe unten
Syn.	Synonym
Tab.	Tabelle
TBS	tris-buffered saline
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
Thr	Threonin
TM	Trade Mark
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TS	Trockensubstanz
TUNEL	TdT-mediated UTP-biotin nick end labeling
Tyr	Tyrosin
u.	und
UV	ultraviolett
v.a.	vor allem

vgl.	vergleiche
Vv.	Venen
ζ	zeta
ZAL	Zearalanol
ZAN	Zearalanon
z.B.	zum Beispiel
ZOL	Zearalenol
ZON	Zearalenon
ZONs	Zearalenon und Derivate
z.T.	zum Teil

1 EINLEITUNG

Kontaminationen von Futter- und Lebensmitteln mit dem Mykotoxin Deoxynivalenol (DON) werden weltweit in zunehmendem Maße beobachtet. Aufgrund der negativen Auswirkung dieses durch verschiedene Fusariumarten produzierten Toxins auf Menschen, Tiere und Pflanzen bleiben auch steigende ökonomische Verluste nicht aus. Schweine gelten unter den Nutztieren als besonders anfällig gegenüber DON-Intoxikationen. Klassische klinische Symptome sind Erbrechen (wodurch DON den Trivialnamen Vomitoxin erhielt), Durchfall, eine verminderte Futteraufnahme und eine reduzierte Lebendmassezunahme.

Derzeit sind zwei Wirkungsmechanismen dieses Mykotoxins bekannt. Diese sind zum einen eine antiproliferative Aktivität, die sich in der Hemmung der Proteinbiosynthese in eukaryotischen Zellen begründet, und zum anderen eine Aktivierung von MAP-Kinasen (mitogenaktivierte Proteinkinasen), die, in Abhängigkeit von der Toxindosis, zu einer Immunstimulation oder Immunsuppression via Apoptose führt. Bezüglich dieser Mechanismen wird in der Literatur vielfach darauf verwiesen, dass Organe mit einem hohen Proteinturnover, wie z.B. Leber, Knochenmark und Darm sowie die Zellen des Immunsystems eine besonders hohe Anfälligkeit gegenüber einer DON-Intoxikation aufweisen.

Bei Schweinen, Mäusen und Ratten konnte ein diaplazentärer Transfer des DON vom Muttertier auf die Feten nachgewiesen werden. Zudem gibt es mehrere Studien mit Mäuse- und Rattenfeten von DON-behandelten Muttertieren, in denen diverse pathologische Effekte des Mykotoxins auf die Embryonen/Feten beobachtet wurden, wie z.B. ein letaler Effekt auf den Embryo, eine Zunahme von Fruchtresorptionen, multiple teratogene Effekte sowie eine signifikante Reduktion des fetalen Körpergewichts, der Scheitelsteißlänge und der Ossifikation. Hingegen sind die Auswirkungen von DON auf Schweinefeten nur unzulänglich bekannt.

Infolgedessen ist das Ziel dieser Arbeit, mittels histomorphologischer und immunhistologischer Untersuchungsverfahren ein pathomorphologisches Korrelat zu den klinisch beschriebenen Veränderungen infolge experimenteller DON-Intoxikation der Muttertiere zu finden, bzw. Parameter zu erfassen, die den Einfluss von DON charakterisieren, und damit ein mögliches diagnostisches Mittel bei der Fragestellung einer DON-Mykotoxikose zu erarbeiten. Die Methodik und der finanzielle Aufwand der angewendeten Untersuchungsverfahren sollen hierbei praxisrelevanten Bedingungen aus Sicht der diagnostischen Pathologie entsprechen.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Mykotoxine

Mykotoxine werden hauptsächlich von den Mycelien filamentöser Pilze gebildet (HUSSEIN u. BRASEL 2001). Hierbei handelt es sich um sekundäre Metaboliten, die keinen biochemischen Einfluss auf die Pilzentwicklung und das Pilzwachstum haben (BU'LOCK 1975, MOSS 1991). Man nimmt an, dass sie als Produkte eines so genannten „Luxusmetabolismus“ ausschließlich unter nährstoffreichen Bedingungen als natürliche Stoffwechselprodukte gebildet werden (GEDEK 2002). Hingegen findet nach älterer Literatur die Synthese von Mykotoxinen ausschließlich bei Vorliegen ungünstiger Lebens- und Wachstumsbedingungen statt und wird als eine Form der Erhaltungsstrategie und Optimierung der eigenen Fortpflanzungsbedingungen angesehen (GEDEK 1980). Bereits in geringen Konzentrationen (BHATNAGAR et al. 2002) können sie bei Pflanzen, Vertebraten sowie anderen eukaryotischen und prokaryotischen Organismen zu nachteiligen Effekten führen. Weltweit werden mit steigender Tendenz durch Mykotoxine verursachte Erkrankungen und daraus resultierend steigende, zum Teil signifikante ökonomische Einbußen verzeichnet (HUSSEIN u. BRASEL 2001, SCHAAFSMA 2002, VARDON 2003, PESTKA u. SMOLINSKI 2005). Neben den üblichen Toxinquellen, wie Lebensmitteln und Futtermitteln (JELINEK et al. 1989), besteht ein weiteres, zunehmendes, potentiell Risiko einer Mykotoxikose durch die Inhalation getreidehaltiger Stäube (vgl. Kap. 2.1.1.4, S. 7) (HINTIKKA u. NIKULIN 1998, KRYSINSKA-TRACZYK et al. 2001, RADON u. NOWAK 2003). Der Charakter und die Vielfalt der produzierten Toxine hängt von der Pilzgattung und -art ab, wobei es zum einen Pilze gibt, die in der Lage sind, mehr als ein Toxin zu produzieren, zum anderen Toxine, die von mehr als einer Pilzart produziert werden können (DIEKMAN u. GREEN 1992, HUSSEIN u. BRASEL 2001, BHATNAGAR et al. 2002). Bereits in den 1980er Jahren wurden mehr als 300 Pilzspezies, die rund 200 Toxine als Stoffwechselprodukte bilden, in der Literatur beschrieben (HABERMEHL 1989), wobei die genaue Anzahl an Mykotoxinen nicht bekannt ist und in die Tausende gehen könnte (ANON. 2003). Im Rahmen von Einschätzungen beträgt die Anzahl bekannter Pilzspezies zwischen 69.000 und 100.000 (HAWKSWORTH 1991, ESSER u. LEMKE 1996).

2.1.1 Deoxynivalenol

2.1.1.1 Trichothecene und ihr Vorkommen

Bei den Trichothecenen handelt es sich um Esterverbindungen von sesquiterpenoiden Alkoholen mit einem trizyklischen Ringsystem (vgl. Abb. 2.1, S. 3). Charakteristisch für alle Trichothecene sind eine Doppelbindung zwischen C9 und C10 sowie die Epoxidgruppen an C12 und C13, aufgrund dessen sie auch als 12,13-Epoxytrichothecene bezeichnet werden (TAMM 1977). Die einzelnen Trichothecene unterscheiden sich aufgrund verschiedener Konstituenten an den

Positionen 3, 4, 7, 8 und 15 des Moleküls (GROVE 1988, 1996, PESTKA u. CASALE 1989, PESTKA u. SMOLINSKI 2005) und werden demnach in vier Gruppen (A, B, C und D) unterteilt.

Typ A-Trichothecene (z.B. T-2 Toxin, HAT-2 Toxin, Neosolaniol) weisen eine hohe Toxizität auf und werden von mehreren Fusarienarten gebildet. Sie werden in ihrer Bedeutung jedoch als geringer eingestuft als die vergleichsweise häufiger auftretenden Typ B-Trichothecene (z.B. Deoxynivalenol (DON)), die sich durch eine Ketogruppe am C8-Atom auszeichnen (s. Abb. 2.1) (GAREIS et al. 1989, ROTTER et al. 1993, LEW 1994, ROTTER et al. 1996, PESTKA et al. 2004).

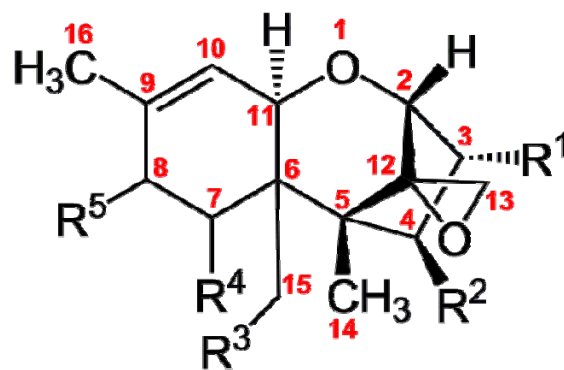


Abb. 2.1: Strukturformel der Trichothecene

Deoxynivalenol wurde 1973 durch VESONDER und Mitarbeiter beschrieben. Nachdem 1972 größere Mengen an Maischargen aus dem „U.S. Corn Belt“ mit *Fusarium graminearum* kontaminiert waren und bei Schweinen nach der Fütterung zu Erbrechen führten, isolierten sie die für den Vomitus verantwortliche Substanz und identifizierten sie als ein 3, 7, 15-trihydroxy-12, 13-epoxy-trichothecene-9en-8one. Aufgrund des Erbrechens gaben sie ihr den Trivialnamen „Vomitoxin“ (VESONDER et al. 1973). Etwa zeitgleich wurde dieses Mykotoxin von zwei japanischen Wissenschaftlern beschrieben (MOROOKA et al. 1972, YOSHIZAWA u. MOROOKA 1973).

Deoxynivalenol wird außer von *Fusarium graminearum* auch von den toxinbildenden Fusarienarten *F. culmorum*, *F. roseum* und *F. sporotrichioides* auf Getreide, Mais, Gräsern bzw. Heu gebildet (ABOUZIED et al. 1991, ROTTER et al. 1996, D’MELLO u. MACDONALD 1997, DÖLL et al. 2003, MENG et al. 2006). Eine DON-Kontamination ist häufig vergesellschaftet mit dem Mykotoxin Zearalenon (ZON), wie es z.B. von SCUDAMORE et al. (1998) und DAWLATANA et al. (2002) beobachtet wird.

Das Auftreten und das Ausmaß eines Fusarienbefalls in Futter- und Lebensmitteln ist ein multifaktorielles Geschehen (MASTEL u. MICHELS 2000). Mögliche Einflussfaktoren sind in Tab. 2.1 (S. 4) zusammengefasst, wobei die Witterungsfaktoren zweifelsohne den größten Einfluss auf den Befall haben.

Tab. 2.1: Beispiele für Einflussfaktoren auf das Pilzwachstum in der Landwirtschaft

Einflussfaktor	Beispiel	Autor
Pflanzenart (Sortenwahl)	Weizen mit Vorfrucht Mais erhöht das Befallsrisiko des Weizens	BECK et al. 1997a, b
Fruchtfolge		
Bodenbearbeitung/ Ernterückstände		
Düngung	hoher u. niedriger Stickstoffgehalt des Bodens fördert Pilzwachstum	WARREN u. KOMMEDAHL 1973, COOK 1980, OBST 1988, HINTERHOLZER 1993
Pflanzenschutz	Einsatz von Fungiziden hemmt das Pilzwachstum	PARRY et al. 1995, MESTERHAZY u. BARTOK 1996
Witterung	hohe Temperaturen u. Regen fördern das Pilzwachstum	SUTTON 1981, MASTEL u. MICHELS 2000
Bearbeitung u. Lagerung der Pflanzen u. ihrer Produkte	feuchte Ernte/Lagerung, unzureichende Getreidereinigung fördern das Pilzwachstum	

Die Befallsintensität der Pflanzen mit Fusarien steht in keinem Zusammenhang mit der gebildeten Menge an Mykotoxinen (MASTEL u. MICHELS 2000), da ein Pilzbefall nicht zwingend mit einer Toxinbildung einhergeht. Aus diesem Grund ist der Grad eines makroskopisch nachweisbaren Pilzbefalls kein Indikator für die zu erwartende Toxinkonzentration. Auch bei makroskopisch nicht mit Pilzen befallenen Pflanzen können „praxisrelevante“ Mykotoxinkonzentrationen nachgewiesen werden (BHATNAGAR et al. 2002).

Darüber hinaus ist bekannt, dass eine Mykotoxinbildung während der Wachstums- und Reifephase der Pflanzen eine spätere Toxinanreicherung unter ungünstigen Lagerungsbedingungen nicht ausschließt (CHRISTENSEN et al. 1965a, GEDECK 1980, CHELKOWSKI 1998).

2.1.1.2 Wirkungsmechanismen

Die Effekte des DON und anderer Trichothecene beruhen auf zwei bedeutsamen Wirkungsmechanismen. Zum einen führt die Bindung an ribosomale 60S Untereinheiten zu einer Inhibierung der Proteinbiosynthese (s. Kap. 2.1.1.5, S. 8) (EHRlich u. DAIGLE 1987), zum anderen hat DON eine immunmodulierende Wirkung (PESTKA u. BONDY 1994) durch die Aktivierung diverser MAP-Kinasen und der daraus resultierenden Apoptose (s. Kap. 2.1.1.7, S. 9) (PESTKA et al. 2004, PESTKA 2008).

2.1.1.3 Einfluss von Deoxynivalenol auf das Schwein und andere Spezies

DON kann beim adulten Schwein, in Abhängigkeit von der Expositionsdosis neben Vomitus zu folgenden klinischen Befunden führen: Diarrhoe, Anorexie, verminderte Lebendmassezunahme, verringerte Körper- und Organgewichte, Hämorrhagie, Muskelschwäche, Krämpfe sowie verminderte Serumprotein- und Albuminwerte (FORSYTH et al. 1977, YOUNG et al. 1983, COPPOCK et al. 1985, BERGSJØ et al. 1993, ROTTER et al. 1994, 1995). Tolerierbare Orientierungswerte für die Konzentrationen von Deoxynivalenol und Zearalenon im Futter von Schwein, Rind und Huhn sind in Tab. 2.2 angegeben.

LUN et al. (1985) konnten in einem Fütterungsversuch nachweisen, dass sich die verminderte Lebendmassezunahme nahezu ausschließlich in einer Reduktion der Futterraufnahme begründet. Des Weiteren ergab eine pharmakologische Studie, dass auch eine parenterale Gabe von DON Erbrechen auslöst, was auf eine Beteiligung des zentralen Nervensystems hindeutet (PRELUSKY et al. 1988). In der Literatur beschriebene pathologisch-anatomische und histopathologische Befunde juveniler und adulter Tiere verschiedener Tierarten infolge einer DON-Exposition unterschiedlicher Konzentrationen sind in Tab. 2.3 (S. 6) dargestellt.

In der mir zugänglichen Literatur existiert nur eine wissenschaftliche Arbeit über DON-bedingte, histopathologische Alterationen bei Schweinefeten: TIEMANN et al. (2008) konnten am gleichen Untersuchungsgut, das auch im Rahmen dieser Studie verwendet worden ist, einen Anstieg des Glykogengehalts in den Hepatozyten DON-behandelter Tiere nachweisen, sie begründen diesen mit einem durch Fusariumtoxine gesteigerten Cortisol-Level.

Demgegenüber beschreiben einige Studien mit Mäuse- und Rattenembryos/-feten DON-behandelter Muttertiere letale Effekte auf den Embryo, vermehrte Fruchtresorptionen, multiple teratogene Effekte sowie eine signifikante Reduktion des fetalen Körpergewichts, der Scheitelsteißlänge und der Ossifikation (KHERA et al. 1982, DEBOUCKE et al. 2001, COLLINS et al. 2006).

Tab 2.2: Orientierungswerte für Konzentrationen von Deoxynivalenol und Zearalenon im Futter von Schwein, Rind und Huhn, bei deren Unterschreitung die Gesundheit und Leistungsfähigkeit nicht beeinträchtigt wird (mg/kg Futter, bei 88% Trockenmasse) (ANON. 2000)

Tierart	Mykotoxin	
	Deoxynivalenol	Zearalenol
Schwein		
Präpubertäre weibliche Zuchtschweine	1	0,05
Zuchtsauen und Mastschweine	1	0,25
Rind		
Präruminierend	2	0,25
Weibliches Aufzuchtrind	5	0,5
Mastrind	5	¹
Huhn	5	¹

Legende zu Tab. 2.2: ¹ keine kritischen Werte bekannt

Tab. 2.3: Pathologisch-anatomische und histopathologische Befunde in ausgewählten Organen juveniler und adulter Tiere verschiedener Spezies nach einer DON-Exposition

Organ	Tierart/(Dosis)/ Alter	Befund	Autor
Lymphknoten	- Maus und Ratte, (7,5 mg/kg KM), J - Schwein (0,5 mg/kg KM), J	- Zellnekrosen in Parakortex und Follikeln - Lympholyse der B-Lymphozyten	ARNOLD et al. 1986 COPPOCK et al. 1985
Thymus	- Maus und Ratte (7,5 mg/kg KM), J - Ratte (5 mg/kg KM), A - Maus (25 mg/kg KM), A	- Thymusatrophie - lymphozytäre Depletion - Lymphozytenapoptose	ARNOLD et al. 1986 COLLINS et al. 2006 ZHOU et al. 2000
Milz	- Maus und Ratte (7,5 mg/kg KM), J - Schwein, A (3-9,5 mg/kg FM)	- Follikel fehlend oder in der Größe reduziert, hämatopoetische Zellen deutlich reduziert - Hämosiderose	ARNOLD et al. 1986 TIEMANN et al. 2006
Peyersche Platten	- Maus (25 mg/kg KM), A	- Lymphozytenapoptose	ZHOU et al. 2000
Leber	- Ratte (1-5 mg/kg KM), A - Huhn (Dosis unbekannt), J	- hepatozelluläre zytoplasmatische Alterationen - vakuoläre Dystrophie (DON in Kombination mit T-2 Toxin u. DAS)	COLLINS et al. 2006 KONJEVIC et al. 2004
Pankreas	- Schwein (0,5 mg/kg KM)	- Nekrosen der pankreatischen Azinus- und Inselzellen	COPPOCK et al. 1985
Darm	- Maus und Ratte (7,5 mg/kg KM), J - Huhn (5-10 mg/kg FM), J	- Villi im Jejunum verkürzt und in der Anzahl reduziert, Nekrose einzelner Enterozyten - Villi im Duodenum bzw. Jejunum verkürzt und von geringerem Durchmesser	ARNOLD et al. 1986 AWAD et al. 2006a, b
Magen	- Maus und Ratte (7,5 mg/kg KM), J -Ratte (2,5 mg/kg KM), A	- dilatierte Drüsen - Schleimhaut: Hyperplasie der Mukosa, Erosionen und Ulzerationen, Fibrose, chronisch aktive Entzündung	ARNOLD et al. 1986 COLLINS et al. 2006
Niere	- Maus (2, 10 u. 25 ppm), A - Schwein (4,5 mg/kg FM), J	- IgA Nephropathie - geringgradige Nephrose	GREENE et al. 1994 HARVEY et al. 1996

Legende zu Tab. 2.3: A: adult, DAS: Diacetoxyscirpenol, DON: Deoxynivalenol, FM: Futtermittel, IgA: Immunglobulin A, J: juvenil, KM: Körpermasse, T-2 Toxin: Syn. Fusariotoxin-2

2.1.1.4 Metabolismus

Die tierartspezifische Empfindlichkeit gegenüber DON hängt maßgeblich vom Abbau des DON zum wesentlich weniger toxischen Metaboliten De-Epoxy-DON ab. Nach oraler Aufnahme gelangt DON über den Kreislauf sehr schnell ins Gewebe (PESTKA et al. 2008).

Schweine sind im Vergleich zu den übrigen landwirtschaftlichen Nutztieren besonders empfindlich gegenüber DON (s.u., Tab. 2.4) (SCHUH 1981, PRELUSKY et al. 1994, OLDENBURG et al. 2000), gefolgt von Mäusen, Ratten, Geflügel und Wiederkäuern (ROTTER et al. 1996). Schweine resorbieren DON zu 82% im kranialen Anteil des Dünndarms. Davon werden ca. 95 % unverändert über die Niere ausgeschieden. Lediglich 3-5 % werden in der Leber zu De-Epoxy-DON konjugiert und über die Galle ausgeschieden (COPPOCK et al. 1985, FRIEND et al. 1986, PRELUSKY et al. 1988, ROTTER et al. 1996).

Wiederkäuer hingegen sind wesentlich unempfindlicher gegenüber DON. Während der Magenpassage kommt es durch die Pansenmikroorganismen zu einer umfangreichen Deepoxydierung der 12,13-Epoxidgruppe (KING et al. 1984, SWANSON et al. 1987, HE et al. 1992). Dieser Mechanismus wird auch als „erste Abwehr“ bezeichnet.

Hühner weisen im Allgemeinen eine relative Unempfindlichkeit gegenüber Fusariumtoxinen auf. Sie verfügen im Gegensatz zu anderen Nutztieren über ein Nierenpfortadersystem, wodurch es zu einem „first-pass“-Effekt mit einer schnellen Eliminierung der Mykotoxine kommt (PRELUSKY et al. 1986, OLDENBURG et al. 2000). HE et al. (1992) konnten darüber hinaus die Fähigkeit intestinaler Mikroorganismen, DON zu De-Epoxy-DON abzubauen, nachweisen.

AMUZIE et al. (2008) wiesen in einem Versuch mit Mäusen nach, dass die nasale DON-Applikation toxischer ist, als die orale und machten auf die Gefahr, die von getreidehaltigen Stäuben ausgehen kann, aufmerksam (vgl. Kap. 2.1, S. 2). Eine mögliche Ursache kann die höhere Toxinbelastung des Gewebes darstellen, da die Plasma- und Gewebekonzentrationen nach nasaler Applikation 1,5 bis 3 mal höher sind als nach oraler.

Tab. 2.4: Relative Empfindlichkeit landwirtschaftlicher Nutztiere gegenüber Fusariumtoxinen (DÄNICKE et al. 2000)

Tierart	Mykotoxin	
	Deoxynivalenol	Zearalenon
Schwein		
Präpubertäre weibliche Zuchtschweine	+++	+++
Zuchtsauen	+++	++
Mastschweine	+++	++
Huhn (Legehühner, Masthühner)	+	+
Rind		
Präruminierend	+++	++
weibliches Aufzuchtrind	+	++
Mastrind	+	+
Pferd	?	?

Legende zu Tab. 2.4: Empfindlichkeit: + = gering, ++ = mittel, +++ = stark, ? = unbekannt

2.1.1.5 Inhibition der Proteinsynthese

DON und andere Trichothecene binden an die 60S-Untereinheit der Ribosomen (UENO 1984, EHRLICH u. DAIGLE 1987, MCLAUGHLIN et al. 1997, DÄNICKE 2002) diverser eukaryoter Zellen (UNEO et al. 1968, OHTSUBO et al. 1972, WEI et al. 1974, CARTER et al. 1976, INDERLIED et al. 1980, SMITH u. DAVID 1981, NOTARIO et al. 1982), woraus eine ribosomale Konformationsänderung resultiert. Infolgedessen wird der Aufbau funktionaler 80S Komplexe unterbunden und somit die Proteinbiosynthese gehemmt (WOLLENHAUPT et al. 2007). In Abhängigkeit von ihrer speziellen Wirkungsweise können die Trichothecene weiter unterteilt werden: in einen I-Typ, der die Initiation inhibiert, einen E-Typ, der die Polypeptid-Kettenelongation inhibiert und einen T-Typ, zu dem auch DON gezählt wird, der die Ketten-termination inhibiert sowie bei hoher Konzentration ebenfalls die Elongation (s. Abb. 2.2) (CUNDLIFFE et al. 1974, CUNDLIFFE u. DAVIES 1977, FEINBERG u. MCLAUGHLIN 1989). DÄNICKE et al. (2006) konnten die reduzierte Proteinsynthese bei Schweinen nach einer DON-Exposition beispielsweise mittels einer Bestimmung der Fraktionalen Syntheserate (FSR) in Nieren, Milz und Ileum nachweisen.

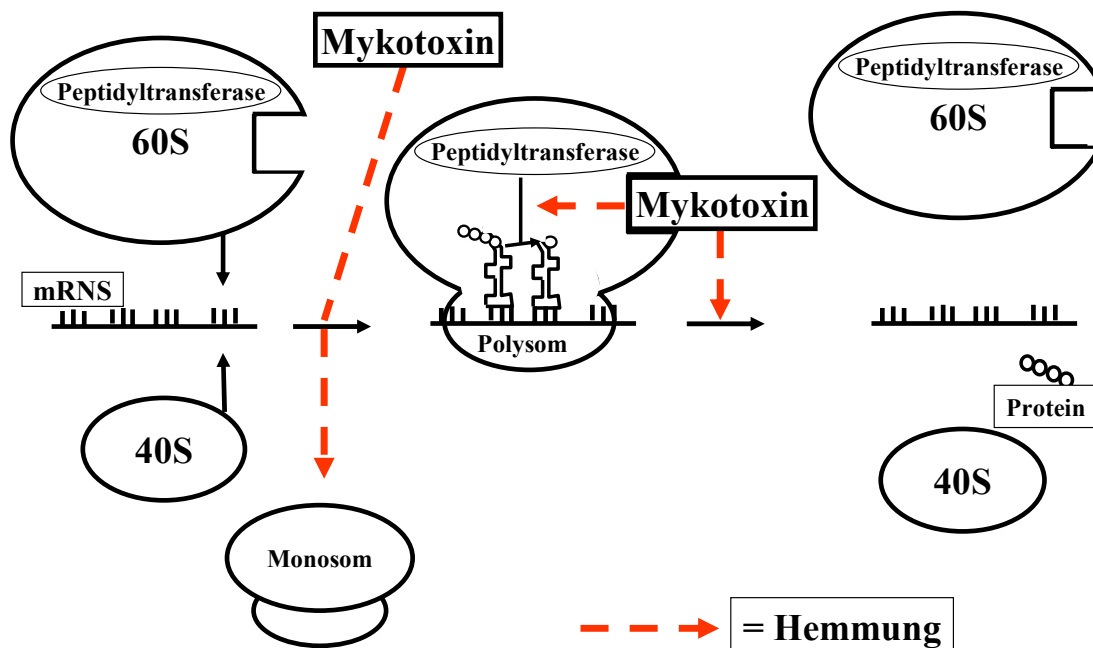


Abb. 2.2: Mechanismen der Hemmung der Proteinsynthese durch Trichothecene (modifiziert nach DÄNICKE et. al 2000)

Legende zu Abb. 2.2: 40S: ribosomale 40S-Untereinheit, 60S: ribosomale 60S-Untereinheit, mRNS: Messenger-Ribonukleinsäure

2.1.1.6 MAP-Kinasen (mitogenaktivierte Proteinkinasen)

Die MAP-Kinasen sind von entscheidender Bedeutung für die Signalübertragung in der Immunantwort (DONG et al. 2002) und steuern zahlreiche physiologische Prozesse, wie z.B. die Zellproliferation, die Zelldifferenzierung und die Apoptose in Leukozyten (s. Abb. 2.3) (COBB 1999, RAO 2001). Sie phosphorylieren eine Vielzahl anderer Proteine an spezifischen Serin- und Threoninresten und werden selbst durch Phosphorylierung an zwei Stellen (Tyrosin und Threonin) aktiviert (ANDERSON et al. 1990, LEE et al. 2003). Die primären MAP-Kinase-Unterfamilien beinhalten: p44 und p42 MAP-Kinasen, die auch bekannt sind als „extracellular signal regulated protein kinase“ 1 und 2 (ERK 1 und 2), p54 und p46 c-Jun N-terminale Kinasen 1 und 2 (JNK 1 und 2), die auch als Stress-aktivierte Proteinkinasen bezeichnet werden (SAPK 1 und 2) sowie die p38 MAP-Kinase (COBB 1999, SCHAEFFER u. WEBER 1999, WIDMANN et al. 1999). Neben Protein-Synthese-Inhibitoren wie DON, können endotoxische Lipopolysaccharide, Hyperosmolarität, UV-Strahlung, Hitze sowie einige Zytokine (IL-1, TNF- α) „zellulären Stress“ verursachen und somit zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen führen (DAVIS 1994, DERIJARD et al. 1994, FRESHNEY et al. 1994, ROUSE et al. 1994, RAINGEAUD et al. 1995, WASKIEWICZ u. COOPER 1995).

2.1.1.7 Einfluss von DON auf die MAP-Kinasen

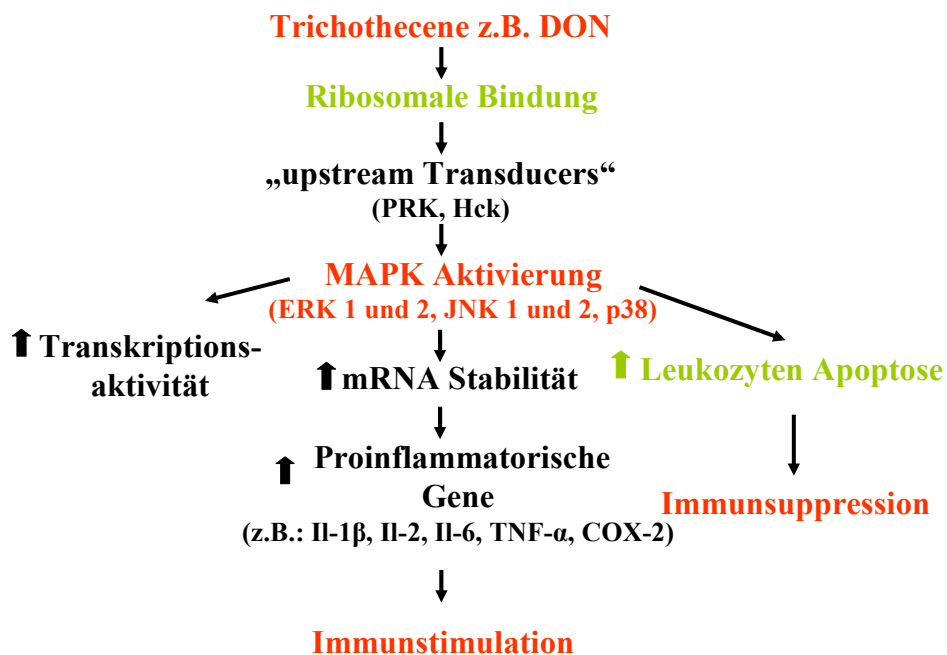


Abb. 2.3: Darstellung der Interaktion molekularer und zellulärer Mechanismen induziert durch Trichothecene (modifiziert nach PESTKA et al. 2004)

Legende Abb. 2.3: COX-2: Cyclooxygenase 2, ERK 1 und 2: „extracellular signal regulated protein kinase“ 1 und 2 (Syn. p44 und p42 mitogenaktivierte Proteinkinase), Hck: hämatopoetische Zellkinase, IL: Interleukin, JNK 1 und 2: c-Jun N-terminal Kinase 1 und 2 (Syn. p54 und p46 mitogenaktivierte Proteinkinase), MAPK: mitogenaktivierte Proteinkinase, p38: p38 mitogenaktivirte Proteinkinase, PRK: double-stranded RNA-(dsRNA)-activated protein kinase, TNF- α : Tunor-Nekrose-Faktor- α

Die Bindung von DON oder anderer Trichothecene an die Ribosomen führt neben der Hemmung der Proteinbiosynthese zu einer schnellen Aktivierung der MAP-Kinasen durch Phosphorylierung (s. Abb. 2.3, S. 9). Dieser Mechanismus wird auch als „Ribotoxic stress response“ bezeichnet (IORDANOV et al. 1997, LASKIN et al. 2002, BAE u. PESTKA 2008). Es konnten zwei Kinasen identifiziert werden, die mutmaßlich als so genannte „Up-stream transducers“ die DON-induzierte MAP-Kinase-Phosphorylierung bzw. -Aktivierung fördern. Hierbei handelt es sich um die „double-stranded RNA-(dsRNA)-activated protein kinase“ (PKR) und die hämatopoetische Zellkinase (Hck) (WILLIAMS 2001, PESTKA et al. 2004).

Diverse *in vivo*- und *in vitro*- Versuche zeigen, dass Trichothecene alle in Kap. 2.1.1.6 (S. 9) aufgeführten MAP-Kinasen aktivieren (SHIFRIN u. ANDERSON 1999, YANG et al. 2000, MOON u. PESTKA 2002, ZHOU et al. 2003a). *In vitro* induziert DON die Phosphorylierung und damit die Aktivierung der p38 MAP-Kinase bereits nach 15 min. Der aktivierte Zustand bleibt über einen Zeitraum von ca. 3 h erhalten (ZHOU et al. 2005a). Paradoxe Weise führt DON, abhängig von der Dosis und Frequenz der Darreichung, entweder zu einer Immunstimulation oder zu einer Immunsuppression (BONDY u. PESTKA 2000) (s. Abb. 2.3, S. 9). Hochdosierte Trichothecene fördern das schnelle Einsetzen einer Leukozytenapoptose (PESTKA et al. 1994) und können auf diesem Weg zu einer manifesten Immunsuppression führen. In Fütterungsversuchen mit Trichothecenen konnten an Mäusen Leukozytenapoptosen im Bereich des Thymus, der Milz und des Knochenmarks nachgewiesen werden (IHARA et al. 1998, ISLAM et al. 1998a, ISLAM et al. 1998b, MIURA et al. 1998, SHINOZUKA et al. 1998). Dagegen führen geringe Konzentrationen zu einer Aufregulierung und einer Stabilitätssteigerung der mRNAs von Genen diverser proinflammatorischer Proteine (Zytokine) (MOON u. PESTKA 2002, PESTKA et al. 2004) und bedingen so eine Immunstimulation. Ein Beispiel hierfür ist die Aufregulation der Cyclooxygenase-2 (COX-2) und eine daraus resultierende Produktion von Prostaglandinmetaboliten, welche zu einer DON-induzierten IL-6-Produktion (Interleukin-6-Produktion) beitragen (MOON u. PESTKA 2003, PESTKA u. ZHOU 2000). IL-6 wiederum spielt eine wichtige Rolle bei einer DON-bedingten IgA-Überproduktion (YAN et al. 1997). Die Bildung von IgA-Komplexen kann zu Nephropathien führen (vgl. Tab. 2.3, S. 6), die nach Versuchen mit Mäusen und Schweinen beschrieben wurden (GREENE et al. 1994, HARVEY et al. 1996). Daneben konnte in diversen Arbeiten eine gesteigerte mRNA-Expression des TNF- α (CHUNG et al. 2003), des IL-2 (LI et al. 1997b, MEKY et al. 2001), des IL-8 (KINSER et al. 2004) und des IL-1beta nachgewiesen werden (ZHOU et al. 1997, WONG et al. 1998, ZHOU et al. 1998).

2.1.1.8 Apoptose- und Survival-Signalweg

Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltodes und führt über eine Reihe von biochemischen Reaktionen zu einer charakteristischen Zellmorphologie und zum Tod der Zelle (SCHWARTZMAN u. CIDLOWSKI 1993). Sie ist essentiell für die Organogenese, die Gewebemöostase und die Elimination von potentiell schädlichen Zellen (RITTER et al. 2000, KERR 2002). Es existieren zwei Signalwege für die Apoptose, der intrinsische und der extrinsische Signalweg (DOWNWARD 2004). Der extrinsische Signalweg wird eingeleitet durch

eine Ligandenbindung an sogenannte Todesrezeptoren, die sich an der Zelloberfläche befinden (OBERLEITHNER 2005). Spezifische Liganden sind zum Beispiel der Tumornekrosefaktor (TNF) und andere Zytokine. Die Folge ist eine Aktivierung der Caspase-Kaskade. Caspasen sind Proteasen, denen bei der Apoptose die Hauptrolle zukommt (GREEN 2003). Die „Henker-Caspase“ (Caspase 3) liegt als inaktives Dimer vor und wird von den Initiator-Caspasen aktiviert (ASHKENAZI u. DIXIT 1998).

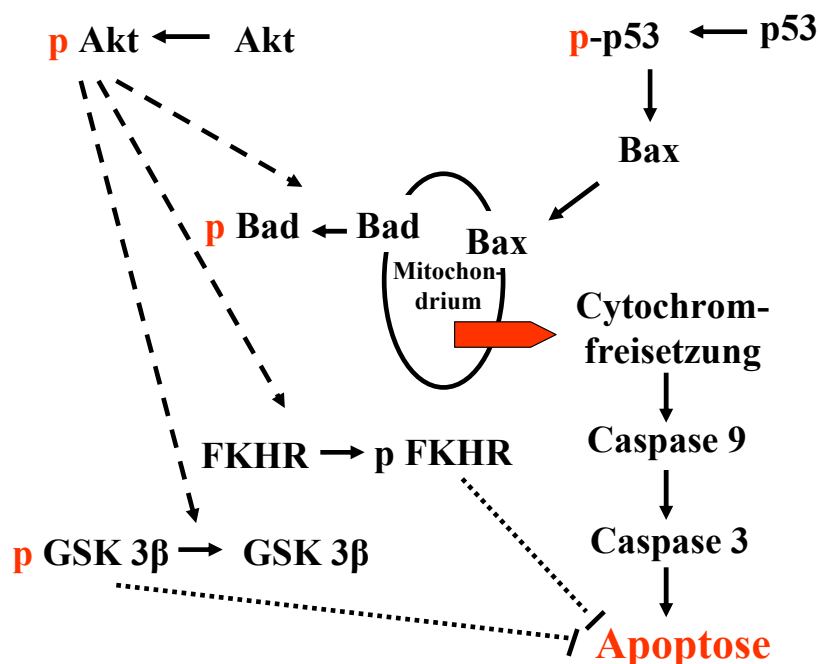


Abb. 2.4: Darstellung des intrinsischen Apoptose- und des Survival-Signalweges (modifiziert nach ZHOU et al. 2005b)

Legende zur Abb. 2.4: Akt: Serin/Threonin Proteinkinase B, Bad: „Bcl-2-Antagonist of Cell Death“, Bax: pro apoptotisches Protein, FKHR: „forkhead transcription factor“, p Bad: phosphorylierter „Bcl-2-Antagonist of Cell Death“, p FKHR: phosphorylierter „forkhead transcription factor“, GSK 3β: Glykogen Synthase Kinase-3β, p GSK 3β phosphorylierte Glykogen Synthase Kinase-3β, p53: p53 mitogenaktivierte Proteinkinase, p-p53 phosphorylierte p53 mitogenaktivierte Proteinkinase

Intrazelluläre Schäden und Zellstress stimulieren den intrinsischen Signalweg (s. Abb. 2.4.) (HEIDEMANN 2007). Hierbei kommt der p53 MAP-Kinase, als einem kritischen Apoptosemediator (bzw. einem zentralen Regulator der Apoptose), eine besondere Bedeutung zu (PLUQUET u. HAINAUT 2001, HOFSETH et al. 2004). Sie wirkt sowohl transkriptionsabhängig als auch -unabhängig (OREN 2003). Zudem spielen für die Auslösung des intrinsischen Signalweges die Mitochondrien eine zentrale Rolle, die durch die Bcl-2- Proteinfamilie (Bcl stammt von „B-Zell-Lymphom“ ab) reguliert werden. Die anti-apoptotischen Bcl-2 und Bcl-xL Proteine sind in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und hemmen eine Cytochrom c-Freisetzung. Die Phosphorylierung der p53 MAP-Kinase führt zu einer Translokation der pro-apoptotischen Bad („Bcl-2-Antagonist of Cell Death“) und Bax-Proteine („pro apoptotisches Protein“) in die Mitochondrienmembran und zur Bildung von pro-apoptotischen

Komplexen mit den Bcl-2 und Bcl-xL Proteinen. Diese Komplexe induzieren Poren in der Mitochondrienmembran und führen so zur Freisetzung von Cytochrom c (MARSDEN u. STRASSER 2003). Intrazytoplasmatisches Cytochrom c wiederum bildet einen Komplex mit Apaf-1 (apoptotischer Protease Aktivierungsfaktor 1) und führt zur Aktivierung der Initiorkaspase (Caspase 9). Diese aktiviert die Caspase 3, die auch als Effektor-Caspase oder „Henker“ (s.o.) bezeichnet wird und das Schlussglied des Signalweges bildet. Sie spielt eine Schlüsselrolle in der Apoptose. Mit ihrer Aktivierung wird die exekutive Phase der Apoptose eingeleitet und die Degeneration zahlreicher zellulärer Komponenten gestartet (ALNEMRI et al. 1996, SALVESEN u. DIXIT 1997, THORNBERRY u. LAZEBNIK 1998). Auf weitere Initiator-Caspasen (Caspase 8 und -10) und Effektor-Caspasen (Caspase 2 und -7) soll in diesem Zusammenhang nicht eingegangen werden, weil sie in der DON bezüglichen Literatur nahezu keine weitere Erwähnung finden.

Die anti-apoptotischen Signalwege (Syn. survival-pathway/Signalweg) stehen in Konkurrenz mit den Apoptose-Signalwegen. Von ihnen ist der anti-apoptotische AKT (Serin-/Threonin-Proteinkinase B) Signalweg der am besten erforschte (FRANKLIN u. MCCUBREY 2000, DOWNWARD 2004). AKT phosphoryliert das Bad-Protein, das sich daraufhin von der Mitochondrienmembran löst. Die Folge ist eine Hemmung der Cytochrom-c Freisetzung aus den Mitochondrien (DEL PESO et al. 1997, KENNEDY et al. 1999). Zudem fördert AKT die Phosphorylierung des „forkhead transcription factor“ (FKRH). FKRH hemmt im nicht-phosphorylierten Zustand die Transkription von Genen pro-apoptotischer Proteine. Des Weiteren wird die Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK3) durch AKT an der Phosphorylierung gehindert und so die Speicherung von Glukose in Form von Glykogen gefördert (CROSS et al. 1995). Dieser wenig erforschte Mechanismus wirkt sich wahrscheinlich ebenfalls positiv auf das Überleben der Zelle aus.

2.1.1.9 Einfluss von DON auf den Apoptose- und Survival-Signalweg

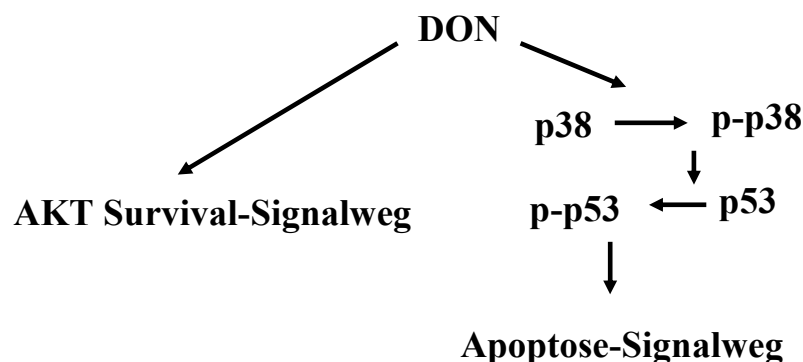


Abb. 2.5: Einfluss von DON auf den Apoptose- und AKT Survival-Signalweg (vgl. Abb. 2.4, S. 11)

Legende Abb. 2.5: AKT: Serin/Threonin Proteinkinase B, DON: Deoxynivalenol, p38: p38 mitogenaktivierte Proteinkinase, p-p38: phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase, p53: p53 mitogenaktivierte Proteinkinase, p-p53: phosphorylierte p53 mitogenaktivierte Proteinkinase

Versuche haben ergeben, dass DON den intrinsischen Apoptosesignalweg (vgl. Kap. 2.1.1.8, S. 10) via Phosphorylierung der p38- und der p53 MAP-Kinase induziert (s. Abb. 2.5, S. 12) (YANG et al. 2000, ZHOU et al. 2003b, 2005a). Hierbei stellt die p53 MAP-Kinase gewissermaßen ein Verbindungsglied zwischen der p38 MAP-Kinase und dem intrinsischen Signalweg dar. Sie wird erst nach der Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase aktiviert, jedoch zeitlich vor dem intrinsischen Apoptose-Signalweg. In vitro kann eine DON-induzierte und p38 MAP-Kinase vermittelte deutliche Aktivierung der Caspase 3 bereits nach 2 Stunden nachgewiesen werden (ZHOU et al. 2005a). Außerdem führt DON zu einer Aktivierung mehrerer Survival-Signalwege (z.B. AKT Survival-Signalweg) (ZHOU et al. 2005a).

2.1.1.10 Plazentarer Transfer von Deoxynivalenol und anderen Mykotoxinen

Die Auswirkungen der Fusarientoxine auf die Fertilität und eine mögliche plazentare Übertragung der Toxine von der Sau auf die Feten wurden vielfach diskutiert (COTE et al. 1984, SCHNURRBUSCH u. HEINZE 2002, HÖRÜGEL et al. 2003, ALM et al. 2006, DÄNICKE et al. 2007, TIEMANN u. DÄNICKE 2007).

DEBOUCK et al. (2001) konnten im Rahmen eines Tierversuches bei trächtigen Mäusen den plazentaren Transfer von DON von den Muttertieren auf die Feten nachweisen. Aus biologischer Sicht muss jedoch bedacht werden, dass Mäuse eine Plazenta hämochorialis besitzen, bei der es zu einem direkten Kontakt zwischen maternalem Blut und fetalem Chorion kommt, während Schweine zu den Spezies mit einer Plazenta epitheliochorialis gehören. Hierbei werden das maternale und das fetale Blut durch die Endothelzellen der maternalen und fetalen Gefäße, durch maternales und fetales Bindegewebe, durch das endometriale Epithel und das Chorionepithel sowie die dazugehörigen Basalmembranen getrennt. Dennoch konnten GOYARTS et al. (2007) an den Schweinen des eigenen Versuchsgutes nachweisen, dass signifikante Mengen an DON durch plazentaren Transfer von den Sauen auf die Feten übertragen werden. DON wurde im Urin, im Serum, in der Leber und den Nieren der Feten nachgewiesen (s. Anhang, Tab. 9.2, S. 96 u. Tab. 9.3, S. 97). Gegenwärtig existieren nur wenige exakte Daten über den plazentaren Transfer von Mykotoxinen. Es ist anzunehmen, dass der Transfer von Mykotoxinen vom Plazentatyp und vom Trächtigkeitzeitpunkt bzw. vom Ausbildungsgrad der Vaskularisierung abhängt. APPELGREN et al. (1982) verabreichten trächtigen Mäusen intravenös radioaktiv markiertes ZON und konnten dies in den Feten am 17. Trächtigkeitstag nachweisen, wohingegen am 8., 9. und 10. Trächtigkeitstag der Nachweis nicht möglich war. Folglich scheint die Vaskularisierung der Plazenta, die sich bei Nagetieren zwischen dem 10. und dem 11. Trächtigkeitstag entwickelt, für den plazentaren Transfer von Mykotoxinen vom Muttertier auf die Feten notwendig zu sein. Dementsprechend konnten BERNHOFT et al. (2001) nach einer intravenösen und intragastralen ZON-Applikation bei trächtigen Ratten das ZON und den Metaboliten α -Zearalenol in den Plazenten und Feten am 12. und 18. Trächtigkeitstag nachweisen.

2.1.2 Zearalenon

Weil im Versuchsfuttermittel ein kleiner Anteil Zearalenon (ZON) nachgewiesen werden konnte und eine DON-Kontamination häufig mit dem Mykotoxin ZON vergesellschaftet ist (vgl. Kap. 2.1.1.1, S. 3), soll im folgenden ein kurzer Überblick über ZON gegeben werden.

2.1.2.1 Vorkommen und allgemeine Wirkungsprinzipien

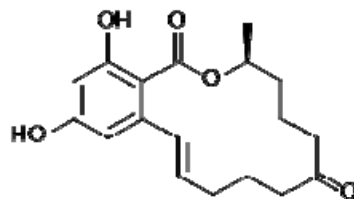


Abb. 2.6: Strukturformel des Zearalenons

Wie Deoxynivalenol werden auch das Mykotoxin ZON (Syn. F-2 Toxin) (CHRISTENSEN et al. 1965b) und seine Derivate - z.B. Zearalanon (ZAN), α -Zearalenol (α -ZOL), β -Zearalenol (β -ZOL), α -Zearalanol (α -ZAL), β -Zearalanol (β -ZAL) - ausschließlich von Feldpilzen der Gattung *Fusarium* gebildet, insbesondere von den Arten *F. roseum*, *F. culmorum* und *F. graminearum* (CHRISTENSEN et al. 1965a, GEDECK 1980). Zudem wird es von der perfekten Form *Gibberella zea* synthetisiert (STOB et al. 1962). STOB et al. (1962) konnten das Toxin erstmals auf Maispflanzen nachweisen. Aus diesem Grund hat der Terminus "Zearalenon" seinen Ursprung im griechischen/indianischen Namen für Mais (*zea/mays*). Später gelang der Toxinnachweis auch auf Gerste, Weizen und anderen Ährengetreiden (BECK et al. 1997b, OLDENBURG et al. 2000).

ZON, eine nicht-steroidale, organische Verbindung (s. Abb. 2.6) mit der Summenformel $C_{18}H_{22}O_5$, gehört zu den Makrolaktonen und wurde 1966 von URRY et al. (1966) als 6-(10-Hydroxy-6-oxo-trans-1-undecenyl)- β -Resorcylsäurelacton charakterisiert. Die Strukturformeln der ZONs ähneln entfernt der des körpereigenen Östrogens. Sie sind in der Lage, an die sonst hormonspezifischen Östrogenrezeptoren des Wirtsorganismus kompetitiv zu binden und durch den entstandenen Substrat-Rezeptor-Komplex eine, dem körpereigenen Östrogen entsprechende, biologische (z.B. Zellproliferation) und biochemische (z.B. Proteinsynthese) Wirkung auszulösen (KATZENELLENBOGEN et al. 1979, KIANG et al. 1978, UENO u. YAGASAKI 1975, BAUER et al. 1987).

2.1.2.2 Metabolismus und Wirkung im Tierkörper

Nach oraler Aufnahme werden die ZONs im Gastrointestinaltrakt resorbiert und in Darmmukosa und Leber durch die Enzyme 3α - und 3β -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase (3α -, 3β -HSD) zu den zum Teil stärker östrogen wirksamen Metaboliten α - und β -ZOL sowie α - und β -ZAL reduziert. Die Reduktionskapazität der Leber variiert in Abhängigkeit von der Tierspezies und wird beim Schwein als sehr hoch angegeben (OLSEN u. KIESSLING 1983, MALEKINEJAD et al. 2006). Das Verhältnis der entstehenden Metaboliten zueinander und der Exkretionsweg weisen

deutliche tierartliche Unterschiede auf (ZOLLNER et al. 2002, MALEKINEJAD et al. 2006). Beim Schwein stellt α -ZAL den Hauptmetaboliten dar, während Rinder und Hühner ZONs vorwiegend zu dem weniger östrogenwirksamen β -ZOL reduzieren (FARNWORTH u. TRENHOLM 1981, MIROCHA et al. 1981, BAUER et al. 1987, MINERVINI et al. 2001, MALEKINEJAD et al. 2006). Die Elimination der Metaboliten aus dem Tierkörper findet generell über Urin und Fäzes, bei Rind und Schwein bewiesenermaßen auch über die Milch statt (MIROCHA et al. 1981, FARNWORTH u. TRENHOLM 1983, MINERVINI et al. 2001). Bei Schweinen unterliegen vor allem die konjugierten Formen dem enterohepatischen Kreislauf, wodurch wiederum Metabolisierungsschritte (Dekonjugation und Reduzierung) ermöglicht werden und sich die Halbwertszeit im Tierkörper deutlich verlängert (BIEHL et al. 1993).

Zu typischen klinischen Symptomen, die allgemein unter dem Terminus „Hyperöstrogenismus“ zusammengefasst werden, zählen bei prämaternen weiblichen Schweinen, in Abhängigkeit von der Toxinkonzentration und der Expositionsdauer, unter anderem Schwellung und Rötung der Vulva, Vaginalprolaps, Änderungen in der Funktionsmorphologie der Ovarien sowie Störungen im Pubertätseintritt. Pathologisch-anatomisch machen sich im Ovar vor allem eine erhöhte Follikelanzahl sowie das Auftreten von Follikelzysten bemerkbar; im Uterus tritt ein erhöhtes Organgewicht auf. Sauen weisen vor allem Störungen in der Reproduktionsleistung auf. Klinisch sichtbare Symptome an den äußeren Genitalien treten eher selten auf. Bei den hier aufgeführten Befunden handelt es sich teilweise um reversible Veränderungen: dem Alter und/oder Zyklusstand entsprechende Normalbefunde können in der Regel zwei bis drei Wochen nach Unterbindung der Toxinexposition erhoben werden (EDWARDS et al. 1987a u.b).

2.2 Hämatopoese bei Schweinefeten

2.2.1 Phasen der Hämatopoese in der intrauterinen Entwicklung

Während der intrauterinen Entwicklung laufen drei verschiedene Phasen der Blutbildung ab (KOVARU et al. 1977, RÜSSE 1991, SINKORA u. BUTLER 2009):

Mesoblastische Blutbildung: Hierbei werden die ersten korpuskulären Blutbestandteile vom 17. bis zum 24-27. Trächtigkeitstag in den Blutinseln der Dottersackwand gebildet.

Hepato-Lienale Blutbildung: Ab dem 20. Trächtigkeitstag kann hämatopoetische Aktivität in der Leber beobachtet werden. Sie stellt bis zum 45. Trächtigkeitstag den Hauptort der Blutbildung dar. In der Milz entstehen die ersten Blutzellen etwas später als in der Leber, insgesamt kommt der Milz in dieser Hinsicht eine geringere Bedeutung zu. Die Blutbildung in Leber und Milz nimmt nach dem Beginn der hämatopoetischen Aktivität des Knochenmarks allmählich ab und kommt mit der Geburt zum Erliegen (ZIETZSCHMANN u. KRÖLLING 1955). Lediglich unter pathologischen Bedingungen kann es postnatal zu einer hämatopoetischen Aktivität in der Leber kommen.

Medulläre Blutbildung: Nachdem die knorpeligen Strukturen zu Knochen umgebildet worden sind, beginnt ab dem 40. Trächtigkeitstag die hämatopoetische Aktivität des Knochenmarks, die zeitlebens erhalten bleibt.

2.2.2 Allgemeine Charakteristika der Hämatopoese

Ausgangszellen für Vorläuferzellen (Blasten) sämtlicher Zellpopulationen sind nicht determinierte, pluripotente Stammzellen (LIEBICH 2010a). Die Entwicklung der einzelnen Zellpopulationen beschreibt LIEBICH (2010a) wie folgt:

Erythropoese: Die Erythrozyten reifen über die Stadien der Proerythroblasten, Makroblasten und Normoblasten zu den durch E nukleation schließlich kernlosen Retikulozyten heran.

Granulopoese: Nach mehrfacher Teilung stellen die Myeloblasten die gemeinsamen Vorläuferzellen für sämtliche Granulozyten dar. Durch Teilung entwickeln sich Promyelozyten und schließlich neutrophile, eosinophile oder basophile Myelozyten. Hieraus entwickeln sich durch eine letzte Teilung die jeweiligen Metamyelozyten, aus denen durch Reifung polymorphkernige neutrophile, eosinophile oder basophile Granulozyten entstehen.

Lymphopoese: Die Vorläuferzellen der Lymphozyten tragen bereits eine Determination zu den späteren T- bzw. B-Lymphozyten auf ihrer Oberfläche (T- und B-Immunoblasten). Sie erhalten den entscheidenden Schritt zur reifen immunkompetenten Zelle entweder im Thymus (T-Lymphozyt) oder in der Milz, den Lymphknoten, den Peyer-Platten oder in den Mandeln (B-Lymphozyt).

Monopoese: Aus den Monoblasten bilden sich Promonozyten, die innerhalb weniger Tage zu Monozyten reifen.

Thrombopoese: Aus den Megakaryoblasten entwickeln sich durch Teilung Promegakaryozyten und durch nochmaliges Teilen Megakaryozyten. Diese reifen schließlich zu differenzierten Megakaryozyten heran und bilden durch Abschnürung von Zytoplasmaanteilen die Blutplättchen.

2.2.3 T-Lymphozyten

2.2.3.1 T-Zell-Lymphopoese in Schweinefeten

Die ersten T-Zell-Vorläufer werden in der fetalen Leber produziert und gelangen mit dem Blut in den Thymus, wo sie ab dem 38. Trächtigkeitstag nachgewiesen werden können (vgl. Abb. 2.7, S. 18). Hier beginnen sie zwischen dem 40. und dem 50. Trächtigkeitstag mit der Expression des CD3- Moleküls (CD steht für cluster of differentiation (BERNARD u. BOUMSELL 1984a u. b)). Die Leber selbst stellt bis zum 45. Trächtigkeitstag den Hauptort der Lymphopoese dar. Aufgrund des Wechsels des primären Hämatopoese-Ortes von der fetalen Leber zum Knochenmark sinkt die Anzahl der T-Zell-Vorläufer im Thymus zwischen dem 55. und 65. Trächtigkeitstag zeitweise ab (SINKORA et al. 1998, 2000, 2002a).

2.2.3.2 Histologischer Nachweis von T-Lymphozyten in porzinem Gewebe

Die T-Zellen des Schweins definieren sich, wie auch bei anderen Spezies, durch die Expression von CD3-Molekülen (PESCOVITZ et al. 1998), welche zugleich den potentesten T-Zell-Marker darstellen (SAALMÜLLER u. BRYANT 1994). Im Rahmen mehrerer Studien wurden aus der

Humanmedizin stammende CD3-Marker erfolgreich für die Immunhistologie und die Immunfluoreszenz an porcinem Gewebe eingesetzt, da diese eine hohe Kreuzreaktivität aufweisen (MASON et al. 1989, PILOZZI et al. 1998, TANIMOTO u. OHTSUKI 1998, VO et al. 2004, DIMOVA et al. 2007). Die zytoplasmatischen und transmembranen Anteile des porcinen CD3-Moleküls zeigen eine 100 %ige und die extrazellulären eine 65 %ige Homologie zum humanen CD3-Molekül (KIRKHAM et al. 1996).

Das CD3-Molekül besteht aus mindestens vier verschiedenen Komponenten (γ , δ , ϵ , und ζ) mit einer Molekülmasse von 20 bis 28 kDa. Man nimmt an, dass die CD3-Komponenten die Signaltransduktion bei der Erkennung eines Antigens durch den T-Zell-Rezeptor vermitteln (JACOBS 1997). Exprimiert wird CD3 unter anderem durch T-Zellen in Thymus, Knochenmark, in peripheren lymphatischen Geweben und im Blut (CAMPANA et al. 1987, TUNNACLIFFE et al. 1989). Die einzigen anderen Zellen von denen eine positive Reaktion bekannt ist, sind die Purkinje-Zellen im Kleinhirn (GARSON et al. 1982). Das Auftreten des CD3-Antigens in frühen Thymozyten ist vermutlich eines der ersten Anzeichen einer Festlegung auf die T-Zell-Reihe. Bei unreifen Thymozyten ist die CD3-Expression ausschließlich zytoplasmatisch, während eine membranassoziierte Expression des Markers erst im Rahmen der Zellreifung auftritt (CAMPANA et al. 1987).

Mittels CD4- und CD8-Markern besteht die Möglichkeit, den Großteil der CD3-positiven T-Zellen weiter zu unterteilen in T-Helferzellen (CD4-positiv) und in zytotoxische T-Zellen/Suppressorzellen (CD8-positiv) sowie den beim Schwein häufigen Dual-Expressoren (CD4- u. CD8-positiv) (LUNNEY u. PESCOVITZ 1987, CHARERNTANTANAKUL u. ROTH 2006). Jedoch sind diese nur an Gefrierschnitten vollständig nachweisbar (KAEOKET et al. 2003), während sie an Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Gewebeproben, wie sie auch im Rahmen dieser Studie zur Verwendung kamen, keine aussagekräftigen Ergebnisse liefern (JONJIC et al. 1987).

2.2.4 B-Lymphozyten

2.2.4.1 B-Zell-Lymphopoese in Schweinefeten

Die B-Zell-Lymphopoese (vgl. Abb. 2.7, S. 18) lässt sich beim Schwein, in Abhängigkeit von der embryonalen bzw. fetalen Entwicklungsphase, in verschiedenen Organen nachweisen. Ab dem 20. Trächtigkeitstag übernimmt der Dottersack diese Aufgabe zu 100 %. Ab dem 30. Trächtigkeitstag wird diese Aufgabe schließlich zu 90 % von der fetalen Leber übernommen, die auch, bis zur Aktivierung des Knochenmarks am 45. Trächtigkeitstag, das wichtigste Organ im Rahmen der B-Zell-Lymphopoese darzustellen scheint. Die B-Zell-Lymphopoese kann mit abnehmender Intensität bis zur Geburt in der Leber nachgewiesen werden. B-Lymphozyten sind bereits 5 bis 18 Tage vor den T-Zellen nachweisbar und stellen somit die frühesten Lymphozyten und bis zum 55. Trächtigkeitstag auch die dominierende Lymphozytenart dar. Später stehen die T-Lymphozyten im Mittelpunkt (SINKORA et al. 1998, 2000, 2002b, 2003, 2005).

2.2.4.2 Histologischer Nachweis von B-Lymphozyten in porzinem Gewebe

CD79a ist ein für die immunhistologische/immunfluoreszenzmikroskopische Anwendung bestimmter Antikörper zur Identifizierung von B-Lymphozyten bzw. der von diesen ausgehenden Neoplasien (MASON et al. 1991, NAKAMURA et al. 1996, CHUANG u. LI 1997). Markiert wird das Transmembran-Heterodimer CD79 mit einer Molekülmasse von 84 kDa. Es gehört zur Superfamilie der Immunglobuline und setzt sich aus den beiden Glykoproteinen CD79 α und CD79 β zusammen (VAN NOESEL et al. 1990). CD79 ist für eine effiziente Oberflächenexpression des B-Zell-Rezeptors, der für die Antigenerkennung notwendig ist, sowie für die Signalübertragung ins Zytoplasma unerlässlich (RETH 1992). Bereits in B-Zell-Vorläufern werden CD79-Proteinketten im Zytoplasma exprimiert. Die Oberflächenexpression beginnt während der darauf folgenden Pro-B-Zell-Phase und dauert während der gesamten B-Zell-Differenzierung an (KOYAMA et al. 1997).

Eine weitere Nachweismöglichkeit für porzine B-Lymphozyten bieten die Antikörper CD79b, CDw75 und IgM (KADOTA u. NAKAJIMA 1988, TANIMOTO et al. 1994, TANIMOTO u. OHTSUKI 1998).

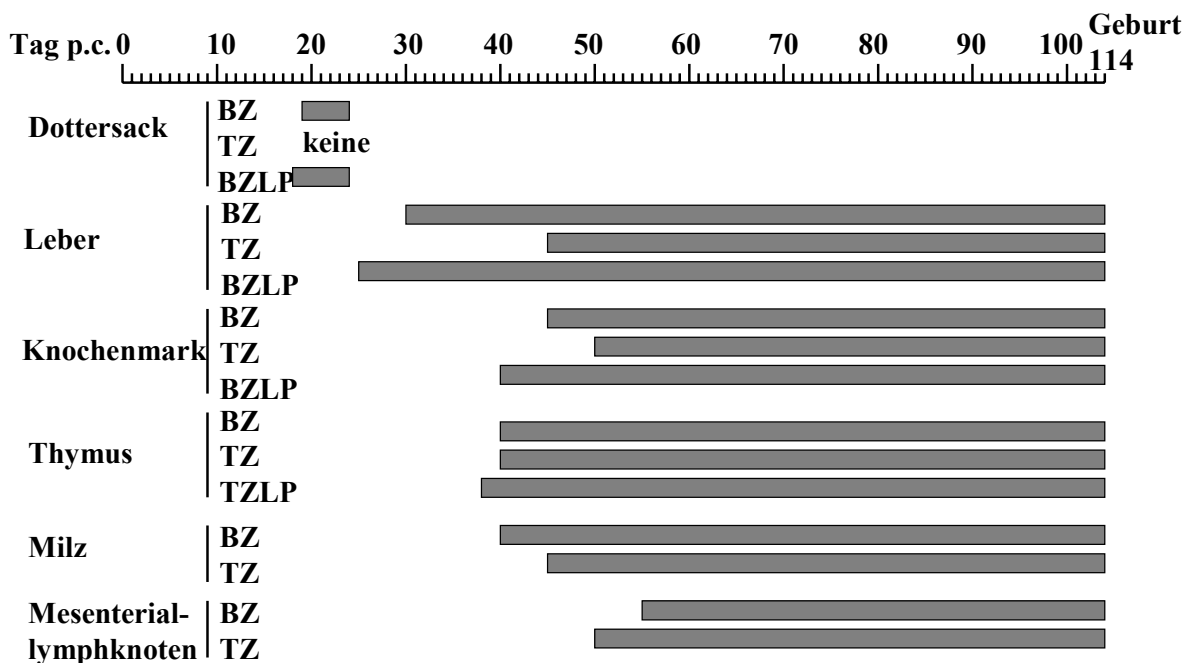


Abb. 2.7: Schematische Darstellung des Vorkommens von Lymphozyten in primären und sekundären porzinen lymphatischen Geweben während der fetalen Entwicklung (modifiziert nach SINKORA et al. 2005)

Legende zur Abb. 2.7: BZ: B-Zellen, BZLP: B-Zell-Lymphopoese, p.c.: post conceptionem, TZ: T-Zellen, TZLP: T-Zell-Lymphopoese

2.2.5 Monozyten

2.2.5.1 Monopoese

Während sich die meisten Forschungsarbeiten über das porcine Immunsystem mit den Lymphozyten befassen, ist über Monozyten bzw. Makrophagen verhältnismäßig wenig bekannt. Im Dottersack sind keine Zellen mit einer für Makrophagen typischen Morphologie nachweisbar. In der Leber hingegen treten solche Zellen bereits ab dem 25. Trächtigkeitstag auf. Vollständig funktionsfähige Makrophagen können in Leber und Milz ab dem 57. Trächtigkeitstag beobachtet werden, Kupfferzellen in der Leber ab dem 40.. Im Blut lassen sich die ersten Monozyten ab dem 30. Trächtigkeitstag nachweisen (REHAKOVA et al. 1998).

2.2.5.2 Histologische Nachweismöglichkeiten der Monozyten in porzinem Gewebe mittels „Myeloid/Histiocyte“-Antigen 387 (MAC 387) sowie mit Lysozym

Das „Myeloid/Histiocyte“-Antigen ist ein Kalzium-bindendes Molekül, das vorwiegend aus unterschiedlichen Polypeptidketten besteht, die sich zu einem Proteinkomplex mit einer relativen Molekülmasse von ca. 36,5 kDa zusammenschließen. Der sich ergebende Komplex gehört zur S-100-Proteinfamilie (FAGERHOL 1996; SCHAFER u. HEIZMANN 1996). Das Antigen wird von einer Vielzahl von Gewebesthiozyten exprimiert, so z.B. von infiltrierenden und reaktiven Histiocyten, von Alveolarmakrophagen, Kupfferschen Sternzellen, Sinushistiocyten, Follikelzentrums-Makrophagen, von Makrophagen der roten Milzpulpa, Epitheloidzellen, von vielen eosinophilen Granulozyten und Riesenzellen sowie von zirkulierenden neutrophilen Granulozyten und Monozyten (DALE et al. 1985, FLAVELL et al. 1987, BRANDTZAEG et al. 1987). Lysozym ist eine Muramidase, die Murein spaltet, das den Hauptbestandteil der Zellwand - vor allem von grampositiven Bakterien - bildet (PRIES u. ZAKREWICZ 2005). Lysozym wird unter anderem von diversen Phagen zur Abwehr gegen Bakterien gebildet. Mittels Lysozym-detektierender Antikörper können myeloische Zellen, Monozyten, Histiocyten und Granulozyten immunhistologisch dargestellt werden (KRUGLIAK et al. 1986). Der bei Schweinen kreuzreagierende Antikörper wird in der humanen Tumordiagnostik zur Identifikation monozytärer bzw. myeloischer Leukämien eingesetzt.

2.3 Histologischer Nachweis proliferierender Zellen in porzinem Gewebe mittels dem Ki-67 Antigen bzw. dem Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)

Das humane Ki-67 Antigen besteht aus zwei relativ großen Peptiden mit einem Molekulargewicht von 345 bzw. 395 kDa (GERDES et al. 1991) und wird auf allen proliferierenden Zellen in allen aktiven Zyklusphasen (G1, S, G2, M) exprimiert (GERDES et al. 1984), nicht aber bei Zellen in der G0-Ruhephase sowie bei der DNA-Reparatur (HALL 1993). Nach der Mitose fällt die Antigen-Konzentration rapide ab (SCHOLZEN u. GERDES 2000). Die genaue Funktion des Ki-67 Antigens ist jedoch unklar. SAWHNEY u. HALL (1992) vermuten eine Beteiligung an der Aufrechterhaltung der höheren Strukturordnung der DNA während der wichtigsten Mitosevorgänge. FALINI et al. (1989) konnten nachweisen, dass das Ki-67 Antigen in vielen verschiedenen proliferierenden normalen und neoplastischen Geweben aktiviert wird.

Bei der Beurteilung der proliferativen Aktivität der Gewebe anhand der Expression des Ki-67 Antigens ist zu beachten, dass die Ermittlung der Häufigkeit der Antigen-exprimierenden Zellen innerhalb eines Gewebes nur Aufschluss über den Proliferationszustand gibt, nicht jedoch über die Proliferationsrate (die Anzahl der sich teilenden Zellen pro Zeiteinheit) (HALL 1993). Die Reaktivität des Antikörpers an porzinem Gewebe ist gegeben (LESSER 2008).

Das Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), das ursprünglich als ein Cyclin definiert worden ist, ist ein gewebeunspezifisches, nukleäres, zellzyklusassoziiertes Protein. Es nimmt eine zentrale Rolle im Rahmen des Zellzyklus ein, speziell in der DNA-Synthese und Reparatur, und wird in sämtlichen Stadien der Zellteilung exprimiert (RANKIN et al. 2004). Inaktive, ruhende Zellen exprimieren PCNA nicht (MOORE et al. 1987, KURKI et al. 1988). Mittels Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie konnte eine erhöhte PCNA-Expression während der späten G1- und der frühen S-Phase der Zellteilung nachgewiesen werden (KURKI et al. 1986, MOORE et al. 1987). In Bezug auf die Einzelzelle können mittels Immunhistologie keine quantitativen Aussagen über das PCNA getroffen werden, da die Färbeintensität des einzelnen Nukleus nicht sicher mit der tatsächlich vorliegenden Proteinkonzentration korreliert (RANKIN et al. 2004). Ein sicheres Ansprechen des genauen Stadiums des Zellzyklus und der Mitoserate (die Anzahl Mitosen pro Zeiteinheit) ist mittels PCNA nicht möglich. Die Reaktivität des Antikörpers an porzinem Gewebe ist gegeben (MIYAZAWA et al. 2006).

2.4 Nachweismöglichkeiten der Apoptose an porzinem Gewebe

2.4.1 Histomorphologischer Nachweis der Apoptose

Die vom Untersuchungsaufwand her einfachste Möglichkeit, die Apoptose nachzuweisen, ist die histomorphologische Darstellung der Schrumpfnekrose, des morphologischen Korrelats eines programmierten Zelltods. Die sterbenden Zellen schrumpfen und zerfallen „explosionsartig“ in mehrere kleine Teilchen, die sogenannten Apoptosekörper, die histologisch nachgewiesen werden können (RIEDE et al. 2009).

2.4.2 Immunhistologischer bzw. Immunfluoreszenz-Nachweis der an der Apoptose beteiligten Enzyme (p-p38 u. p-53 MAP-Kinase, Cytochrom, Bad, Bax, Caspase 9 u. 3)

Alle im folgenden aufgeführten Antikörper können sowohl in der Immunhistologie als auch in der Immunfluoreszenzmikroskopie angewendet werden.

p-p38 MAP-Kinase

Hierbei handelt es sich um Antikörper, die sich gegen die aktivierte, d.h. phosphorylierte Form der humanen p38 MAP-Kinase richtet (vgl. Kap. 2.1.1.9, S. 12). Diese Proteinkinase mit einem Molekulargewicht von 42 kDa (RAINGEAUD et al. 1995) kann im Zytoplasma und im Nukleus nachgewiesen werden (RAINGEAUD et al. 1995). Sie ist in die Proliferation und Differenzierung diverser Leukozyten involviert (vgl. Kap. 2.1.1.6, S. 9). In diesem Zusammenhang

werden unter anderem auch Megakaryozyten in der Literatur erwähnt (RACKE et al. 1997, FICHELSON et al. 1999, ROJNUCKARIN et al. 1999). Die entsprechenden Gene der MAP-Kinase bei Menschen und Schweinen besitzen eine bis zu 81 %ige Sequenzhomologie, so dass von einer erfolgreichen Anwendung an porzinem Gewebe auszugehen ist.

p-p53 MAP-Kinase

Hierbei handelt es sich um Antikörper, die sich gegen die aktivierte, d.h. phosphorylierte Form der humanen p53 MAP-Kinase richtet (vgl. Kap. 2.1.1.9, S. 12), einem Tumorsupressorprotein, das nach DNA-Schäden als Transkriptionsfaktor (Modulator) die Expression von Genen reguliert, die an der Induktion der Apoptose, der DNA-Reparatur oder an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sind. Seinen Namen erhielt es aufgrund der scheinbaren Molekülmasse von 53 kDa (VOJTESEK et al.1992, PLUQUET u. HAINAUT 2001, HOFSETH et al. 2004). In der Regel kommen p53 Antikörper in der humanen Tumordiagnostik (zum Nachweis einer p53 Akkumulation) zur Anwendung (RAMAEL et al. 1992, NIEDER et al. 2001). Die entsprechenden Gene der MAP-Kinase bei Menschen und Schweinen besitzen eine bis zu 88 %ige Sequenzhomologie, so dass von einer erfolgreichen Anwendung an porzinem Gewebe auszugehen ist.

Cytochrom c, Bad und Bax

Antikörper gegen humanes Cytochrom c, gegen Bad und Bax (vgl. Kap. 2.1.1.8, S. 10) sind im Handel erhältlich, jedoch geht aus der mir zugänglichen Literatur nicht hervor, ob ihre Lokalisation (Mitochondrium oder Zytoplasma), die für den Apoptosenachweis von Bedeutung ist, mittels immunhistologischer Methoden genauer verifiziert werden kann und ob eine Kreuzreaktivität mit dem Schwein besteht.

Caspase 3

Caspase 3 (vgl. Kap. 2.1.1.8, S. 10), auch bezeichnet als Apopain bzw. CPP32, ist eine Aspartat-spezifische Cystein-Protease, die zur ICE-Unterfamilie („interleucine-converting-enzyme“) der Caspasen gehört (SCHLEGEL et al. 1996) und sich aus zwei Untereinheiten mit einem relativen Molekulargewicht von 17 kDa bzw. 12 kDa zusammensetzt (NICHOLSON et al. 1995). Das Caspase 3-Proenzym wird durch die Initiator-Caspasen im Bereich Asp28 (Aspartat) und Asp175 gespalten, wodurch aus der großen (p17) und der kleinen (p12) Untereinheit ein aktives Heterotetramer gebildet wird. Obwohl der Vorläufer der Caspase 3 im Zytoplasma lokalisiert ist, kommt der Caspase 3 nach ihrer Translokation in den Kern eine essentielle Rolle bei den Kernveränderungen apoptotischer Zellen zu (WOO et al. 1998, ZHENG et al. 1998, KAMADA et al. 2005). Eine positive immunhistologische Reaktion konnte beim Menschen in zahlreichen Zelltypen (unter anderem in den Hepatozyten, den Enterozyten und den Zellen des Immunsystems) in variierender Intensität nachgewiesen werden (KRAJEWSKA et al. 1997). Caspase 3-Antikörper sind an porzinem Gewebe bereits erfolgreich angewendet worden (MARCACCINI et al. 2006).

Caspase 9

Die Caspase 9 (vgl. Kap. 2.1.1.8, S. 10) ist, wie auch die Caspase 3, eine Cystein-Protease (s.o.) mit einem Molekulargewicht von 45,8 kDa (DUAN et al. 1996). Sie wird auch als Apaf-3 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor) bezeichnet. Hauptsächlich ist sie im mitochondrialen Intermembranspalt lokalisiert, kann jedoch auch, je nach Phase der Apoptose, im Zytoplasma und im Nukleus vorgefunden werden (KRAJEWSKI et al. 1999, COSTANTINI et al. 2002, DI BARTOLOMEO u. CECCONI 2006). Während der Apoptose erhöht sich die Permeabilität der mitochondrialen Membran erheblich (GREEN u. REED 1998), so dass es zu einem Austritt von Intermembranbestandteilen (wie Cytochrom c und Caspase 9) in das Zytoplasma kommt (SUSIN et al. 1999). Die Folge ist die Bildung eines Komplexes aus Caspase 9, Cytochrom c und Apaf-1. Dieser Komplex führt zur Aktivierung der Caspase 3 (vgl. Kap. 2.1.1.8, S. 10) (LIU et al. 1996, LI et al. 1997a). Caspase 9-Antikörper sind an porzinem Gewebe mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bereits erfolgreich angewendet worden (LEE et al. 2009).

2.4.3 TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)

Diese Methode ist ein empfindliches Verfahren um apoptotische Zellen im Gewebe darzustellen, wobei „TdT“ für „terminal deoxynucleotidyl transferase“ steht, einem Enzym, das in einem Zwischenschritt verwendet wird. Die Methode wurde 1992 erstmals durch GAVRIELI et al. beschrieben. Im Rahmen der Apoptose wird der DNA-Strang des Zellkerns durch Endonukleasen fragmentiert. An den Bruchstellen freiwerdende Hydroxylgruppen werden durch das Enzym TdT mit markierten Nukleotiden verbunden, die z.B. mittels Immunreaktionen (Immunfluoreszenz oder Immunhistologie) oder elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden können. Anfänglich wurde diese Methode kritisiert, weil eine Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose nur bedingt möglich war (GRASL-KRAUPP et al. 1995). Sie wurde jedoch in den folgenden Jahren modifiziert, so dass eine Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose möglich wurde (NEGOESCU et al. 1996, LABAT-MOLEUR 1998). Die Methode ist an porzinem Gewebe bereits erfolgreich angewendet worden (MATISE et al. 2000, SATO et al. 2000, PRANGE-KIEL et al. 2001)

2.5 Histologischer Nachweis des Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) an porzinem Gewebe

TNF- α (vgl. Kap. 2.1.1.7, S. 9), auch bezeichnet als Kachektin, ist ein relativ kleiner multifunktionaler Signalstoff (Zytokin) des Immunsystems mit einem Molekulargewicht von 17 kDa, der von verschiedenen Zellen wie z.B. Lymphozyten, natürlichen Killerzellen, epithelialen Zellen, Mastzellen und neutrophilen Granulozyten, vor allem aber von Makrophagen produziert wird (AGGARWAL et al. 1985, NEDWIN et al. 1985, VILCEK u. LEE 1991, DE TOGNI et al. 1994). Auch Megakaryoblasten/-zyten produzieren TNF α , um ihr eigenes Wachstum und ihre Differenzierung autokrin zu steuern bzw. die Replikation und Funktion anderer hämatopoetischer Zellen zu steuern (AVRAHAM et al. 1992, SANDROCK et al. 1996). Lipopolysaccharide sind die potentesten Auslöser der TNF- α -Produktion in Monozyten. Seinen Namen

erhielt der TNF- α wegen seiner direkten toxischen Effekte auf Tumorzellen und der daraus resultierenden Stimulation der antitumorösen Immunreaktion. Seine wichtigste Funktion ist, die Aktivität verschiedener Immunzellen zu regeln. TNF- α kann den Zelltod (Apoptose), die Zellproliferation, die Zelldifferenzierung und die Ausschüttung anderer Zytokine anregen. Er ist unter anderem ein wirksamer Aktivator der neutrophilen Granulozyten, vermittelt Adhärenz, bewirkt Degranulation, Chemotaxis und „respiratory burst“ (BEUTLER u. CERAMI 1989, BORISH u. STEINKE 2003). Humane Antikörper zur Detektion des TNF- α sind an porzinem Gewebe bereits mittels immunhistologischer Untersuchungsverfahren erfolgreich angewendet worden (DEL MORAL et al. 1999).

2.6 Embryonale/Fetale Entwicklung des Schweins unter besonderer Berücksichtigung des 70. Trächtigkeitstages (= Tag der Euthanasie in der eigenen Versuchsanordnung)

Die 114 Tage andauernde Trächtigkeit der Schweine kann in drei biologisch relevante Phasen unterteilt werden:

- 1. Phase (Tag 0 bis 35):** Die Phase beginnt mit der Konzeption und endet mit der beginnenden Kalzifizierung des Skelettsystems. Mit Abschluss dieser Phase sind alle wichtigen Organsysteme bereits angelegt und erkennbar (Organogenese) (BUTLER et al. 2009), wobei die Leber zu dieser Zeit auf Grund ihrer hämatopoetischen Aktivität verhältnismäßig groß erscheint. Dieses erste Trächtigkeitsdrittel lässt sich auf Grund der Morphogenese weiter unterteilen in die Blastogenese (Tag 0-12), die bis zur Ausbildung einer zweischichtigen Keimscheibe andauert, und die Embryogenese (Tag 12-35), die mit der Organogenese abschließt (SINKORA u. BUTLER 2009).
- 2. Phase (Tag 35 bis 70):** Die Wachstumsrate der Frucht und die Ausdifferenzierung vieler Organe beschleunigt sich während dieses zweiten Drittels der Trächtigkeit erheblich (KNIGHT et al. 1977, WU et al. 1999, POND 2001). Hierbei spielen zahlreiche Einflussfaktoren, wie z.B. die Ernährung und die Genetik, eine Rolle (ANTHONY et al. 1995, ALLEN 2001, FALL et al. 2003). Bis zum 55. Trächtigkeitstag verläuft das Wachstum allometrisch, danach bis zur Geburt vorrangig isometrisch (SINKORA u. BUTLER 2009). Die Phase endet mit der Entwicklung des angeborenen bzw. unspezifischen Immunsystems, das die ersten Reaktionen auf einzelne Antigene erlaubt. Der Zeitraum des 2. und 3. Trimesters wird auch als Fetalperiode bezeichnet.
- 3. Phase (Tag 70-114):** Innerhalb dieser durch weiteres isometrisches Wachstum geprägten Phase entwickelt sich das adaptive bzw. das erworbene Immunsystem. Sie endet mit der Geburt (BUTLER et al. 2009).

2.6.1 Lymphknoten

2.6.1.1 Fetale Entwicklung der Lymphknoten

Kurz nach dem Auftreten der Kardinalvenen, etwa am 20. Tag post conceptionem (p.c.), entwickeln sich beim Schwein Lymphkapillaren, aus denen nacheinander 6 Lymphsäcke hervorgehen. Aus diesen Lymphsäcken sprießen ca. zwischen dem 30. und 32. Trächtigkeitstag Lymphgefäße, die alle Organe versorgen und während der frühen Fetalperiode die Lymphknoten bilden. Hierbei umschließen die Lymphgefäße Mesenchymgewebe, das zum retikulären Gewebe wird. Korbartige Lymphgefäßgeflechte erweitern sich zu den Sinus. Kapsel und Trabekelsystem bilden sich aus der mesenchymalen Umhüllung. Die Mesenteriallymphknoten sind am 55. Tag p.c. vollständig angelegt (RÜSSE 1991, SINKORA u. BUTLER 2009).

2.6.1.2 Morphologische Charakterisierung der Lymphknoten

Nach der allgemeinen Lehrmeinung liegt bei den Schweinelymphknoten aufgrund des spezifischen Verhalten der zu- und abführenden Lymphgefäße eine Umkehr von Rinde und Mark vor (VOLLMERHAUS 1984). Dieser für Schweine und einige andere Säugetiere (Elefanten, Delphine und Nashörner) (CAVE u. AUMONIER 1962, MOSKOV et al. 1968) charakteristische inverse Aufbau der Lymphknoten wurde erstmals durch CHIEVITZ (1881) beschrieben. Im Gegensatz zur allgemeinen Meinung konnten ANDERSON (1972) und andere Autoren keine gravierenden Unterschiede zwischen den Lymphknoten des Schweins und denen anderer Säugetierspezies nachweisen. In späteren Untersuchungen wurde jedoch belegt, dass die gegensätzlichen Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen aus der Wahl der Schnittebenen resultierten (HOSHI et al. 1986). Etwa am 70. Trächtigkeitstag entsprechen große Teile der Lymphknoten des porzinen Fetus aus histologischer Sicht bereits dem Bild adulter Tiere (SABIN 1905). Die Lymphknoten sind z.T. bereits von einer Kapsel umgeben, von der schmale Bindegewebssepten (Trabekel) in die Tiefe des Organs zu ziehen beginnen und das architektonische Gerüst des lymphoretikulären Gewebes bilden (SABIN 1905; LIEBICH 2010b). Histologisch existieren beim Schwein zwei Hilus-Typen. Einzelne (1 bis 4 pro Lymphknoten beim adulten Tier) vom afferenten Typ („A-type hilus“), in die die afferenten Lymphgefäße über die Sinus in den Lymphknoten eintreten, und mehrere vom efferenten Typ („E-type hilus“). Aus diesen, über die konvexe Oberfläche diffus verteilten, Hili, verlassen die efferenten Lymphgefäße den Lymphknoten. Das Parenchym lässt sich in zwei Gewebearten unterteilen: in das dichtere Lymphozyten-reichere „Cortex like tissue“ mit seinen germinativen Zentren, die am 70. Tag noch nicht vollständig entwickelt sind und in den Parakortex. In diesem befinden sich, diffus verteilt, mehrere eosinophile Granulozyten. Das aufgelockerte „medulla like tissue“ befindet sich in den peripheren Bereichen um die E-type hilus und ist mit zahlreichen so genannten Lymphgefäß-Plexus durchsetzt (SABIN 1905, TRAUTMANN u. FIEBIGER 1949, HUNT 1968, CALHOUN u. SMITH 1970, BINNS 1973, BINNS 1982, HOSHI et al. 1986, SPALDING u. HEATH 1987). Es ist zu beachten, dass zwischen den Lymphknoten verschiedener Körperlokalisationen geringgradige histologische Unterschiede bestehen können (RICHTER 1902).

2.6.2 Thymus

2.6.2.1 Fetale Entwicklung des Thymus

Der Thymus entwickelt sich aus den ventralen Abschnitten der 3. und 4. Schlundtasche und ist damit vorwiegend entodermaler Abstammung, wobei beim Schwein davon ausgegangen wird, dass auch ektodermale Anteile aus den Halszysten beteiligt sind (RÜSSE 1991). Die blind-sackartigen Ausstülpungen der Schlundtaschen bilden den Ductus pharyngobrachialis. Dieser verodet und wird nach dem Verlust seines Lumens zum Thymusstrang. Nach der Aussprossung von Epithelsträngen und der Einwanderung von Bindegewebe sowie von Gefäßen beginnen die Thymozyten aus hämatopoetischen Organen (Leber, Milz, später Knochenmark) einzuwandern. Sie lagern sich in der Rinde ab und verleihen dieser eine dunkle Färbung (RÜSSE 1991, LIEBICH 2010b). SINKORA et al. (2000) konnten am Ende des ersten Trimesters der Trächtigkeit (38. Tag p.c.) die ersten Leukozyten im Thymus nachweisen. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um frühe Thymozytenvorläufer. Die Anlage des Thymus ist an Tag 36. p.c. vollständig abgeschlossen (SINKORA u. BUTLER 2009) und ab dem 70. bis 80. Tag p.c. ist das Organ vollständig ausgebildet (BELL 1905, KRUML et al. 1970b).

2.6.2.2 Morphologische Charakterisierung des Thymus

Der Schweinethymus ist ein primäres lymphatisches Organ, das sich von der Schädelbasis über die ventrale Halsseite bis zur Vorderseite des Herzbeutels erstreckt und ca. ab dem 70. Trächtigkeitstag eine lobuläre Struktur aufweist (KOVARU et al. 1977, WAIBL 1982). Die paarigen Halsschenkel liegen lateral und ventral an der Schilddrüse an (ERNSTMAYER 1962). Der Brustthymus liegt als platter, drüsiger Körper mit scharfen Rändern im präkardialen Mediastinum (BLIN u. PONTOIS 1972). Hals und Brustteil verschmelzen ca. zwischen dem 70. und 80. Trächtigkeitstag (bei einer mittleren SSL von 200 mm) (BADERTSCHER 1915a). Eine bindegewebige Kapsel umhüllt den Thymus und gibt zarte Septen in die Tiefe ab, die die Läppchen nur unvollständig trennen (WAIBL 1982). Histologisch wird an den Läppchen 70 Tage alter Feten zwischen einer äußeren, dichten, zellreichen Rindenzone (Kortex), die hauptsächlich Lymphozyten enthält, und einer inneren, hellen, zellärmeren Markzone (Medulla), die mehrere Lymphoblasten mit großen hellen bis dunklen Zellkernen enthält, unterschieden. Der Kortex wird durch epitheliale Retikulumzellen in zahlreiche Mikrokompartimente unterteilt, in denen sich die Lymphozyten befinden. Daneben befinden sich mehrere Blutgefäße. Die Medulla ist vornehmlich aus epithelialen Retikulumzellen aufgebaut. In dem den Thymus umgebenden Bindegewebe sind mehrere diffus verteilte eosinophile Granulozyten zu finden. Eine organspezifische Besonderheit sind die Hassall-Körperchen, die konzentrisch geschichtete Einschlüsse der epithelialen Retikulumzellen darstellen und ca. ab dem 50. bis 60. Trächtigkeitstag auftreten (BELL 1905, BADERTSCHER 1915b, KRUML et al. 1970b, LIEBICH 2010b).

2.6.3 Milz

2.6.3.1 Fetale Entwicklung der Milz

Die Milz entwickelt sich im Mesogastrium dorsale, das sich im Rahmen der Magendrehung zum großen Netz ausbildet. Ihre Anlage ist erstmals ca. zwischen dem 25. und 28. Tag p.c. erkennbar. Ihre gewebliche Differenzierung verläuft parallel zur kapillären Sinusbildung des Blutgefäßsystems. In großen Teilen des Parenchyms ist für eine bestimmte Zeit Erythropoese nachweisbar (vgl. Kap. 2.2.1, S. 15) (RADFORD 1908, ZIETZSCHMANN u. KRÖLLING 1955). Am 36. Tag p.c. ist ihre Anlage vollständig abgeschlossen (SINKORA u. BUTLER 2009).

2.6.3.2 Morphologische Charakterisierung der Milz

Die Milz ist das größte zusammenhängende lymphatische Organ der Haussäugetiere. Bei adulten Tieren ist sie von einer geschichteten Kapsel überzogen, bestehend aus der Tunica serosa und der Tela subserosa. Die innere Kapselschicht besteht aus einem derb-elastischen Bindegewebsnetz, das mit elastischen Fasern sowie eingelagerten glatten Muskelfaserbündeln durchsetzt ist. Das Milzparenchym als Grundgewebe des Organs setzt sich aus Retikulumzellen und Retikulinfasern zusammen und gliedert sich in zwei Anteile, die weiße und die rote Milzpulpa. Als weiße Pulpa werden die lymphatischen Anteile des Milzgewebes bezeichnet. Diese bestehen aus den Milzfollikeln (Syn. Milzknötchen, Malpighi-Körperchen), die am 70. Tag p.c. erst ansatzweise, bzw. noch nicht erkennbar sind, und der Summe sämtlicher periarteriöler lymphatischer Scheiden, die am 70. Tag p.c. bereits nahezu vollständig entwickelt sind. Die rote Pulpa besteht aus einem retikulären Maschenwerk. Hierin eingelagert liegen unregelmäßig erweiterte Bluträume (Sinusoide), die untereinander anastomosieren. Am 70. Tag p.c. ist die rote Pulpa größtenteils mit hämato-poetisch aktivem Gewebe ausgefüllt, welches sich teils in und teils zwischen den Sinusoiden befindet. Hierbei dominiert die Erythropoese, die Granulopoese hingegen kann nur in einem sehr geringen Umfang beobachtet werden. Eine organspezifische Besonderheit stellt die Grenzzone zwischen roter und weißer Pulpa dar. Die peripheren Blutgefäße der weißen Pulpa und die mit Makrophagen und immunologisch aktiven Retikulumzellen ausgekleideten Sinusoide der roten Pulpa stehen bereits am 70. Tag in enger Beziehung, so dass vornehmlich in diesem Bereich die unspezifischen und spezifischen Immunreaktionen stattfinden (THIEL u. DOWNY 1921, KRUML et al. 1970a u. b, STERZL u. KOVARU 1977, LIEBICH 2010b).

2.6.4 Leber

2.6.4.1 Fetale Entwicklung der Leber

Die Leber ist ein zusammengesetztes Organ und schließt entodermale und mesodermale Anteile ein. Während die Hepatozyten als Zellsprosse des hepato-pankreatischen Rings des embryonalen Darmrohrs entodermalen Ursprungs sind und zwischen dem 30. und 39. Tag p.c. in die Leber einwandern (SINKORA u. BUTLER 2009), sind die Sinusoide, das Bindegewebe, die von-Kupffer-Zellen sowie das blutbildende Gewebe mesodermalen Ursprungs. Dass die Leber während der fetalen Entwicklung im Vergleich zu den übrigen Organen relativ groß ist, liegt in der Tatsache begründet, dass sie in erheblichem Maß hämatopoetisch aktives Gewebe enthält, welches auch das histologische Bild während dieser Zeit prägt. Diese Phase wird auch als hepatolienale Periode der Blutbildung bezeichnet (vgl. Kap. 2.2.1, S. 15), weil die Milz und die Leber in diesem Zeitraum die wichtigsten Organe der Hämatopoese darstellen (SINOWATZ 1991b, LIEBICH 2010c).

2.6.4.2 Morphologische Charakterisierung der Leber

Am 70. Tag p.c. ist die Leber vollständig von einer sehr dünnen kollagenfaserhaltigen Kapsel überzogen. Bei adulten Tieren ziehen von dieser Kapsel aus Kollagenfasern auch als interstitielles Gewebe in das Leberparenchym. Die Anordnung dieser Fasern macht, in Verbindung mit ihrem Verlauf, die Gliederung der Leber in Leberläppchen (Lobuli hepatici) aus, die eine funktionelle und strukturelle Einheit bilden. Dieses interstitielle Gewebe ist am 70. Tag p.c. noch nicht ausgebildet, so dass auch die Läppchen als solche noch nicht erkennbar sind. An den peripheren Ecken, wo später die Läppchen sitzen werden, befinden sich zu diesem Zeitpunkt bindegewebige Felder (periportale Felder), die von einer breiten Bindegewebsschicht umgeben sind und Lymphgefäße, Nervenfasern sowie die Lebertrias (Aa. und Vv. interlobulares, Gallengang) enthalten. Von diesen periportal Feldern verläuft der Blutfluss später in den Lebersinusoiden vom Läppchenrand entlang der Leberzellplatten (Laminae hepatis) zur mittig gelegenen Zentralvene. Die Zentralvenen sind am 70. Tag p.c. von einer sehr dünnen Bindegewebsschicht umgeben und variieren in ihrer Form. Eine Besonderheit der endothelialen Wandauskleidung der Sinusoide bilden die von-Kupffer-Zellen (Macrophagocyti stellati), die zum MPS-System (mononukleäres Phagozytosesystem) gehören und phagozytotische Aufgaben übernehmen. Beim Menschen treten sie in der Leber bereits auf, wenn das Knochenmark noch nicht entwickelt ist, und auch beim Schwein können sie ab dem 40. Trächtigkeitstag vorgefunden werden. Die Hepatozyten sind am 70. Tag p.c. polyedrisch und besitzen ein leicht granuläres Zytoplasma sowie einen hyperchromen Zellkern (JOHNSON 1919; ENZAN et al. 1983, REHAKOVA et al. 1998, LIEBICH 2010c). Zwischen den Hepatozyten liegen Cluster hämatopoetisch aktiver Zellen, wobei erythropoetische Zellen die Mehrheit bilden (KRUML et al 1970b). Daneben können lymphopoetische und myelopoetische Zellen sowie vereinzelte Megakaryoblasten beobachtet werden (KOSTANECKI 1892; MOLLIER 1909; JOHNSON 1919).

2.6.5 Knochenmark

2.6.5.1 Fetale Entwicklung des Knochenmarks

Im Rahmen der Ossifikation wachsen in das zwischen den Knochenbälkchen gelegene Bindegewebe Blutgefäße und Mesenchymzellen ein. Diese füllen ab einem gewissen Zeitpunkt die knorpelfreie Höhle (primäre Markhöhle) der Röhrenknochen nahezu vollständig aus. Mit dem Einsetzen der Blutbildung (medulläre Blutbildung) entstehen aus den Mesenchymzellen die Retikulumzellen bzw. Knochenmarkzellen. Ab diesem Zeitpunkt bezeichnet man den Knochenmarkraum als sekundäre Markhöhle. Stammzellen, die in anderen Organen - vermutlich in der Leber - gebildet werden, wandern in das Knochenmark ein und binden sich an das retikuläre Bindegewebe. Beim Schwein beginnt die hämatopoetische Aktivität des Knochenmarks ca. zwischen dem 48. und 50. Tag p.c. (SINOWATZ 1991a).

2.6.5.2 Morphologische Charakterisierung des Knochenmarks

Im Folgenden wird die Zusammensetzung der hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks von Schweineembryonen zu Beginn des 2. Drittels der Trächtigkeit beschrieben. Den Hauptanteil der Zellen stellen zu diesem Zeitpunkt kernlose Erythrozyten dar, die sich lediglich in der Größe von denen adulter Tiere unterscheiden (adult: 7-8 μm , fetal: 9-10 μm), sowie verhältnismäßig kleinkernige, orthochromatische Normoblasten. Zu finden sind aber auch einzelne polychromatische Normoblasten mit einem größeren Kern und einem schmaleren Zytoplasma. Zur Geburt hin wird die Anzahl der Normoblasten geringer und das Verhältnis von ortho- zu polychromatischen Zellen verändert sich zu Gunsten der Letzteren. Am zweithäufigsten sind die Lymphozyten vorhanden. Ihre Größe variiert, jedoch behalten sie stets das typische Aussehen mit einem großen runden Kern und einem schmalen Zytoplasma. Daneben befinden sich mehrere Granulozyten, von denen die eosinophilen am zahlreichsten sind, gefolgt von deren Vorläufern, den Myelozyten, einzelnen Megakaryozyten und Makrophagen bzw. Monozyten (ENGEL 1899, JORDAN 1918, JORDAN 1919, KRUML et al. 1970b).

2.6.6 Dünndarm

2.6.6.1 Fetale Entwicklung des Dünndarms

Der Gastrointestinaltrakt hat seinen Ursprung im primitiven Darmrohr, welches bei der Abfaltung der Keimscheibe vom Dottersack entsteht und im Allgemeinen in Vorder-, Mittel- und Enddarm gegliedert wird. Der Anfangsabschnitt des Duodenums, der vom Magen bis zur Einmündung des Ductus choledochus reicht, entwickelt sich aus dem Vorderdarm (Proenteron), während sich der gesamte übrige Dünndarm aus dem Mitteldarm (Mesenteron) entwickelt. Etwa zwischen dem 28. und dem 30. Trächtigkeitstag sind bereits alle Dünndarmabschnitte vorhanden. Das Gewicht des Fetus beträgt zu dieser Zeit ca. 1,2g. (SINOWATZ 1991b, ZIETZSCHMANN u. KRÖLLING 1955). Die Entwicklung des enteralen Immunsystems ist in Kap. 2.6.6.2 (S. 29) beschrieben.

2.6.6.2 Morphologische Charakterisierung des Dünndarms

Die mir zugängliche Literatur über die morphologische Charakterisierung des Dünndarms 70 Tage alter Schweinefeten ermöglicht leider keine vollständige histologische Beschreibung der Organstrukturen, so dass an dieser Stelle lediglich eine Übersicht über die recherchierten Daten gegeben wird, die im Rahmen des Ergebnisteils anhand der eigenen Befunde vervollständigt werden.

Der Wandaufbau des Dünndarms besteht aus geschichteten Geweben. Die Schleimhautschicht (Tunica mucosa) bildet die Innenauskleidung. Sie setzt sich aus dem Epithelium mucosae, der Lamina propria mucosae und der Lamina muscularis mucosae zusammen. Das Epithelium mucosae 70 Tage alter Schweinefeten wird von einem einschichtigen hochprismatischen Epithel gebildet, das neben Enterozyten, die ein relativ dichtes Zytoplasma aufweisen, einzelne Becherzellen mit einschließt (CHAPMAN et al. 1974). Panethzellen können beim Schwein nicht sicher nachgewiesen werden (LIEBICH 2010c), wobei in Bezug auf diese Aussage keine Altersangaben gemacht werden. Die histomorphologische Struktur oder der Zeitpunkt der erstmaligen Nachweisbarkeit von Lamina propria mucosae und Lamina muscularis mucosae werden für das Schwein in der Literatur nicht explizit beschrieben.

An die Schleimhaut grenzt das Unterschleimhautgewebe (Tela submucosa), das von einem lockeren Bindegewebe gebildet wird und am 70. Trächtigkeitstag reich an Blut- und Lymphgefäßen ist (HEUER 1909). Zusätzlich finden sich freie bzw. in Clustern angeordnete lymphoide Zellen. Die charakteristische follikuläre Anordnung lymphoider Zellen kann erst ab dem 77. und die Peyer-Platten, die beim Schwein sowohl in der Tela submucosa des Ileums als auch des Jejunums zu finden sind, können erst ab dem 80. Trächtigkeitstag beobachtet werden (KRUML et al. 1970b, CHAPMAN et al. 1974, PABST et al. 1988, ROTHKOTTER u. PABST 1989).

Die angrenzende Muskelschicht (Tunica muscularis) findet im Hinblick auf den 70. Tag p.c. in der Literatur keine Erwähnung. Die den Darm von außen begrenzende Schicht (Tunica serosa) besteht aus lockerem Bindegewebe und dient als Verbindungsschicht zu angrenzenden Organen. Sie weist am 70. Tag p.c. zahlreiche Lymphgefäße auf (HEUER 1909, LIEBICH 2010c).

2.7 Fazit aus der Literatur, bezogen auf die initiale Fragestellung dieser Arbeit

Während es zahlreiche Studien über DON-bedingte Alterationen an adulten Schweinen und anderen Tieren sowie an Mäuse- und Rattenfeten gibt, existieren in der Literatur – trotz des nachgewiesenen diaplazentaren DON-Transfers beim Schwein – keine detaillierten histologischen und immunhistologischen Untersuchungen an Schweinefeten von DON-behandelten Muttertieren. Auswirkungen einer diaplazentaren DON-Expositionen werden zwar angenommen, der Pathomechanismus sowie das Vorhandensein eines morphologischen Korrelats sind jedoch nach wie vor unklar. Zudem bleibt die Frage der diagnostischen Relevanz pathomorphologischer und immunhistologischer Befunde bei Schweinefeten für die definitive Diagnosestellung und/oder -sicherung einer DON-Belastung in der Literatur unbeantwortet.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tiergut, Material und Methoden

3.1.1 Tiergut, Material und Probenherkunft

Als Untersuchungsmaterial stand je ein Organspektrum (Lymphknoten, Thymus, Milz, Leber, und Dünndarm) von 36 Schweinefeten zum Zeitpunkt des 70. Trächtigkeitstages zur Verfügung. Die Organproben stammen aus einem Fütterungsversuch des Forschungsinstitutes für die Biologie Landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN) in Dummerstorf (Genehmigung des Tierversuches durch das Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Mecklenburg- Vorpommern, Aktenzeichen LVL M-V/310-4/7221.3-1.1-006/03) mit Fusarium-kontaminiertem Triticaleanteil. Die Versuchsplanung und -durchführung erfolgte im FBN Dummerstorf.

Zusätzlich zu den oben genannten Organproben stellten das FBN bzw. das Institut für Tierernährung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) in Braunschweig folgende Ergebnisse der Analysen der Blut- und Gallenflüssigkeit sowie des Futtermittels zur Verfügung:

- Futtermittelzusammensetzung und DON/ZON-Gehalt des Kontroll- und Versuchsfutters (s. Anhang, Tab. 9.1, S. 95)
- Gehalt an DON und seines konjugierten Derivates (deepoxy-DON) in Urin, Gallenflüssigkeit und Serum der Sauen und Feten der Kontroll- und der Versuchsgruppe (s. Anhang, Tab. 9.2, S. 96)
- Gehalt an DON und seines konjugierten Derivates (deepoxy-DON) in Leber, Niere und Milz der Sauen und Feten der Kontroll- und der Versuchsgruppe (s. Anhang, Tab. 9.3, S. 97)

Für die Etablierung immunhistologischer Methoden dienten die oben genannten Organe von zwei zwei Wochen alten, weiblichen Schweinen (s. Anhang, Tab. 9.4, S. 97) aus Routine-sektionen, die im Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig im Jahre 2007 durchgeführt wurden.

3.1.1.1 Versuchsaufbau und Durchführung nach TIEMANN et al. (2008)

12 trächtige Sauen (Deutsche Landrasse) wurden randomisiert in eine Kontrollgruppe mit 5 und eine Versuchsgruppe mit 7 Tieren aufgeteilt. Die Sauen wurden einzeln auf spaltenfreiem Asphaltboden gehalten und erhielten Wasser ad libitum. Bei der Toxinquelle handelte es sich um eine auf natürliche Weise mit Fusarium kontaminierte Triticalecharge. Die Kontroll- bzw. Mykotoxin-kontaminierte Triticale wurde dem Futter im Rahmen einer Eingewöhnungsphase über einen Zeitraum von 6 Tagen schrittweise ansteigend (25, 50 und 75% des Totalanteils) hinzugefügt. Der darauf folgende Fütterungsversuch dauerte vom 35. bis zum 70. Trächtigkeitstag. Jede Sau erhielt täglich 2kg Futtermittel, auf zwei gleiche Portionen aufgeteilt (7:00 Uhr und 14:00 Uhr). Der totale Triticale-Anteil betrug nach der 6-tägigen Eingewöhnungsphase 15%. Die Futtermittelzusammensetzung und -analyse sind in Tab. 9.1 (s. Anhang, S. 93) näher erläutert. Zum Abschluss des Versuches am 70. Trächtigkeitstag wurden die Sauen anästhesiert und die Feten per Kaiserschnitt entbunden. Nach dem Durchtrennen der Nabelschnur erfolgte die Euthanasie der Feten durch eine T61-Injektion in die Nabelvene. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 3.1 schematisch dargestellt.

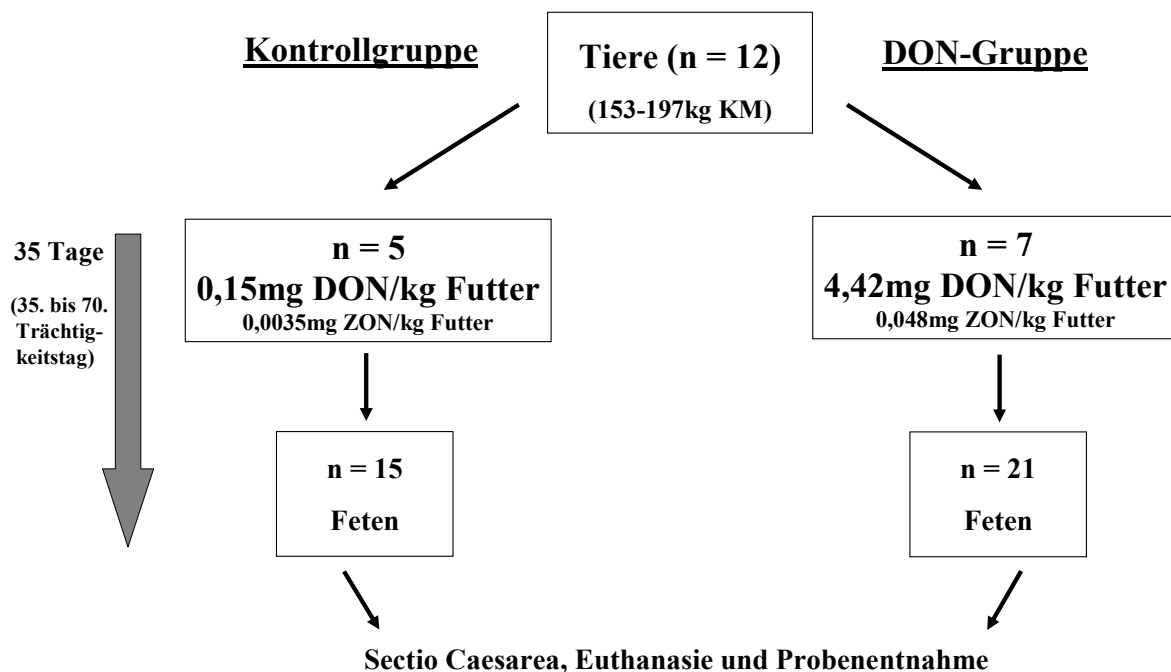


Abb. 3.1: Versuchsdauer, Gruppeneinteilung und Futtermittelbelastung der Versuchsgruppen mit Deoxynivalenol und Zearalenon

Legende zu Abb. 3.1: DON: Deoxynivalenol, KM: Körpermasse, n: Anzahl der Tiere, ZON: Zearalenon

3.1.2 Probenentnahme und Probenaufbereitung

3.1.2.1 Anatomische Präparation und pathologisch-anatomische Untersuchungen

Die anatomische Präparation der Feten sowie die Probenentnahme und -fixierung des Organspektrums erfolgte am Forschungsinstitut für die Biologie Landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN) in Dummerstorf. Nach der Exenteration des Organspektrums wurde an sämtlichen Organen des Spektrums eine Untersuchung auf erfassbare pathologisch-anatomische Veränderungen durchgeführt. Abschließend wurden die Organe in 4%iger Formalinlösung fixiert.

3.1.2.2 Histologische Präparation

Die Einbettung der Formalin-fixierten Proben erfolgte nach dem Standardverfahren im Hypercenter XP (Fa. Shandon, Frankfurt) in Paraplast (Fa. Vogel, Gießen). Anschließend wurden mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (Fa. Reichert-Jung, Wien, Österreich) 3 bis 4 µm dicke Schnitte angefertigt und mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.-E.-Färbung) (BÖCK 1989) angefärbt. Von einzelnen Proben wurden zudem eine PAS-Reaktion (Perjodsäure-Schiff-Reaktion) (MCMANUS 1948), eine Sudan III-Färbung (DADDI 1896) und eine Bodian-Versilberung (BODIAN 1936) erstellt.

3.1.3 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Die lichtmikroskopische Untersuchung der auszuwertenden Präparate wurde mit dem Standardmikroskop der Fa. OLYMPUS durchgeführt. Hierbei kamen 4er-, 10er-, 20er- und 40er-Objektive zur Anwendung. Zunächst blieb die Gruppenzugehörigkeit der Einzeltiere für die lichtmikroskopische Auswertung unberücksichtigt (Blinduntersuchung). Erst nach der Dokumentation der histologischen Befunde erfolgte schließlich die Zuordnung der Einzeltiere zu den Versuchsgruppen. Anschließend wurde unter Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit eine vergleichende Betrachtung der histologischen Organbefunde durchgeführt und mit Hilfe semiquantitativer Untersuchungsverfahren ausgewertet.

Lymphknoten

Die histopathologische Untersuchung der Mesenteriallymphknoten von 17 (7 Kontroll- und 10 Versuchstiere) und der Mediastinallymphknoten von 6 (4 Kontroll- und 2 Versuchstiere) Feten diente der Identifizierung und Differenzierung sowie Charakterisierung parakortikaler und folliculärer Strukturen. Darüber hinaus erfolgte eine Dokumentation des stromalen Ödematisierungsgrades, der efferenten Lymphgefäße, die Beurteilung der Lymphozyten hinsichtlich Quantität und Verteilung sowie eine semiquantitative Abschätzung von Mitosefiguren und des Auftretens von Apoptosekörpern. Zusätzlich vorhandene Zellen des weißen Blutbildes wurden bezüglich Qualität, Quantität und Verteilung dokumentiert. Der Grund für die geringe Anzahl der untersuchten Lymphknoten liegt in der Problematik der anatomischen Präparation der sehr kleinen und makroskopisch nicht immer sichtbaren Organstrukturen.

Thymus

Schwerpunkt der histopathologischen Untersuchung der Thymi (n = 36) war die Charakterisierung der Lymphozyten, vor allem in Bezug auf die Verteilung (Kortex/Medulla), die Dichte und das Vorhandensein von Apoptosekörpern und Mitosefiguren. Darüber hinaus erfolgte eine Dokumentation des Ödematisierungsgrades (Kortex/Medulla), der Anzahl und Größe der Hassall'schen Körperchen sowie die Beurteilung weiterer Zellen des weißen Blutbildes hinsichtlich der Qualität, der Quantität und der Verteilung.

Milz

Aufgrund einer hochgradigen extramedullären Hämatopoese, welche bei allen untersuchten Tieren nahezu das gesamte Gewebe ausfüllte, war eine exakte und detaillierte histopathologische Charakterisierung der Milz (n = 36) mittels konventioneller Histologie nur eingeschränkt möglich.

Leber

Im Rahmen der histopathologischen Untersuchung der Leber (n = 36) lag der Schwerpunkt in der Charakterisierung der extramedullären Hämatopoese (Grad, Verteilung und Anteile der einzelnen Zellarten), der Hepatozyten und der Gallengangsepithelien (Zellform, Kern- und Zytoplasmamorphologie). Darüber hinaus erfolgte eine Dokumentation der Struktur der Serosa, der periportalen Felder, der Gefäße (inkl. der Zentralvenen), der Sinus und der Leberzellbalken sowie die Beurteilung vorhandener Zellen des weißen Blutbildes (Qualität, Quantität und Verteilung). Von den Lebern zweier Tiere wurden zudem eine Sudan-III-Färbung (DADDI 1896) und eine PAS-Reaktion (MCMANUS 1948) mit und ohne Diastase-Verdauung angefertigt, um exemplarisch den Fett- bzw. Glykogengehalt in den Hepatozyten zu bestimmen.

Knochenmark

Der Schwerpunkt der histopathologischen Untersuchung bezüglich des Knochenmarks der Feten (n = 36) lag in der Charakterisierung der medullären Hämatopoese (Grad, Verteilung und Anteile der einzelnen Zellarten).

Dünndarm

Die lichtmikroskopische Untersuchung des Dünndarms (Duodenum, Jejunum und Ileum) (n = 36) zielte auf eine nähere Charakterisierung der Epithelzellen (Zellform, Kern- und Zytoplasmamorphologie), der Brunnerschen Drüsen des Duodenums (Reihung, Regularität, Zellform, Kern- und Zytoplasmamorphologie) und der lymphatischen Gewebestrukturen (Verteilung und Quantität der Lymphozyten). Außerdem wurde der Grad der Ausbildung follikulärer Strukturen bestimmt. Darüber hinaus erfolgte eine Dokumentation des Ödematisierungsgrades der einzelnen Darmschichten, der Anzahl der Becherzellen sowie die Beurteilung zusätzlich vorhandener Zellen des weißen Blutbildes (Qualität, Quantität und Verteilung). Von den Därmen zweier Tiere wurden zudem eine Bodian-Versilberung (BODIAN

1936) und eine PAS-Reaktion (MCMANUS 1948) angefertigt, um exemplarisch die Paneth-Zellen und die Becherzellen darstellen zu können sowie eine Sudan-III-Färbung (DADDI 1896) und eine PAS-Reaktion (MCMANUS 1948) zur Charakterisierung vakuolärer Inhalte der Zellen der Tunica muscularis.

3.1.4 Immunhistologische Methoden

Vorversuche

Zunächst erfolgten Vorversuche zur Etablierung der Methodik:

- Für den Nachweis von Antigenen zur **Leukozytendifferenzierung** wurden folgende Antikörper getestet: CD3 (T-Lymphozyten), CD79a und b sowie CDw75 und IgM (B-Lymphozyten), CD4 (T-Helferzellen), CD8 (zytotoxische bzw. Suppressor-T-Zellen), MAC 387 (Myeloid/Histiocyte Antigen) sowie Lysozym (Muramidase) (Makrophagen).
- Für den **Proliferationsnachweis**: proliferating cell nuclear antigen (PCNA) und Ki-67 Antigen.
- Für den **Apoptosenachweis**: p-p53 Mitose aktivierende Proteinkinase (MAP-Kinase), p-p38 MAP-Kinase, Caspase 3, 8 und 9.
- Für den Nachweis einer Auf-Regulation und einer Stabilitätssteigerung der mRNAs diverser **Gene proinflammatorischer Proteine**: Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α).

Die in den Versuchen letztendlich verwendeten Antikörper (vgl. Tab. 3.1, s.u.) sowie die Vorbehandlungsverfahren wurden anhand des Routinesektionsmaterials zweier zwei Wochen alter, weiblicher Schweine (s. Anhang, Tab 9.4, S. 97), die ca. 1,5 Stunden vor der Sektion euthanasiert wurden, getestet und die optimale Antikörperverdünnung ausprobiert. Die übrigen Marker zeigten keine ausreichende Reaktivität an porzinem Gewebe und kamen daher nicht zur Anwendung.

Tab. 3.1: In den Versuchen verwendete Primärantikörper und Positivkontrollen unter Einbeziehung ihrer Reaktionsmuster

Primärantikörper gegen:		Reaktionsmuster	Positivkontrollen (Schwein)
CD3	T-Zell-Rezeptor	Zellmembran	Tonsille
CD79a	B-Zell-Rezeptor	Zellmembran	Tonsille
MAC 387	Myeloid/Histiozyten Antigen	intrazytoplasmatisch	Milz
Ki-67 Antigen	nukleäres Protein	intranukleär	Tonsille
p-p 38	phosphorylierte p38 mitogen-aktivierte Proteinkinase	intranukleär, ggf. intrazytoplasmatisch	Leberkarzinom
Caspase 3	Enzym	intranukleär und intrazytoplasmatisch	Tonsille
Caspase 9	Enzym	intranukleär und intrazytoplasmatisch	Tonsille
TNFα	Zytokin	intrazytoplasmatisch und extrazellulär	Tonsille

Legende zu Abb. 3.1: p-p38: phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase, TNF- α : Tumor-Nekrose-Faktor- α

Hauptversuche

In der Tab. 3.2 wird dargestellt, welcher der erprobten Antikörper an welchem der immunhistologisch untersuchten Organe angewendet wurde. Zum Ablauf der immunhistologischen Verfahren sowie zu den Bezugsquellen und der Verdünnung der angewandten Antikörper vgl. Kap. 9.4 und 9.5 (s. Anhang, S. 98 u. 101).

Tab. 3.2: Übersicht über die mittels verschiedener Antikörper immunhistologisch untersuchten Organe

	CD3	CD79a	MAC 387	Ki-67	p-p38	Caspase 3	Caspase 9	TNF- α
Dünndarm			X	X	X	X	X	
Leber			X	X	X	X	X	
Thymus	X	X	X	X			X	
Lymphknoten	X	X	X	X	X	X	X	X
Milz	X	X	X	X	X	X	X	
Knochenmark	X	X	X	X	X	X	X	X

Legende zu Abb. 3.2: Ki-67: Ki-67 Antigen, p-p38: phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase, TNF- α : Tumor-Nekrose-Faktor- α

Von Dünndarm, Leber, Milz und Knochenmark wurden 36 repräsentative Proben (von 21 Versuchs- und 15 Kontrolltieren) immunhistologisch mittels monoklonaler bzw. polyklonaler Antikörper (s. Anhang, Kap. 9.5, S. 101) nach der Peroxidase-anti-Peroxidase-Methode (PAP) bzw. im Falle des TNF- α mittels indirekter Peroxidase untersucht. Das Lymphknotengewebe konnte z.T. makroskopisch und histologisch nicht identifiziert werden, so dass nur von 17 Mesenteriallymphknoten (7 Kontroll- und 10 Versuchstiere) und von 6 Mediastinallymphknoten (4 Kontroll- und 2 Versuchstiere) repräsentative Proben zur immunhistologischen Untersuchung gelangten (vgl. Kap. 3.1.3, S. 32). Aus technischen Gründen wurden lediglich 17 Thymi (von 9 Versuchs- und 8 Kontrolltieren) immunhistologisch untersucht.

Immunhistologische Kontrollen

Als **Positivkontrolle** wurden die in Tabelle 3.1 (S. 34) aufgeführten porzinen Gewebe mitgeführt. Als **Negativkontrollen** für die monoklonalen Antikörper dienten die jeweils mit dem Kontrollserum T1 (Oberflächenantigen von Hühner-Bursa-Lymphozyten) (HIRSCHBERGER 1987) inkubierten Schnitte. Für die polyklonalen Antikörper dienten mit Kaninchenserum (Code-Nr. X0902, Firma Dako, Hamburg) inkubierte Schnitte.

3.1.4.1 Auswertung der immunhistologischen Untersuchungen

Die immunhistologische Auswertung sämtlicher Antikörper erfolgte teils morphometrisch, teils semiquantitativ. In Tab. 3.5 (S. 37) ist die qualitative Zuteilung (anhand der Anzahl bzw. der Prozentzahl positiv reagierender Zellen) aller verwendeten Marker in sämtlichen untersuchten Organen dargestellt.

Im Knochenmark wurde außerdem bei sämtlichen Antikörpern außer MAC 387, der prozentuale Anteil positiver Zellen an der Gesamtanzahl der Zellen des Knochenmarks angegeben; beim Ki-67 Antigen, der p-p38 MAP-Kinase, bei Caspase 3 und 9 sowie bei TNF- α ausserdem der Anteil an der jeweiligen Zell-Subpopulation.

Mittels CD3 und CD79a erfolgte in Milz, Thymus und Knochenmark auch die Beurteilung der Anteile von T- und B-Lymphozyten zueinander.

Als positiv wurden in der Schnittebene liegende, hell- bis dunkelbraune, feingranuläre Reaktionsprodukte gewertet, die im Kontrollschnitt nicht nachweisbar waren.

Die Bestimmung der Färbintensität der Reaktionsprodukte der Antikörper für Caspase 3 und 9, p-p38 MAP-Kinase und TNF- α erfolgte semiquantitativ anhand der Ermittlung des immunreaktiven Scores (IRS) von ÖZGEN et al. (1997), modifiziert nach ELLENBERGER et al. (2008), nach folgender Rechenvorschrift:

$$\text{IRS} = 1/100 \sum_{n=1}^5 (\text{PP}_n \times \text{SI}_n)$$

Mit Laufindex: n Prozentsatz positiver Zellen: PP Farbintensität: SI

Tab. 3.3: Zuordnung von Farbintensität und SI-Wert

Laufindex n	Färbereaktion	Wert
1	keine	0
2	sehr schwach	0.5
3	schwach	1
4	mittel	5
5	stark	10

Der IRS kann nach dieser Berechnungsmethode beim Einzeltier einen Wert zwischen 0 und 10 annehmen. Die Interpretation der Expressionsintensität über die errechneten IRS-Werte ist in Tabelle 3.4 dargestellt.

Tab. 3.4: Expressionsintensität als Äquivalent zum errechneten IRS-Wert

IRS	Expressionsintensität	IRS	Expressionsintensität
<1	angedeutet	3,6-5,0	mittelgradig
1-2	geringgradig	5,1-7,0	mittel- bis hochgradig
2,1-3,5	gering- bis mittelgradig	>7,0	hochgradig

Tab. 3.5: Darstellung der Mengenzuteilung der positiv reagierenden Zellen für alle verwendeten Marker in sämtlichen untersuchten Organen pro Gesichtsfeld bzw. ¼-Gesichtsfeld in 40-facher Vergrößerung

	keine	vereinzelt	einzelne	mehrere	zahlreiche	massenhaft
CD3						
Lymphknoten	0	0-2	3-25	20 bis 50 %	50 bis 80 %	80 bis 100 %
Thymus	0	0-2	3-15	20 bis 50 %	50 bis 80 %	80 bis 100 %
Milz	0	0-2	3-15	bis zu 25 %	25 bis 50 %	50 bis 100 %
Leber, Darm	-	-	-	-	-	-
Knochenmark	0	0-2	3-15	16-100	100-250	> 250
CD79a						
Lymphknoten	0	0-2	3-25	20 bis 50 %	50 bis 80 %	80 bis 100 %
Thymus	0	0-2	3-25	26-100	100-250	> 250
Milz	0	0-2	3-15	bis zu 25 %	25 bis 50 %	50 bis 100 %
Leber, Darm	-	-	-	-	-	-
Knochenmark	0	0-2	3-15	16-100	100-250	> 250
Ki-67						
Lymphknoten	0	0-1	2-5	20 bis 50 %	50 bis 80 %	80 bis 100 %
Thymus, Milz	0	0-1	2-5	20 bis 50 %	50 bis 80 %	80 bis 100 %
Leber, Darm	0	0-1	2-5	20 bis 50 %	50 bis 80 %	80 bis 100 %
Knochenmark	0	0-2	3-15	16-100	100-250	> 250
MAC 387						
Lymphknoten	0	1-5	6-15	16-40	41-60	> 60
Thymus	0	1-3	4-7	8-20	20-30	> 30
Milz	0	1-3	4-7	8-12	13-20	> 20
Leber, Darm	0	< 10	10-20	21-30	31-50	> 50
Knochenmark	0	1-5 ¼ Gf	6-15 ¼ Gf	16-35 ¼ Gf	36-50 ¼ Gf	> 50 ¼ Gf
p-p38						
Lymphknoten	0	1-3	4-15	20 bis 50 %	50 bis 80 %	80 bis 100 %
Thymus	0	-	-	-	-	-
Milz, Leber	0	1-3	4-15	20 bis 50 %	50 bis 80 %	80 bis 100 %
Darm	0	1-3	4-15	20 bis 50 %	50 bis 80 %	80 bis 100 %
Knochenmark	0	1-2 ¼ Gf	3-15 ¼ Gf	16-35 ¼ Gf	36-50 ¼ Gf	> 50 ¼ Gf
Caspase 3						
Lymphknoten	0	1-3	4-15	20 bis 50 %	50 bis 80 %	80 bis 100 %
Thymus	0	-	-	-	-	-
Milz, Leber	0	1-3	4-15	20 bis 50 %	50 bis 80 %	80 bis 100 %
Darm	0	1-3	4-15	20 bis 50 %	50 bis 80 %	80 bis 100 %
Knochenmark	0	1-2 ¼ Gf	3-15 ¼ Gf	16-35 ¼ Gf	36-50 ¼ Gf	> 50 ¼ Gf
Caspase 9						
Lymphknoten	0	1-4 ¼ Gf	5-20 ¼ Gf	20 bis 50 %	50 bis 80 %	80 bis 100 %
Thymus	0	1-4	5-30	20 bis 50 %	50 bis 80 %	80 bis 100 %
Milz, Leber	0	1-3	4-15	20 bis 50 %	50 bis 80 %	80 bis 100 %
Darm	0	1-3	4-15	20 bis 50 %	50 bis 80 %	80 bis 100 %
Knochenmark	0	1-2 ¼ Gf	3-15 ¼ Gf	16-3 ¼ Gf	36-50 ¼ Gf	> 50 ¼ Gf
TNF-α						
Lymphknoten	0	1-5	6-10	11-30	31-50	> 50
Knochenmark	0	1-15 ¼ Gf	16-25 ¼ Gf	26-45 ¼ Gf	46-65 ¼ Gf	> 65 ¼ Gf
Thymus, Milz	-	-	-	-	-	-
Leber, Darm	-	-	-	-	-	-

Legende zu Tab.3.5: ¼ Gf: pro ein viertel Gesichtsfeld (mittels des Fadenkeuzes des Okulars CWHK 10X-T/18L der Firma Olympus), Ki-67: Ki-67 Antigen, p-p38: phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase, TNF-α: Tumor-Nekrose-Faktor-α

3.1.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der immunhistologischen Untersuchungen erfolgte unter Zuhilfenahme der Software SPSS 17.0 (SPSS Software GmbH München). Zunächst wurde eine deskriptive Statistik sämtlicher immunhistologisch untersuchter Parameter von allen untersuchten Organen (Lymphknoten, Thymus, Milz, Leber, Dünndarm und Knochenmark) erstellt (s. Anhang, Kap. 9.7, S. 104). Anschließend wurde bei allen Parametern der U-Test nach Mann-Whitney durchgeführt. Im Rahmen dieses Tests wurden signifikante Abweichungen der Untersuchungsparameter in Abhängigkeit von der Versuchsgruppenzugehörigkeit der Tiere berechnet, wobei p-Werte unter 0,05 als statistisch signifikant zu werten sind.

4 ERGEBNISSE

4.1 Makroskopische Untersuchungsbefunde

Die Untersuchungen auf makroskopisch erfassbare pathologisch-anatomische Veränderungen von Lymphknoten, Thymus, Milz, Leber, Knochenmark und Dünndarm sämtlicher Feten beider Untersuchungsgruppen verliefen ohne Nachweis von der Norm abweichender und/oder gruppenspezifischer Befunde.

4.2 Histologische Untersuchungsbefunde

Die konventionellen histomorphologischen Untersuchungen anhand H.-E.-gefärbter Präparate von Lymphknoten, Thymus, Leber, Knochenmark und Dünndarm, zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe, keine erkennbaren gruppenspezifischen, von der DON-Belastung abhängigen, Unterschiede. Die nachfolgenden Beschreibungen geben demnach einen allgemeinen Überblick über die Histomorphologie dieser Organe von 70 Tage alten Schweinefeten.

Die histopathologischen Untersuchungsbefunde der untersuchten Organe entsprechen den in den Kapiteln 2.6.1.2 bis 2.6.6.2 (S. 24 bis S. 29) dargestellten morphologischen Charakteristika und sollen an dieser Stelle durch eigene Befunde ergänzt werden.

4.2.1 Histologische Untersuchungsbefunde der Lymphknoten

Die Mediastinallymphknoten (s. Abb. 4.1, S. 40) sind im Vergleich zu den mesenterialen (s. Abb. 4.2, S. 40) wesentlich strukturierter. Sie besitzen eine deutlich höhere Lymphozyten- bzw. -blastendichte sowie einen geringeren Ödematisierungsgrad, sowohl im Bereich des „cortex like tissue“ als auch im Bereich des „medulla like tissue“. Bei sämtlichen Mediastinallymphknoten können im Durchschnitt fünf bis sieben deutlich ansprechbare aber noch in Anbildung befindliche, zeldichte Follikel im Bereich des „cortex like tissue“ beobachtet werden. Dagegen weisen nur einzelne Mesenteriallymphknoten ein bis höchstens drei relativ kleine, in Anbildung befindliche Follikel auf. Zudem lässt sich bei sämtlichen Mediastinallymphknoten der Parakortex deutlich von den Follikeln abgrenzen. Dies ist bei den mesenterialen nur vereinzelt der Fall. Die übrigen histomorphologischen Befunde sind bei beiden Lymphknoten nahezu identisch. Die Kapsel ist mittelgradig ödematisiert und enthält einzelne Lymphozyten. Das „medulla like tissue“ ist gering- bis mittelgradig mit eosinophilen Granulozyten und vereinzelt Makrophagen infiltriert. Daneben können multifokal mehrere polygonale, teils blastoide Retikulumzellen mit schwach eosinophilem Zytoplasma und mittelgradig basophilem Zellkern beobachtet werden. Im Bereich des „cortex like tissue“ können multifokal mehrere Retikulumzellen, die in ihrer Morphologie denen im „medulla like tissue“ entsprechen, sowie multifokal vereinzelt eosinophile Granulozyten nachgewiesen werden. Trabekel lassen sich nur in den Sternallymphknoten in Ansätzen nachweisen. Multifokal weisen einzelne Lymphozyten/-blasten im „medulla like tissue“ und im „cortex like tissue“ Apoptosekörper auf.

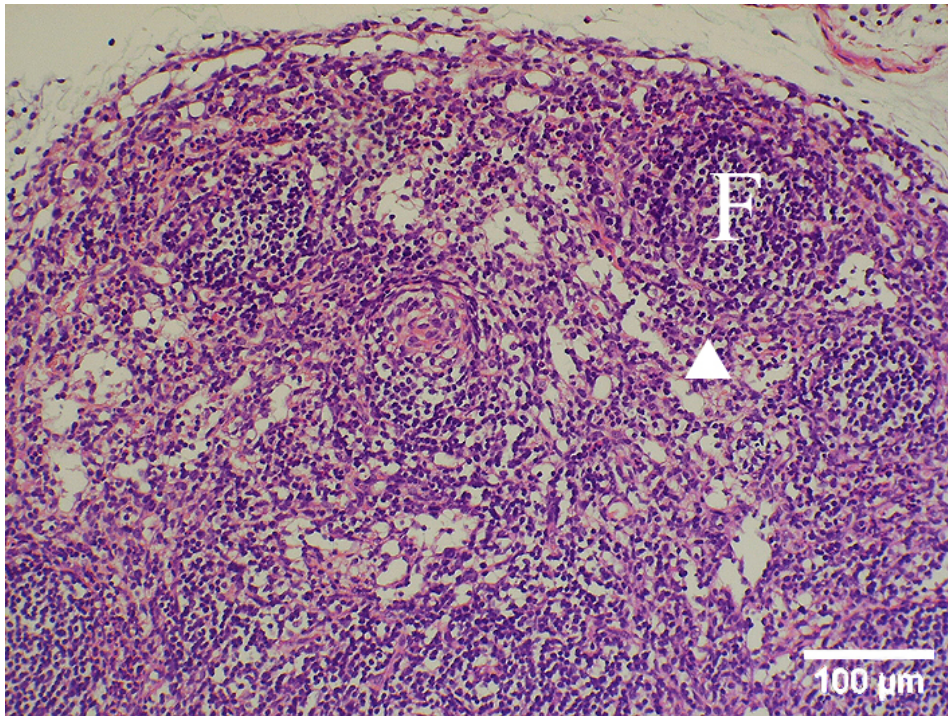


Abb. 4.1: Histologische Befunde am Mediastinallymphknoten: Relativ weit entwickelte Follikel (F) und ein bereits abgegrenzter Parakortex (Pfeilspitze). H.-E.-Färbung

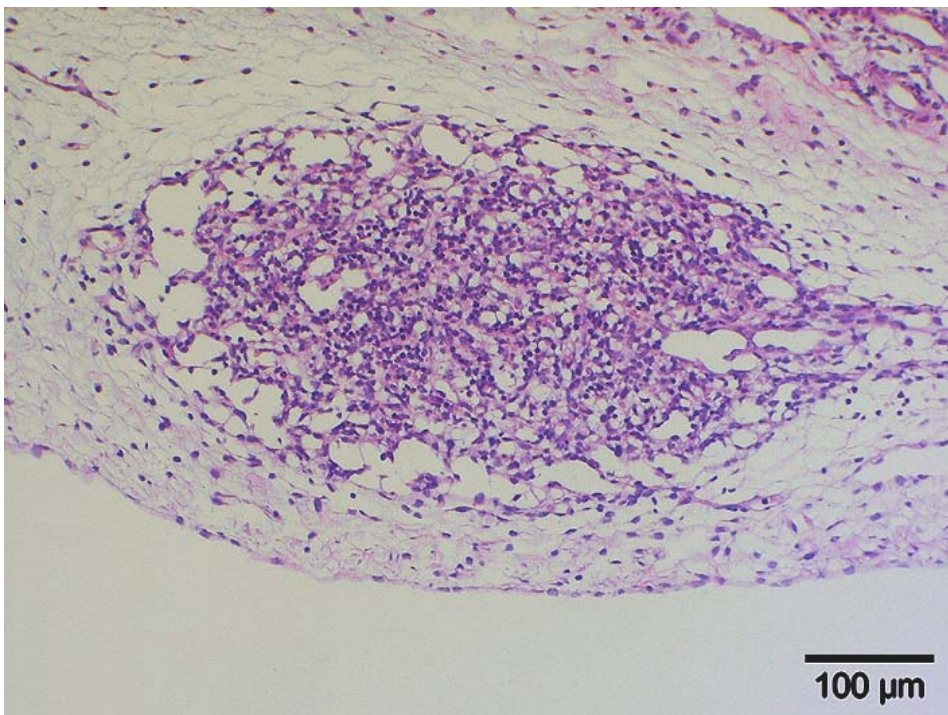


Abb. 4.2: Histologische Befunde am Mesenteriallymphknoten: Übersicht über einen schwach entwickelten, mittelgradig ödematisierten Mesenteriallymphknoten. H.-E.-Färbung

4.2.2 Histologische Untersuchungsbefunde des Thymus

Die Thymi sind von einer mittelgradig ödematisierten, mit vereinzelt Makrophagen und eosinophilen Granulozyten sowie einzelnen Lymphozyten infiltrierte, bindegewebigen Kapsel umgeben. Die unter der Kapsel liegende Rindenzone (Kortex) ist (Abb. 4.3, s.u.), wie in Kap. 2.6.2.2 (S. 25) bereits erwähnt, relativ dicht und sehr zellreich, wobei Lymphozyten/-blasten die dominierende Zellpopulation darstellen. Daneben können multifokal mehrere polygonale, teils blastoide Retikulumzellen mit schwach eosinophilem Zytoplasma und gering- bis mittelgradig basophilem Zellkern sowie vereinzelt Makrophagen beobachtet werden. Zudem weisen multifokal einzelne Lymphozyten/-blasten Apoptosekörper auf. Die Markzone (Medulla) ist vom histologischen Aufbau identisch mit der Rindenzone, weist jedoch eine geringere Zelldichte auf und ist mittelgradig diffus ödematisiert. Es überwiegen ebenfalls Lymphozyten/-blasten, wobei im Vergleich zum Kortex der Anteil der Blasten größer ist. Apoptosekörper können in der Markzone nicht beobachtet werden. Hassall-Körperchen können bei allen untersuchten Tieren gefunden werden, variieren jedoch stark in Anzahl (0-4 je Medulla-Anschnitt) und Größe.

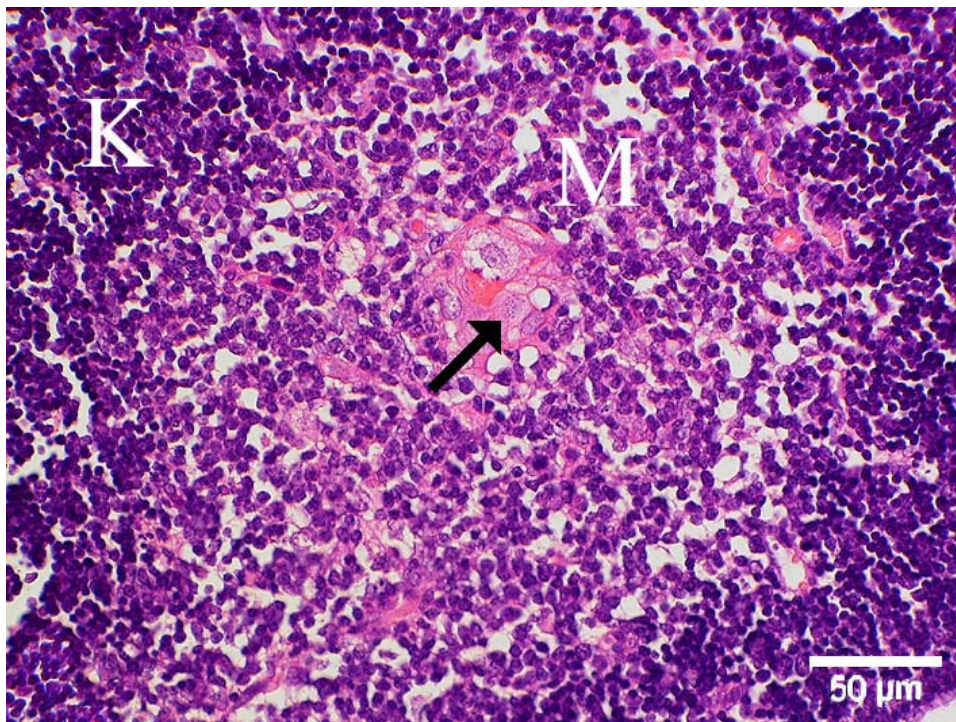


Abb. 4.3: Histologische Befunde am Thymus: Zelldichter Kortex (**K**) und aufgelockerte Medulla (**M**). Im zentralen Bereich der Medulla befindet sich ein Hassall-Körperchen (**Pfeil**). H.-E.-Färbung

4.2.3 Histologische Untersuchungsbefunde der Milz

Aufgrund einer hochgradigen extramedullären Hämatopoese, welche bei allen untersuchten Tieren nahezu das gesamte Gewebe ausfüllt, war eine exakte und detaillierte histopathologische Charakterisierung der Milz mittels konventioneller Histologie nur eingeschränkt möglich.

Die Milz wird von einer geschichteten Kapsel umgeben, die außen (Tunica serosa) aus einer einschichtigen Lage flacher Serosadeckzellen besteht. Die darunter angrenzende Tela subserosa enthält lockeres Bindegewebe, in dem zu ungefähr gleichen Anteilen Fibroblasten und Fibrozyten eingebettet sind. Von dieser Schicht ziehen schmale bindegewebige Trabekel in die Tiefe, die ebenfalls gleichermaßen Fibroblasten und Fibrozyten enthalten. Die rote Pulpa (Abb. 4.4, s.u.) ist größtenteils mit hämatopoetisch aktivem Gewebe ausgefüllt. Dieses setzt sich zusammen aus massenhaft Erythroblasten, gefolgt von massenhaft Lymphoblasten, mehreren Megakaryoblasten und vereinzelt Myeloblasten. Multifokal lassen sich im Bereich des hämatopoetischen Gewebes mehrere Mitosefiguren und vereinzelte Apoptosekörper beobachten. Die periarteriolären lymphatischen Scheiden der weißen Pulpa sind zahlreich und deutlich ausgebildet, während sich die Follikel im Stadium der Anbildung befinden und nur zu erahnen sind.

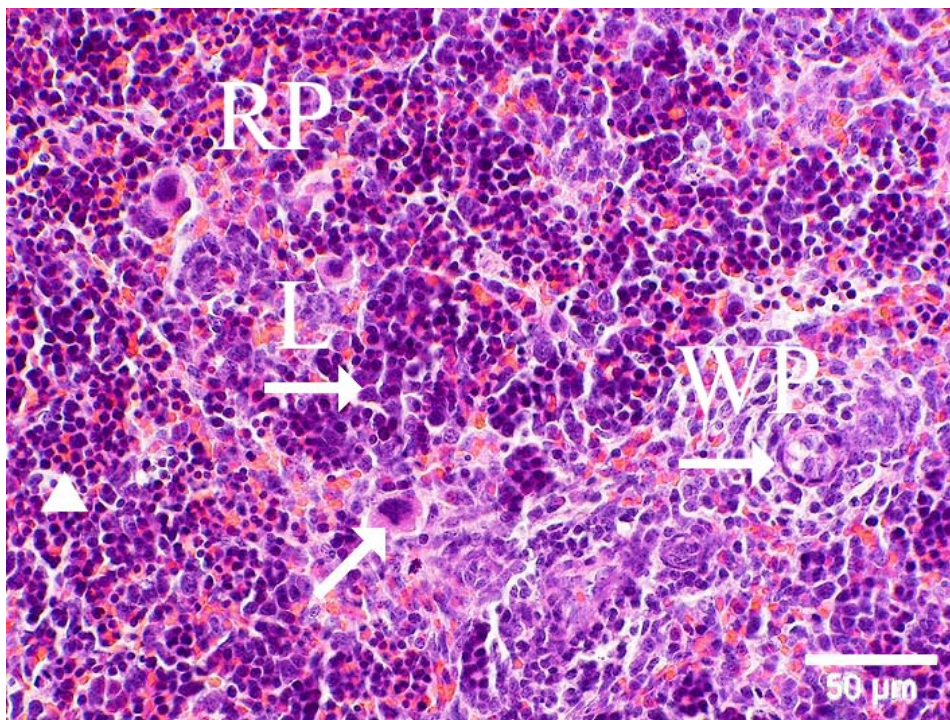


Abb. 4.4: Histologische Befunde an der Milz: Rote und Weiße Pulpa: Im Bereich der roten Pulpa (RP) ist eine hochgradige, diffuse, das übrige Gewebe überdeckende extramedulläre Hämatopoese erkennbar mit Beteiligung von Erythropoese (Pfeilspitze), Lymphopoese (L →) und Thrombozytopoese (Megakaryoblasten) (Pfeil). Im Bereich der weißen Pulpa (WP) stellt sich eine perifollikuläre Lymphozytenscheide dar (→). H.-E.-Färbung

4.2.4 Histologische Untersuchungsbefunde der Leber

Die Leber wird von einer kollagenfaserigen Kapsel umgeben, die außen (Tunica serosa) aus einer einschichtigen Lage flacher Serosadeckzellen besteht. Die Kapsel ist durchsetzt mit vereinzelt neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten. Das Bindegewebe (Abb. 4.5, s.u.) im Bereich der periportal Felder ist mittelgradig ödematisiert und geringgradig infiltriert mit Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten sowie vereinzelt Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Perivaskulär kann multifokal eine geringgradige gemischtzellige Infiltration mit Beteiligung von einzelnen Lymphozyten/-blasten und eosinophilen Granulozyten sowie ganz vereinzelt Makrophagen und neutrophilen Granulozyten beobachtet werden. Die Gallengänge bestehen aus isoprismatischen Epithelzellen mit einem zentralen, rund-ovalen, normochromatischen Kern, der von kompaktem, schwach eosinophilem Zytoplasma umgeben ist. Meist regulär, zum Teil aber auch geringgradig irregulär ausgebildete Leberzellbalken prägen das Bild des Parenchyms. Die polygonalen Hepatozyten besitzen einen zentral liegenden, rund bis rund-ovalen hyperchromen Zellkern, der von einem aufgelockerten bzw. leicht granulären, teils schaumigen, teils vakuolisierten, mittelgradig eosinophilen Zytoplasma umgeben wird. Mittels PAS-Reaktion (s. Abb. 4.8, S. 47) und Sudan-III-Färbung (s. Abb. 4.9, S. 47) lässt sich nachweisen, dass das Zytoplasma sowohl größere Mengen Glykogen als auch, zu einem geringeren Anteil, Fett enthält. Daneben kann im Parenchym multifokal, teils konfluierend, eine mittelgradige extramedulläre Hämatopoese nachgewiesen werden. Erkennbar ist eine mittelgradige Erythropoese, eine geringgradige Myelo- und Lymphopoese sowie eine dezente Thrombozytopoese. Im Bereich der Sinus befinden sich mehrere von Kupffersche-Sternzellen.

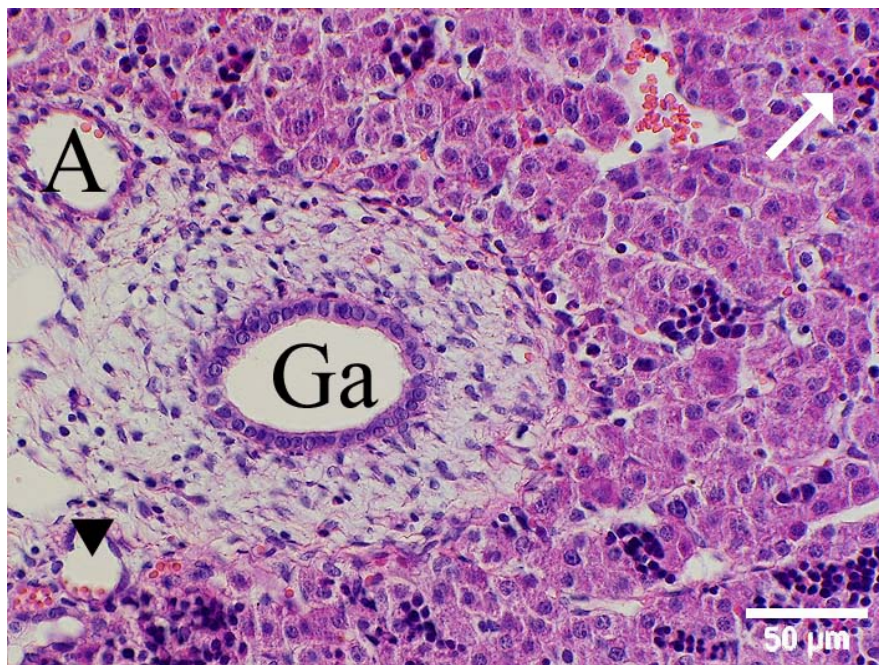


Abb. 4.5: Histologische Befunde an der Leber: Im Periportalfeld befindet sich ein Gallengang (**Ga**), eine Arteriole (**A**) und eine Venule (**Pfeilspitze**), umgeben von mittelgradig ödematisiertem Bindegewebe. Zwischen den Hepatozyten liegen multifokal Zellhaufen hämatopoetisch aktiver Zellen, wie z.B. Normoblasten (**Pfeil**). H.-E.-Färbung

4.2.5 Histologische Untersuchungsbefunde des Knochenmarks

Neben vereinzelt Knochenbälkchen setzt sich das Knochenmark aus ca. 60% Erythrozyten bzw. Erythro-/Normoblasten, 30% Lymphozyten/Monozyten/-blasten, 9% Myelozyten/-blasten und 1% Megakaryozyten/-blasten zusammen.

Die Knochenbälkchen (s. Abb. 4.6, S. 45) befinden sich im Stadium der Verknöcherung, wobei noch mehrere Knorpelinseln sichtbar sind. Im Randbereich der Knochenbälkchen reihen sich multifokal zahlreiche Osteoblasten auf, daneben sind vereinzelte Osteoklasten zu beobachten.

Im Knochenmark können massenhaft kernlose Erythrozyten und Erythro- bzw. Normoblasten nachgewiesen werden. Die Erythro- bzw. Normoblasten sind rund bis oval geformt und haben einen rund-ovalen, kleinen bis mittelgroßen hyperchromatischen, zentral gelegenen Zellkern. Die geringen Mengen des Zytoplasmas sind kompakt und mittel- bis hochgradig eosinophil gefärbt. Das Kern-Plasma-Verhältnis beträgt ca. 85 : 15. Vereinzelt können Mitosefiguren nachgewiesen werden.

Die zahlreichen Lymphozyten/-blasten sind rund bis oval und besitzen einen relativ großen zentralen, hyperchromatischen Zellkern, der meist von geringen Mengen eines kompakt bis aufgelockerten, gering- bis mittelgradig basophilen Zytoplasmas umgeben wird. Ihr Kern-Plasma-Verhältnis beträgt ca. 85 : 15.

Die runden Myeloblasten haben mittelgroße, polygonale, hyperchromatische und zentrale Zellkerne. Das in geringen Mengen vorhandene kompakte Zytoplasma ist mittelgradig eosinophil gefärbt. Ihr Kern-Plasma-Verhältnis beträgt ca. 75 : 25. Vereinzelt können Mitosefiguren nachgewiesen werden.

Im Knochenmark treten vereinzelte Megakaryoblasten auf. Sie sind polygonal geformt und besitzen zentral einen großen, polygonalen, hyperchromatischen Zellkern. Dieser wird von einer sehr großen Menge eines kompakten, schwach eosinophilen Zytoplasmas umgeben. Das Kern-Plasma-Verhältnis beträgt ca. 25 : 75.

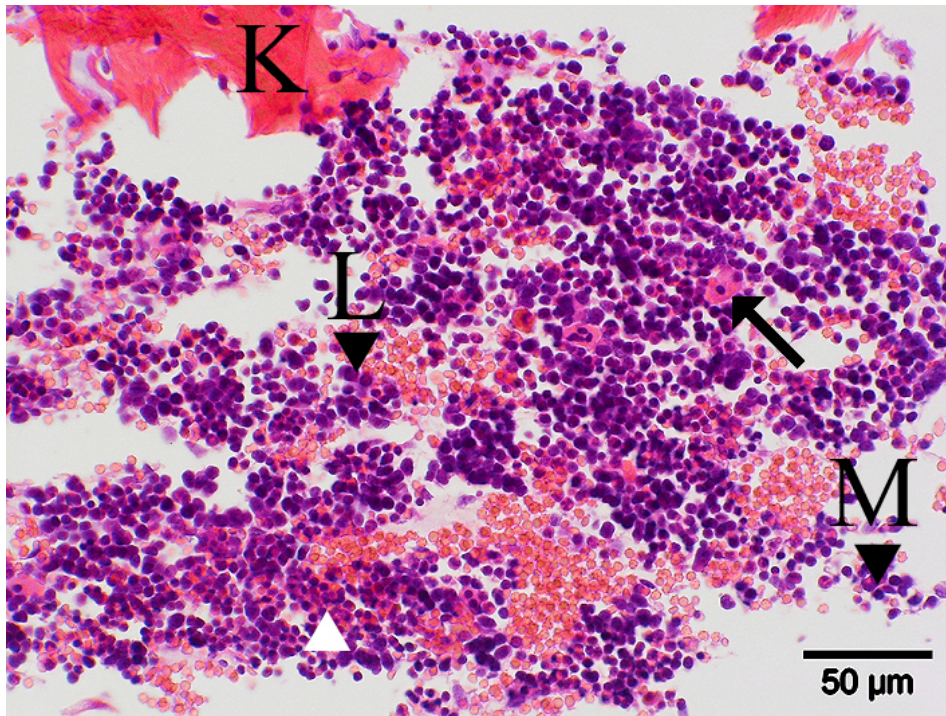


Abb. 4.6: Histologische Befunde am Knochenmark: Knochenmark mit Nachweis von Knochenbälkchen (**K**), Erythropoese (**Pfeilspitze**), Lymphopoese (**L** →), Myelopoese (**M** →) und Thrombozytopoese (**Pfeil**) sowie massenhaft ausdifferenzierten Erythrozyten. H.-E.-Färbung

4.2.6 Histologische Untersuchungsbefunde des Dünndarms

Die Ergebnisse der histomorphologischen Untersuchung des Duodenums, Jejunums und Ileums sind nahezu identisch, so dass die Ergebnisse im Folgenden detailliert am Beispiel des Duodenums beschrieben werden und lediglich auf signifikante Unterschiede zwischen den Darmabschnitten eingegangen wird.

Die Tunica mucosa (s. Abb. 4.7, S. 46) weist in allen drei Darmabschnitten zahlreiche, in der Länge variierende Darmzotten auf. Das lumenale Epithel ist einreihig und dessen Einzelzellen (Enterozyten) sind hochprismatisch. Die rund-ovalen, normochromen Zellkerne sind teils basal, teils zentral oder aber apikal lokalisiert und von einem schwach eosinophilen, aufgelockerten, teils vakuolisierten Zytoplasma umgeben. Zwischen den Enterozyten können vereinzelte PAS-positive (s. Abb. 4.10, S. 47) Becherzellen nachgewiesen werden, deren Anzahl im Verlauf von Duodenum zu Ileum leicht zunimmt. Daneben treten sehr vereinzelt Paneth-Zellen auf, die sich durch ein deutlich granuläres, stark eosinophiles Zytoplasma auszeichnen. Mittels einer Bodian-Versilberung lassen sich die Granula der Paneth-Zellen als schwarze Punkte darstellen (s. Abb. 4.11, S. 47). Die Lamina propria mucosae ist geringgradig ödematisiert und mittelgradig diffus mononukleär infiltriert. Eine Lamina muscularis mucosae lässt sich in keinem der untersuchten Präparate nachweisen.

Die Tela submucosa des Duodenums und des Ileums ist mittelgradig ödematisiert, während die des Jejunums hingegen nur geringgradig ödematisiert ist. Sie weist eine geringgradige, multifokale, mononukleäre Infiltration mit vorwiegend Lymphozyten auf. Lymphfollikel können nicht nachgewiesen werden. Daneben schließt die Tela submucosa vereinzelte polygonale

Ganglienzellen (Plexus nervorum submucosus) mit einem hyperchromatischen Zellkern ein, der von einem teils eosinophilen, teils basophilen, schaumigen bis granulären Zytoplasma umgeben wird. In der Tela submucosa des Duodenums befinden sich Drüsennester, die ein einreihiges, regulär strukturiertes Drüsenepithel aufweisen. Die hochprismatischen, PAS-positiven Epithelzellen haben einen basal positionierten, abgeplatteten Zellkern und ein aufgelockertes und schwach eosinophiles Zytoplasma. In ihrer Morphologie passen diese Drüsennester am ehesten zu den Brunnerschen-Drüsen. Aufgrund der fehlenden Lamina muscularis mucosae, als Trennlinie zwischen der Tunica mucosa und der Tela submucosa, ist eine sichere Abgrenzung der Brunnerschen-Drüsen von den Krypten jedoch nicht möglich.

Das Stratum circulare der Tunica muscularis ist mittelgradig und das Stratum longitudinale geringgradig diffus vakuolisiert und ödematisiert. Mittels Spezialfärbungen konnten Fett- und Glykogen-Einlagerungen in den Vakuolen ausgeschlossen werden, wobei zu beachten ist, dass die Gewebeproben zeitweise in einer wässrigen Formalinlösung aufbewahrt wurden. Das Stratum circulare ist ca. eineinhalb bis drei Mal so breit wie das Stratum longitudinale. Die schmale Schicht des Stratum intermusculare ist gering- bis mittelgradig ödematisiert und multifokal geringgradig mit Lymphozyten infiltriert. Daneben befinden sich mehrere Ganglienzellen (Plexus nervorum myentericus), die in ihrer Morphologie denen der Tela submucosa entsprechen.

Die Serosaschicht besteht aus der Tunica serosa, die oberflächlich ein einschichtiges Plattenepithel (Mesothel) aufweist, und einer darunter liegenden bindegewebigen Tela subserosa. Letztere ist teils gering-, teils mittelgradig ödematisiert und weist eine gering- bis teils mittelgradige, multifokale mononukleäre Infiltration mit vorwiegend Lymphozyten auf.

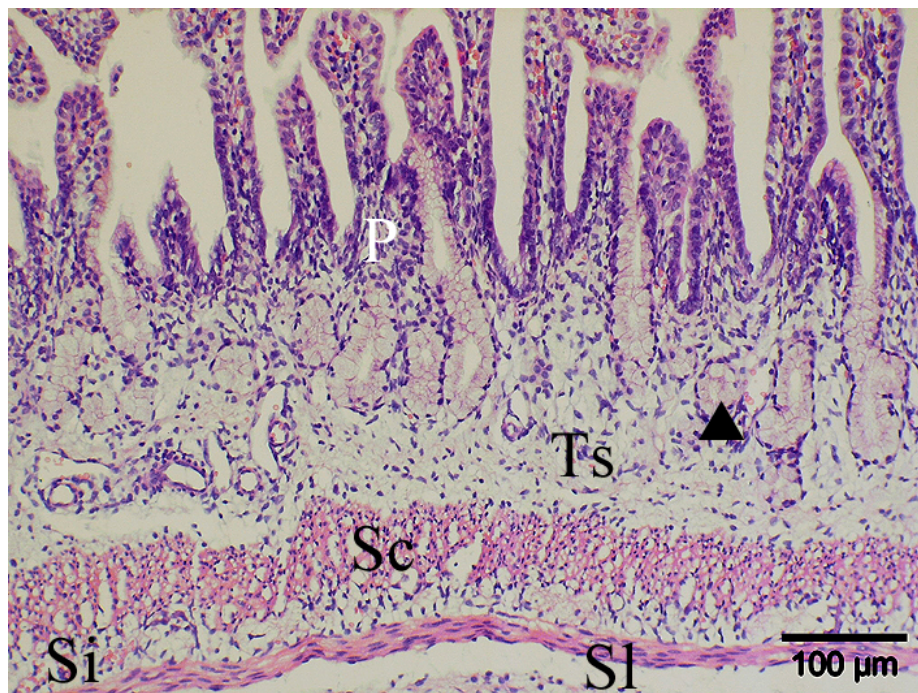


Abb. 4.7: Histologische Befunde am Duodenum: Lamina propria (**P**), Tela submucosa (**Ts**) (mittelgradig diffus ödematisiert, daneben Strukturen, die am ehesten zu Brunnerschen Drüsen (**Pfeilspitze**) passen), Tunica muscularis mit Stratum circulare (**Sc**) (mittelgradig diffus vakuolisiert und ödematisiert), Stratum intermusculare (**Si**) (mittelgradig diffus ödematisiert) und Stratum longitudinale (**Sl**) (geringgradig multifokal vakuolisiert und ödematisiert). H.-E.-Färbung

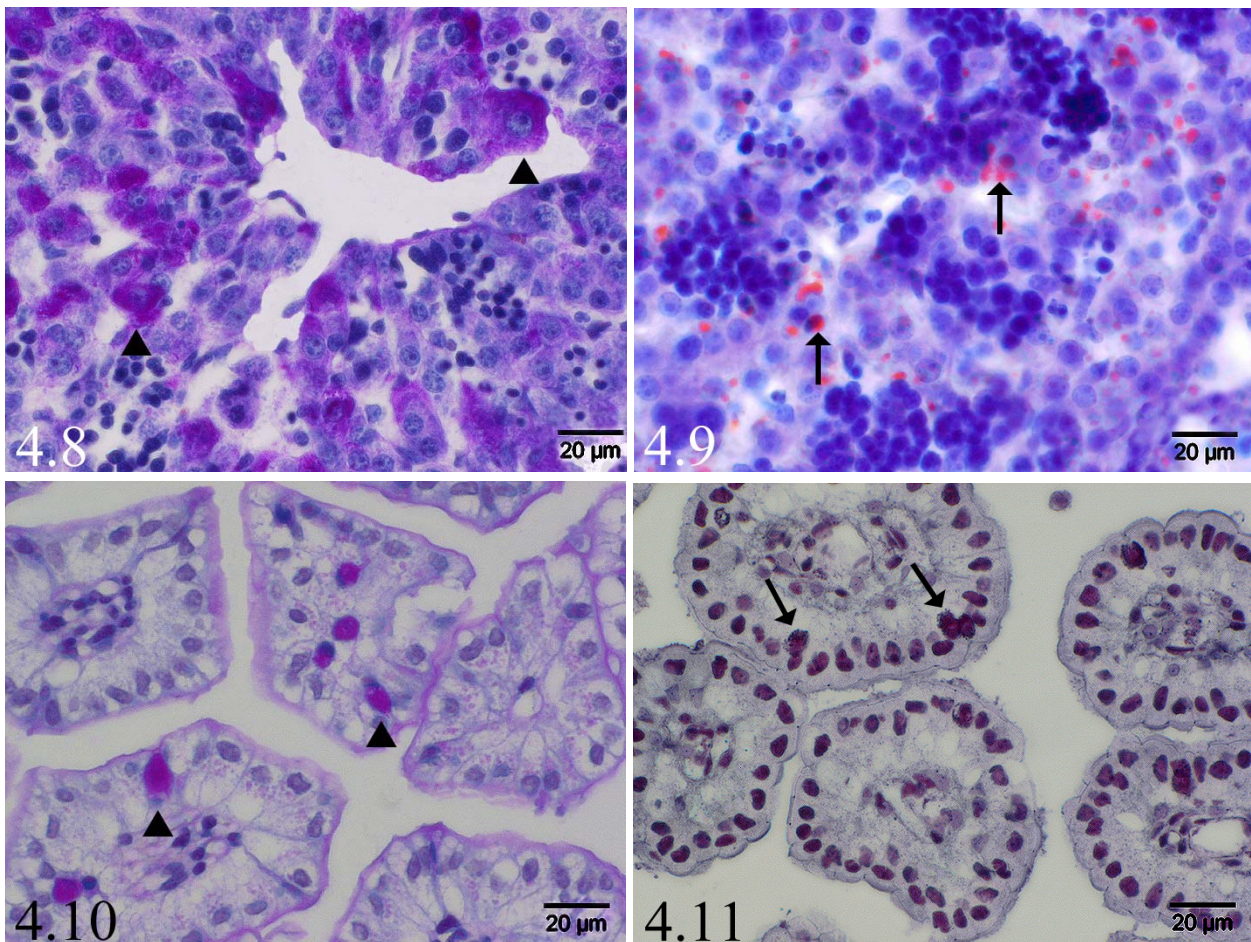


Abb. 4.8: Histologische Befunde an der Leber: Nachweis von mittelgradig Glykogen im Zytoplasma zahlreicher Hepatozyten (**Pfeilspitzen**). PAS-Reaktion

Abb. 4.9: Histologische Befunde an der Leber: Nachweis von gering- bis mittelgradig Fett im Zytoplasma zahlreicher Hepatozyten (**Pfeile**). Sudan-III-Färbung

Abb. 4.10: Histologische Befunde am Duodenum: multifokal Nachweis einzelner PAS-positiver Becherzellen im Bereich der Lamina epithelialis (**Pfeilspitzen**). PAS-Reaktion

Abb. 4.11: Histologische Befunde am Duodenum: multifokal Nachweis vereinzelter Paneth-Zellen im Bereich der Lamina epithelialis. Die Granula der Paneth-Zellen sind versilberbar und stellen sich in der Abb. als schwarze Punkte dar (**Pfeile**). Bodian-Versilberung

4.3 Immunhistologische Untersuchungsbefunde

Im Rahmen der immunhistologischen Untersuchung von Lymphknoten, Thymus, Milz, Leber, Dünndarm und Knochenmark konnten, mit zwei Ausnahmen (s. Kap. 4.4, S. 59), bei keinem der eingesetzten Marker gruppenspezifische, d.h. von der DON-Belastung abhängige Unterschiede nachgewiesen werden. Die nachfolgenden Beschreibungen sind demnach ein allgemeiner Überblick über die immunhistologische Charakterisierung der genannten Organe 70 Tage alter Schweinefeten. Die in den folgenden Unterkapiteln angegebenen quantitativen Angaben zu B- und T-Lymphozyten (CD3 u. CD79a), Makrophagen u. Monozyten (MAC 387) und proliferativ aktiven Zellen (Ki-67 Antigen) beruhen auf den Gruppen-Medianwerten. Die Expressionsintensität von Caspase 3 und 9 sowie p-p38 MAP-Kinase wird mittels des immunreaktiven Scores (IRS) (vgl. Kap. 3.1.4.1, S. 36) angegeben. Zudem sind im Anhang in Kap. 9.7 (S. 104) die Werte aller Parameter im Rahmen der deskriptiven Statistik dargestellt.

4.3.1 Immunhistologische Untersuchungsbefunde der Mesenteriallymphknoten

Mittels immunhistologischer Untersuchung der Mesenteriallymphknoten (n = 17) können im Bereich des „Cortex like tissue“ diffus zahlreiche T-Lymphozyten/-blasten (CD3) mehrere B-Lymphozyten/-blasten (CD79a) sowie einzelne Makrophagen (MAC 387) beobachtet werden. Daneben finden sich multifokal einzelne MAC 387-positive Zellen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit dem lymphoretikulären Gewebe zuzuordnen sind. Diffus über das „Cortex like tissue“ verteilt sind hauptsächlich Lymphozyten sowie einige Fibroblasten und Endothelzellen proliferativ aktiv (Ki-67 Antigen-positiv). Multifokal können vereinzelt Caspase 3- und einzelne Caspase 9- sowie p-p38 MAP-Kinase-positive Zellen nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Lymphozyten/-blasten und einige Fibroblasten.

Im „Medulla like tissue“ befinden sich diffus verteilt einzelne T-Lymphozyten/-blasten (CD3), multifokal vereinzelt B-Lymphozyten/-blasten (CD79a) sowie, am Übergang zum „Cortex like tissue“ und dieses zumeist umgebend, mehrere Makrophagen (MAC 387). Daneben lassen sich mittels Ki-67 Antigen diffus mehrere proliferativ aktive Lymphozyten/-blasten und Fibroblasten sowie einzelne Endothelzellen beobachten. Caspase 3-positive Zellen kamen im „Medulla like tissue“ nicht vor. Hingegen sind einzelne Lymphozyten/-blasten und vereinzelt Fibroblasten Caspase 9- sowie einzelne Fibroblasten und vereinzelt Lymphozyten/-blasten p-p38 MAP-Kinase-positiv.

Zudem reagieren sowohl im „Cortex like tissue“ als auch „Medulla like tissue“ multifokal vereinzelt mononukleäre Zellen TNF- α -positiv (s. Abb. 4.12, S. 57/58). Daneben können vereinzelt Reaktionsmuster nachgewiesen werden, die keinen spezifischen Zellstrukturen zuzuordnen sind.

Das Expressionsverhalten ausgewählter Zellpopulationen in Bezug auf Caspase 3 und 9, p-p38 MAP-Kinase und TNF- α ist in Tab. 4.1 (S. 49) dargestellt.

Tab. 4.1: Expressionsintensität ausgewählter Zellen der Mesenteriallymphknoten

	Caspase 3	Caspase 9	p-p38	TNF- α
„Cortex like tissue“ - Lymphozyten/-blasten - lymphoretikuläres Gewebe	Ø bis (+) Ø	(+) bis + (+) bis +	(+) Ø	+ bis ++)* Ø
„Medulla like tissue“ - Gefäßendothel - Fibroblasten - Lymphozyten/-blasten	Ø Ø Ø	Ø (+) bis + (+) bis +	Ø (+) (+)	Ø Ø Ø bis ++)*

Legende zu Tab. 4.1: Ø: kein Nachweis; (+): IRS < 1; +: IRS 1-2; ++: IRS 2,1-3,4; p-p38: phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase; TNF- α : Tumor-Nekrose-Faktor- α ; * der Wert bezieht sich auf mononukleäre Zellen

4.3.2 Immunhistologische Untersuchungsbefunde der Mediastinallymphknoten

Sechs Sternallymphknoten wurden immunhistologisch untersucht. Hierbei konnten in den im „Cortex like tissue“ befindlichen *Follikeln* diffus zahlreiche B-Lymphozyten/-blasten (CD79a) sowie multifokal vereinzelte T-Lymphozyten/-blasten (CD3) nachgewiesen werden. Im angrenzenden *Parakortex* befinden sich diffus mehrere T-Lymphozyten/-blasten (CD3) sowie einzelne B-Lymphozyten/-blasten (CD79a) (s. Abb. 4.13 u. 4.14, S. 57/58). Daneben lassen sich diffus einzelne Makrophagen (MAC 387) beobachten. Vereinzelt MAC 387-positive Zellen passen in ihrer Morphologie zu Zellen des lymphoretikulären Gewebes. Sowohl in den *Follikeln* als auch im *Parakortex* sind mehrere diffus verteilte Lymphozyten/-blasten und einzelne Zellen des lymphoretikulären Gewebes proliferativ aktiv (Ki-67 Antigen).

In den *Follikeln* können multifokal ganz vereinzelte Caspase 3-, einzelne p-p38 MAP-Kinase- und mehrere Caspase 9-positive Zellen nachgewiesen werden; im *Parakortex* einzelne Caspase 9- und p-p38 MAP-Kinase-positive Zellen. Es handelt sich hauptsächlich um Lymphozyten/-blasten und einige Fibroblasten.

Im „Medulla like tissue“ befinden sich diffus einzelne T-Lymphozyten/-blasten (CD3), multifokal vereinzelte B-Lymphozyten/-blasten (CD79a) sowie am Übergang zum „Cortex like tissue“, dieses zumeist umgebend, mehrere Makrophagen (MAC 387). Mehrere diffus verteilte Lymphozyten/-blasten, Granulozyten und Fibroblasten sowie multifokal einzelne Gefäßendothelien sind proliferativ aktiv. Caspase 3-positive Zellen können im „Medulla like tissue“ nicht nachgewiesen werden. Hingegen sind einzelne Lymphozyten/-blasten und Fibroblasten Caspase 9- sowie einzelne Fibroblasten und vereinzelte Lymphozyten/-blasten p-p38 MAP-Kinase-positiv.

Zudem reagieren sowohl im „Cortex like tissue“ als auch im „Medulla like tissue“ multifokal vereinzelte mononukleäre Zellen TNF- α -positiv. Daneben können vereinzelte Reaktionsmuster nachgewiesen werden, die keinen spezifischen Zellstrukturen zuzuordnen sind.

Das Expressionsverhalten ausgewählter Zellpopulationen in Bezug auf Caspase 3 und 9, p-p38 MAP-Kinase und TNF- α ist in Tab. 4.2 (S. 50) dargestellt.

Tab. 4.2: Immunhistologisches Expressionsverhalten ausgewählter Zellen der Sternal-lymphknoten

	Caspase 3	Caspase 9	p-p38	TNF- α
„Cortex like tissue“				
- Follikel: Lymphozyten/-blasten	Ø bis (+)	(+) bis +	(+)	+(+)*
- Follikel: lymphoretikuläres Gewebe	Ø	(+) bis +	Ø	Ø
- Parakortex: Lymphozyten/-blasten	Ø	(+) bis +	(+)	+(+)*
- Parakortex: lymphoretikuläres Gewebe	Ø	(+) bis +	Ø	Ø
„Medulla like tissue“				
- Gefäßendothel	Ø	Ø	Ø	Ø
- Fibroblasten	Ø	(+) bis +	(+)	Ø
- Lymphozyten/-blasten	Ø	(+) bis +	(+)	+(+)*

Legende zu Tab. 4.2: Ø: kein Nachweis; (+): IRS < 1, +: IRS 1-2; +(>): IRS 2,1-3,4; p-p38: p-p38 phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase; TNF- α : Tumor-Nekrose-Faktor- α ; * der Wert bezieht sich auf mononukleäre Zellen

4.3.3 Immunhistologische Untersuchungsbefunde des Thymus

Mittels der immunhistologischen Untersuchung der Thymi (n = 17) können im Bereich des Kortex diffus mehrere schwach positive T-Lymphozyten/-blasten (CD3) sowie multifokal vereinzelte B-Lymphozyten/-blasten (CD79a) und einzelne Makrophagen (MAC 387) (s. Abb. 4.15, S. 57) nachgewiesen werden. Das Verhältnis von T- und B-Lymphozyten zueinander beträgt ca. 95 zu 5 %. Im Rahmen des Nachweises der Proliferationsaktivität mit Hilfe des Ki-67 Antigens erweisen sich diffus zahlreiche Lymphozyten/-blasten und multifokal vereinzelt Makrophagen als positiv. Mehrere Lymphozyten/-blasten sind Caspase 9-positiv. Ihre Expressionsintensität erreicht einen errechneten IRS zwischen 0,7 und 0,8. Im Bereich der Medulla befinden sich diffus zahlreiche T-Lymphozyten/-blasten (CD3) und einzelne B-Lymphozyten/-blasten (CD79a) sowie multifokal einzelne Makrophagen (MAC 387). Das Verhältnis von T- und B-Lymphozyten zueinander beträgt ca. 90 zu 10 %. Diffus zahlreiche Lymphozyten/-blasten und multifokal vereinzelte Makrophagen erweisen sich als Ki-67 Antigen-positiv. Einzelne Lymphozyten/-blasten sind Caspase 9 positiv. Der errechnete IRS der Caspase 9 liegt zwischen 0,6 und 0,8. Zudem sind sämtliche in der Medulla befindlichen Hassall-Körperchen MAC 387- (s. Abb. 4.15, S. 57/58) und einzelne CD79a-positiv.

4.3.4 Immunhistologische Untersuchungsbefunde der Milz

Im Rahmen der immunhistologischen Untersuchung der Milzen (n = 36) können im Bereich der Tunica serosa multifokal ganz vereinzelte p-p38 MAP-Kinase-positiv und einzelne proliferativ aktive (Ki-67 Antigen) Serosadeckzellen nachgewiesen werden. Daneben sind multifokal vereinzelte Zellen MAC 387-positiv, wobei nicht sicher zwischen Serosadeckzellen und Makrophagen differenziert werden kann. In der Tunica subserosa befinden sich multifokal vereinzelte MAC 387-positiv Zellen sowie vereinzelte proliferativ aktive (Ki-67 Antigen) Fibroblasten. In den Trabekeln kommen multifokal einzelne proliferativ aktive Fibroblasten (Ki-67

Antigen) vor. Im Bereich der roten Pulpa können diffus zahlreiche T-Lymphozyten/-blasten (CD3) und einzelne bis mehrere B-Lymphozyten/-blasten (CD79a) beobachtet werden. Zudem exprimieren zahlreiche Megakaryozyten/-blasten ebenfalls CD3. Daneben sind multifokal einzelne Zellen MAC 387-positiv, deren Morphologie zu Makrophagen/Monozyten/-blasten bzw. Zellen des lymphoretikulären Gewebes passt. Einige Zellen des lymphoretikulären Gewebes sind zudem Caspase 3- und 9-positiv. In Bezug auf die Zellen der Hämatopoese der roten Pulpa wird an dieser Stelle lediglich von Blasten gesprochen und auf eine weitere Differenzierung der Entwicklungsstadien der einzelnen Zelltypen verzichtet. Die hämatopoetischen Zellen in diesem Organ sind im immunhistologischen Präparat anhand ihrer Morphologie nicht sicher zu unterscheiden. Eine proliferative Aktivität ist mittels Ki-67 Antigen bei zahlreichen Lymphoblasten und Megakaryoblasten, mehreren Myeloblasten sowie einzelnen Erythroblasten nachweisbar. Caspase 3-positiv sind einzelne Lymphoblasten sowie nahezu sämtliche Megakaryoblasten. Zahlreiche Megakaryoblasten und mehrere Lymphoblasten exprimieren Caspase 9. Zudem sind mehrere Megakaryoblasten und vereinzelt Lymphoblasten p-p38 MAP-Kinase-positiv. (s. Abb 4.16 u. 4.17, S. 57/58). In der weißen Pulpa lassen sich im Bereich der perifollikulären Lymphozytenscheiden zahlreiche T-Lymphozyten/-blasten (CD3) und einzelne B-Lymphozyten/blasten (CD79a) nachweisen. Einzelne dieser Lymphozyten/-blasten zeigen eine proliferative Aktivität (Ki-67 Antigen) sowie eine positive Reaktion für Caspase 3 und/oder 9. Weiterhin sind multifokal einzelne Endothelzellen der Arterien aus den perifollikulären Lymphozytenscheiden proliferativ aktiv (Ki-67 Antigen). Das Expressionsverhalten ausgewählter Zellpopulationen in Bezug auf Caspase 3 und 9 sowie auf p-p38 MAP-Kinase ist in Tab. 4.3 dargestellt.

Tab. 4.3: Expressionsintensität ausgewählter Zellen der Milz

	Caspase 3	Caspase 9	p-p38
Tunica serosa: Serosadeckzellen	∅	∅	∅ bis (+)
Tela subserosa: Fibroblasten/-zyten	∅	∅	∅
Trabekel: Fibroblasten/-zyten	∅	∅	∅
Rote Pulpa:			
- Lymphoblasten	(+) bis ++)	(+) bis ++)	∅ bis (+)
- Myeloblasten	∅	∅	∅
- Erythroblasten	∅	∅	∅
- Megakaryoblasten	(+)	(+)	(+) bis ++)
- lymphoretikuläres Gewebe	(+) bis ++)	(+)	∅
Weißer Pulpa:			
- perif. Lymphozytenscheiden: Lympho.	∅ bis +	∅ bis (+)	∅
- Gefäßendothel	∅	∅	∅

Legende zu Tab. 4.3: ∅: kein Nachweis; (+): IRS < 1; +: IRS 1-2; ++): IRS 2,1-3,4; Lympho.: Lymphozyten/-blasten; perif. Lymphozytenscheiden: perifollikuläre Lymphozytenscheiden; p-p38: p-p38 phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase

4.3.5 Immunhistologische Untersuchungsbefunde der Leber

Im Rahmen der immunhistologischen Untersuchung der Lebern (n = 36) können im Bereich der Tunica serosa multifokal vereinzelt proliferationsaktive Serosadeckzellen (Ki-67 Antigen) nachgewiesen werden. Daneben exprimieren multifokal vereinzelte Zellen MAC 387. Bei diesen kann nicht sicher zwischen Serosadeckzellen und Makrophagen differenziert werden. Multifokal sind vereinzelte Serosadeckzellen und Fibroblasten/-zyten Caspase 3- und -9-positiv; einzelne sind p-p38 MAP-Kinase-positiv.

Im periportalen Bindegewebe können multifokal mehrere Makrophagen (MAC 387) sowie einzelne proliferationsaktive (Ki-67 Antigen) und zahlreiche p-p38 MAP-Kinase-positive mononukleäre Zellen und Fibroblasten/-zyten identifiziert werden. Daneben sind zahlreiche Endothelzellen arterieller und venöser Gefäße der Portalfelder p-p38 MAP-Kinase-positiv. Vereinzelt Caspase 9-positiv Zellen, hauptsächlich Lymphozyten/-blasten, sind vertreten. Bei den Lebern einiger Tiere sind zudem vereinzelte Lymphozyten/-blasten Caspase 3-positiv.

Nahezu sämtliche Gallengangepithelzellen sind proliferativ aktiv (Ki-67 Antigen) und p-p38 MAP-Kinase-positiv. In einigen Lebern sind vereinzelte Gallengangepithelzellen Caspase 3- und -9-positiv.

Mehrere Endothelzellen der Zentralvenen sind proliferativ aktiv (Ki-67 Antigen). Daneben können mittels MAC 387 vereinzelte Kupfferzellen im Bereich der Sinusoide nachgewiesen werden.

Nahezu sämtliche Hepatozyten sind proliferativ aktiv (Ki-67 Antigen) sowie mehrere Caspase 9-positiv (s. Abb. 4.18 u. 4.19, S. 57/58).

In Bezug auf die Zellen der Hämatopoese wird an dieser Stelle zusammenfassend lediglich von Blasten gesprochen und auf eine weitere Differenzierung der Entwicklungsstadien der einzelnen Zelltypen verzichtet. Die hämatopoetischen Zellen in diesem Organ sind im immunhistologischen Präparat anhand ihrer Morphologie nicht sicher zu unterscheiden. Eine proliferative Aktivität mittels Ki-67 Antigen zeigen zahlreiche Lymphoblasten und Myeloblasten, einzelne Erythroblasten sowie nahezu sämtliche Megakaryoblasten. Vereinzelt Lymphoblasten sowie nahezu sämtliche Megakaryoblasten sind Caspase 3-positiv. Zahlreiche Lymphoblasten, mehrere Erythroblasten sowie nahezu sämtliche Megakaryoblasten exprimieren Caspase 9. p-p38-MAP-Kinase-positiv sind zahlreiche Erythroblasten sowie mehrere Lymphoblasten und Megakaryoblasten. Daneben sind multifokal einzelne, teils in Clustern liegende hämatopoetisch aktive Zellen, in der Morphologie zu gleichen Teilen passend zu Monoblasten und Myeloblasten, MAC 387-positiv.

Das Expressionsverhalten ausgewählter Zellpopulationen in Bezug auf Caspase 3 und 9 sowie p-p38 MAP-Kinase ist in Tab. 4.4 (S. 53) dargestellt.

Tab. 4.4: Expressionsintensität ausgewählter Zellen der Leber

	Caspase 3	Caspase 9	p-p38
Tunica serosa : Serosadeckzellen	Ø bis (+)	Ø bis (+)	Ø bis ++
Hepatozyten	(+) bis +	+ bis ++(+)	(+) bis ++(+)
Hämatopoetisch aktive Zellen			
- Megakaryoblasten	+ bis ++	Ø bis +	+ bis ++(+)
- Lymphoblasten	Ø bis (+)	+(+) bis ++(+)	(+) bis ++(+)
- Erythroblasten	Ø	(+) bis ++(+)	+(+) bis ++(+)
- Myeloblasten	Ø	Ø	Ø
Periportalbereiche:			
- Lymphozyten/-blasten	Ø bis ++(+)	(+) bis ++(+)	+ bis ++
- Gallengangepithelzellen	Ø bis +	Ø bis +	+ bis ++(+)
Endothelzellen der Zentralvenen	Ø	Ø	Ø

Legende zu Tab. 4.4: Ø: kein Nachweis; (+): IRS < 1; +: IRS 1-2; ++(+): IRS 2,1-3,4; ++: IRS 3,6-5,0; ++(+): IRS 5,1-7,0; p-p38: phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase

4.3.6 Immunhistologische Untersuchungsbefunde des Knochenmarks

Die immunhistologische Untersuchung des Knochenmarks (n = 36) verlief mit folgendem Ergebnis:

Es können diffus verteilt zahlreiche T-Lymphozyten/-blasten (CD3) und B-Lymphozyten/-blasten (CD79a) sowie Makrophagen/Monozyten bzw. -blasten (MAC 387) nachgewiesen werden. Die T-Lymphoblasten/-zyten machen ca. 15% und die B-Lymphoblasten/-zyten ebenfalls ca. 15% der gesamten Knochenmarkzellen aus.

Ca. 45% der Knochenmarkzellen, v.a. jene in blastoiden Entwicklungsstadien (Lymphoblasten > Myeloblasten > Erythroblasten > Megakaryoblasten), zeigen mittels Ki-67 Antigen eine Proliferationsaktivität.

Ca. 20% der Knochenmarkzellen, v.a. jene in blastoiden Entwicklungsstadien (Megakaryoblasten > Lymphoblasten > Myeloblasten), sind Caspase3-positiv.

Ca. 25% der Knochenmarkzellen, v.a. jene in blastoiden Entwicklungsstadien (Lymphoblasten > Megakaryoblasten > Myeloblasten), sind Caspase9-positiv.

Ca. 16% der Knochenmarkzellen, v.a. jene in blastoiden Entwicklungsstadien (Megakaryoblasten > Lymphoblasten > Myeloblasten > Erythroblasten), sind p-p38 MAP-Kinase-positiv.

Ca. 7% der Knochenmarkzellen, v.a. jene in blastoiden Entwicklungsstadien (mononukleäre Zellen > Megakaryoblasten), sind TNF-α-positiv.

Der prozentuale Anteil positiver Zellen pro Zellpopulation bzw. von sämtlichen Knochenmarkzellen ausgewählter Marker ist in Tab. 4.5 (S. 54) angegeben. Das Expressionsverhalten ausgewählter Zellpopulationen in Bezug auf Caspase 3 und 9, p-p38 MAP-Kinase und TNF-α ist in Tab. 4.6 (S. 54) angegeben.

Tab. 4.5: Prozentualer Anteil immunhistologisch positiver Zellen im Knochenmark

	Ki-67 Antigen	Caspase 3	Caspase 9	p-p38	TNF- α
Positive Zellen des KM	45,6%	20,2%	25,3%	16,7%	7,2%
Lymphoblasten	60,2%	16,6%	26%	14,6%	7,2%*
Myeloblasten	68,8%	5%	5%	6%	0%
Erythroblasten	11,1%	0%	0%	6%	0%
Megakaryoblasten	58%	100%	25%	100%	20%

Legende zu Tab. 4.5: KM: Knochenmark; p-p38: phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase; TNF- α : Tumor-Nekrose-Faktor- α ; * der Wert bezieht sich auf alle mononukleären Zellen

Tab. 4.6: Expressionsintensität ausgewählter Zellen des Knochenmarks

	Caspase 3	Caspase 9	p-p38	TNF- α
Lymphoblasten	(+)	(+)	(+) bis ++	Ø bis +*
Myeloblasten	Ø bis (+)	Ø bis (+)	Ø bis (+)	Ø
Erythroblasten	Ø	Ø	Ø bis (+)	Ø
Megakaryoblasten	(+) bis ++	Ø bis +	(+) bis ++	Ø bis +

Legende zu Tab. 4.6: Ø: kein Nachweis; (+): IRS < 1; ++: IRS 1-2; +++: IRS 2,1-3,4; ++++: IRS 3,6-5,0; p-p38: phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase; TNF- α : Tumor-Nekrose-Faktor- α ; * der Wert bezieht sich auf alle mononukleären Zellen

4.3.7 Immunhistologische Untersuchungsbefunde des Dünndarms

Die immunhistologische Untersuchung der Dünndarmabschnitte (Duodenum, Jejunum und Ileum) erfolgte an den Proben von allen 36 Feten. Der Übersicht halber sind das quantitative Expressionsverhalten von Ki-67 Antigen in Tab. 4.7 (S. 55) sowie der IRS der von Caspase 3 und 9 sowie von p-p38 MAP-Kinase in den Tabellen 4.8 bis 4.10 (S. 56) dargestellt. Im folgenden erfolgt eine zusammenfassende Deskription für alle drei untersuchten Darmabschnitte. Abweichungen oder Besonderheiten werden an entsprechender Stelle explizit erwähnt.

Im Bereich des Epithelium mucosae exprimieren vor allem die Enterozyten Ki-67 Antigen, und zwar im Krypten- etwas zahlreicher als im Zottenbereich. Daneben gibt es einzelne Ki-67 Antigen-positiv Becherzellen und vereinzelte Panethzellen. Caspase 3- und 9- und p-p38 MAP-Kinase-positiv sind lediglich die Enterozyten, und zwar im Zotten- etwas zahlreicher als im Kryptenbereich.

In der Lamina propria mucosae können multifokal vereinzelte Makrophagen (MAC 387) sowie vereinzelte proliferativ aktive Fibroblasten (Ki-67 Antigen) nachgewiesen werden. Caspase 3- und 9- und p-p38 MAP-Kinase-positiv sind neben Fibroblasten/-zyten vor allem multifokal vereinzelte Lymphozyten.

In der Tela submucosa befinden sich multifokal vereinzelte Makrophagen (MAC 387). Daneben befinden sich mehrere proliferativ aktive (Ki-67 Antigen) Fibroblasten sowie einzelne Ganglienzellen des Plexus nervorum submucosus. Im Bereich des Duodenums sind darüber hinaus multifokal mehrere Zellen Ki-67 Antigen-positiv, die morphologisch am ehesten zu den

Drüsenzellen der Brunnerschen Drüsen passen (vgl. Kap. 4.2.6, S. 45). Caspase 3- und 9- und p-p38 MAP-Kinase-positiv sind etwa zu gleichen Teilen einzelne Fibroblasten/-zyten und Lymphozyten sowie einzelne Ganglienzellen des Plexus nervorum submucosus.

Im Bereich der Tunica muscularis sind einzelne Muskelzellen des *Stratum longitudinale* und *Stratum circulare* proliferativ aktiv (Ki-67-Antigen). Die Marker Caspase 3 und 9 sowie p-p38 MAP-Kinase sind aufgrund einer zu starken Hintergrundfärbung dieser Gewebeschichten nicht in die Auswertung mit eingeflossen. Im Stratum intermusculare sind multifokal einzelne Ganglienzellen des Plexus nervorum myentericus und Fibroblasten proliferativ aktiv (Ki-67 Antigen). Zudem sind einzelne Ganglienzellen sowie vereinzelt Fibroblasten Caspase 3- und 9- und p-p38 MAP-Kinase-positiv.

In der Serosaschicht zeigen hauptsächlich Fibroblasten und Endothelzellen der *Tela subserosa* sowie vereinzelt Mesothelzellen der *Tunica serosa* proliferative Aktivität (Ki-67 Antigen). Caspase 3- und 9- und p-p38 MAP-Kinase-positiv sind vor allem Fibroblasten und Lymphozyten der *Tela subserosa* sowie vereinzelt Mesothelzellen der *Tunica serosa*.

Tab 4.7: Quantitatives Expressionsverhalten ausgewählter Zellen des Dünndarms in Bezug auf das Ki-67 Antigen

	Ki-67 Antigen		
	Duodenum	Jejunum	Ileum
<u>Epithelium mucosae</u>			
- Zottenspitze: Enterozyten	+++	+++	+++
- Kryptenbereich: Enterozyten	+++	+++	+++
Lamina propria mucosae: Fibroblasten	+	+	+
Tela submucosa: Fibroblasten	++	+	+
<u>Tunica muscularis</u>			
- Stratum intermusculare: Ganglienzellen	++	++	++
Tela subserosa: Fibroblasten	++	+	+

Legende zu Tab. 4.7: +: vereinzelt; ++: einzelne; +++: mehrere

Tab. 4.8: Expressionsintensität ausgewählter Zellen des Duodenum

	Caspase 3	Caspase 9	p-p38
<u>Epithelium mucosae</u>			
- Zottenspitze: Enterozyten	(+) bis +++(+)	(+) bis +	(+) bis ++(+)
- Kryptenbereich: Enterozyten	(+) bis ++(+)	Ø bis +	(+) bis ++(+)
Lamina propria mucosae: Lymphozyten	Ø bis +	Ø bis +	Ø bis (+)
Tela submucosa: Lymphozyten	(+) bis +	(+) bis ++(+)	Ø bis +
Brunner Drüsen (Epithelzellen)	Ø bis +	Ø bis +	(+) bis +
<u>Tunica muscularis</u>			
- Stratum intermusculare: Ganglienzellen	(+) bis ++	(+) bis ++(+)	Ø bis +
Tela subserosa: Lymphozyten	(+) bis ++(+)	Ø bis +	Ø bis +

Legende zu Tab. 4.8: Ø: kein Nachweis; (+): IRS < 1; +: IRS 1-2; ++(+): IRS 2,1-3,4; ++: IRS 3,6-5,0; ++(+): IRS 5,1-7,0; p-p38: phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase

Tab. 4.9: Expressionsintensität ausgewählter Zellen des Jejunums

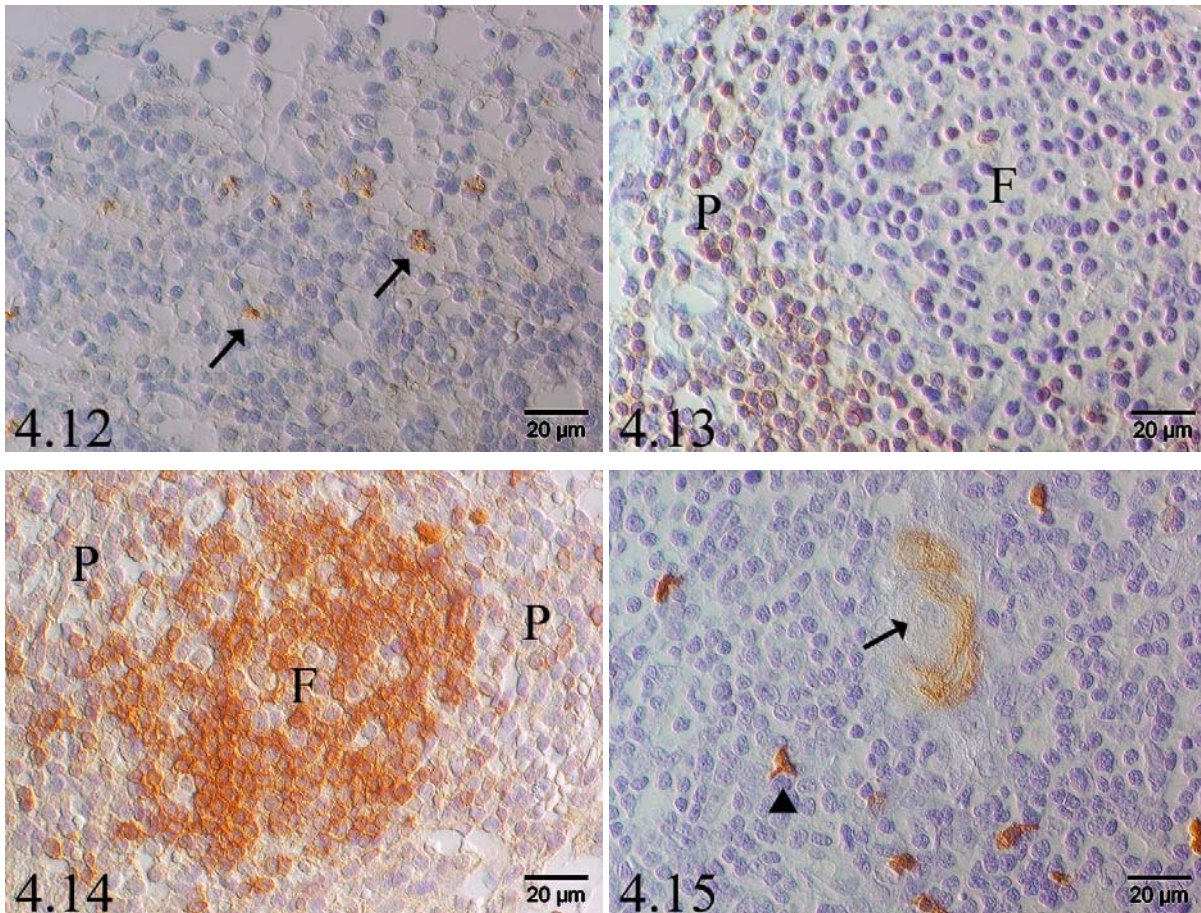
	Caspase 3	Caspase 9	p-p38
<u>Epithelium mucosae</u>			
- Zottenspitze: Enterozyten	(+) bis +++(+)	(+) bis +	Ø bis ++
- Kryptenbereich: Enterozyten	Ø bis ++(+)	(+) bis +	Ø bis ++(+)
Lamina propria mucosae: Lymphozyten	Ø bis +	Ø bis (+)	Ø bis (+)
Tela submucosa: Lymphozyten	(+) bis +	(+) bis +	(+)
<u>Tunica muscularis</u>			
- Stratum intermusculare: Ganglienzellen	(+) bis ++	(+) bis ++(+)	Ø bis (+)
Tela subserosa: Lymphozyten	Ø bis +	Ø bis +	Ø bis (+)

Legende zu Tab. 4.9: Ø: kein Nachweis; (+): IRS < 1; +: IRS 1-2; ++(+): IRS 2,1-3,4; ++: IRS 3,6-5,0; ++(+): IRS 5,1-7,0; p-p38: phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase

Tab. 4.10: Expressionsintensität ausgewählter Zellen des Ileums

	Caspase 3	Caspase 9	p-p38
<u>Epithelium mucosae</u>			
- Zottenspitze: Enterozyten	(+) bis +++(+)	(+) bis +	Ø bis ++(+)
- Kryptenbereich: Enterozyten	(+) bis ++(+)	(+) bis +	Ø bis +
Lamina propria mucosae: Lymphozyten	Ø bis (+)	Ø bis (+)	Ø bis (+)
Tela submucosa: Lymphozyten	Ø bis ++(+)	(+) bis ++(+)	(+) bis +
<u>Tunica muscularis</u>			
- Stratum intermusculare: Ganglienzellen	(+) bis ++	(+) bis ++(+)	Ø bis (+)
Tela subserosa: Lymphozyten	Ø bis +	Ø bis +	Ø bis +

Legende zu Tab. 4.10: Ø: kein Nachweis; (+): IRS < 1; +: IRS 1-2; ++(+): IRS 2,1-3,4; ++: IRS 3,6-5,0; ++(+): IRS 5,1-7,0; p-p38: phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase



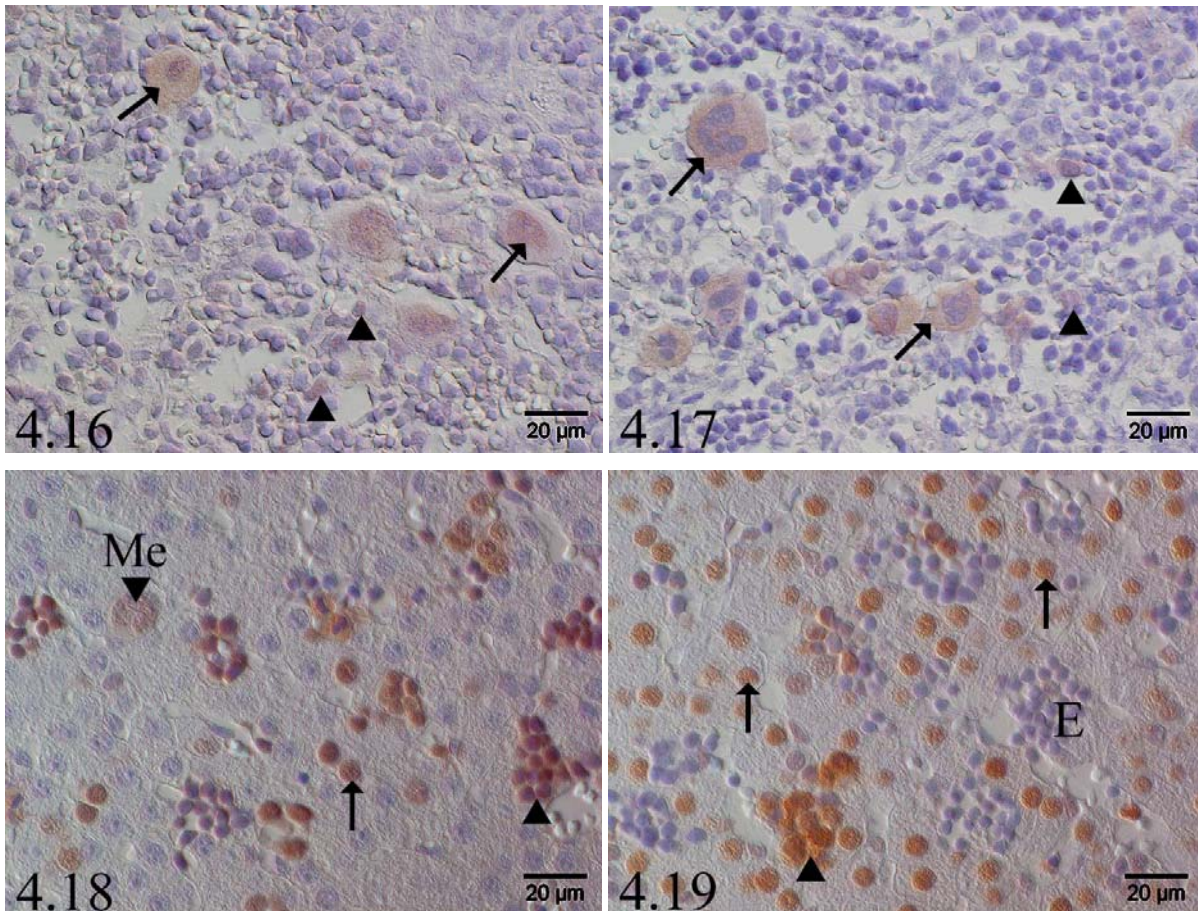
Immunhistologische Befunde an den 70 Tage alten Schweinefeten

Abb. 4.12: Immunhistologische Befunde am Mesenteriallymphknoten: Expression des TNF- α durch mononukleäre Zellen (**Pfeile**) im Bereich des „cortex like tissue“. Immunhistologie, TNF- α , Nomarski-Interferenzkontrast

Abb. 4.13: Immunhistologische Befunde am Mediastinallymphknoten: Nachweis von T-Lymphozyten mittels CD3. Im Bereich des Parakortex (**P**) Nachweis mehrerer und im Bereich der Follikel (**F**) vereinzelter T-Lymphozyten. Immunhistologie, CD3, Nomarski-Interferenzkontrast

Abb. 4.14: Immunhistologische Befunde am Mediastinallymphknoten: Nachweis von B-Lymphozyten mittels CD79a. Im Bereich der Follikel (**F**) Nachweis zahlreicher und im Bereich des Parakortex (**P**) vereinzelter B-Lymphozyten. Immunhistologie, CD79a, Nomarski-Interferenzkontrast

Abb. 4.15: Immunhistologische Befunde am Thymus: Nachweis von multifokal vereinzelter Makrophagen (**Pfeilspitze**) in der Medulla mittels MAC 387. Daneben ein MAC 387-positives Hassall-Körperchen (**Pfeil**). Immunhistologie, MAC 387, Nomarski-Interferenzkontrast



Immunhistologische Befunde an den 70 Tage alten Schweinefeten

Abb. 4.16: Immunhistologische Befunde an der Milz: Expression der p-p38 mitogen activated Proteinkinase im Bereich der roten Pulpa. Nachweis mehrerer schwach positiver Megakaryoblasten (**Pfeile**) und vereinzelter schwach positiver Lymphozyten (**Pfeilspitzen**). Immunhistologie, p-p38 mitogen activated Proteinkinase, Nomarski-Interferenzkontrast

Abb. 4.17: Immunhistologische Befunde an der Milz: Expression der Caspase 3 im Bereich der roten Pulpa. Nahezu sämtliche Megakaryoblasten (**Pfeile**) und einzelne Lymphozyten (**Pfeilspitzen**) sind Caspase3-positiv. Immunhistologie, Caspase 3, Nomarski-Interferenzkontrast

Abb. 4.18: Immunhistologische Befunde an der Leber: Expression der Caspase 9 im Bereich des Leberparenchyms. Nachweis positiver Erythroblasten (**Pfeilspitze**) sowie positiver Hepatozyten (**Pfeil**) und Megakaryoblasten (**Me**). Immunhistologie, Caspase 9, Nomarski-Interferenzkontrast

Abb. 4.19: Immunhistologische Befunde an der Leber: Nachweis der Proliferationsaktivität der Zellen des Leberparenchyms mittels Ki-67 Antigen. Nahezu sämtliche Hepatozyten (**Pfeile**) sowie zahlreiche Lymphoblasten (**Pfeilspitze**) exprimieren das Ki-67 Antigen. Ganz vereinzelte Erythroblasten (**E**) sind schwach positiv. Immunhistologie, Ki-67 Antigen, Nomarski-Interferenzkontrast

4.4 Statistische Auswertung der immunhistologischen Untersuchung

Im Rahmen der statistischen Auswertung der immunhistologischen Untersuchungsbefunde (Lymphknoten, Thymus, Milz, Leber, Dünndarm und Knochenmark) konnten mit dem U-Test nach Mann-Whitney nur bei zwei Untersuchungsparametern signifikante Abweichungen ($p \leq 0,05$) in Abhängigkeit von der Versuchsgruppenzugehörigkeit der Tiere festgestellt werden:

1. Der IRS der p-p38 MAP-Kinase bezüglich der in der Leber nachgewiesenen Lymphozyten/-blasten ist bei den Tieren der DON-Gruppe signifikant ($p = 0,03$) höher als bei den Kontrolltieren. Vgl. hierzu Tab. 9.17, S. 115.
2. Der IRS der p-p38 MAP-Kinase bezüglich der im Stratum intermusculare des Ileums nachgewiesenen Ganglienzellen ist bei den Kontrolltieren signifikant ($p = 0,02$) höher als bei den Tieren der DON-Gruppe. Vgl. hierzu Tab. 9.28, S.126.

5 DISKUSSION

5.1 Ziel dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es:

- nach der Verfütterung von DON-kontaminiertem Futtermittel an trächtige Sauen, mit Hilfe histomorphologischer und immunhistologischer Untersuchungsverfahren den Einfluss des diaplazar transferierten DON auf das Immunsystem (Lymphknoten, Thymus, Knochenmark und Milz) und auf Organe mit einem hohen Proteinstoffwechsel (Leber und Darm) von Schweinefeten am 70. Trächtigkeitstag zu charakterisieren.
- gegebenenfalls Zusammenhänge nachgewiesener Gewebealterationen hinsichtlich der Wirkungsweise des Deoxynivalenols zu erarbeiten.
- die initiale Frage zu beantworten, ob die diagnostische Pathologie unter praxisrelevanten Bedingungen (mit Rücksicht auf den finanziellen Aufwand und die Untersuchungsmethodik) als verwertbares Hilfsmittel bei Verdacht einer DON-Mykotoxikose bei Schweinefeten angesehen werden kann.

5.2 Kritische Beurteilung des Untersuchungsmaterials und der Untersuchungsmethoden

Der dieser Studie zu Grunde liegende Fütterungsversuch umfasst eine durch das FAL Braunschweig angefertigte klinische Befunddokumentation, deren Untersuchungsergebnisse dem Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig vollständig zur Verfügung stehen. Bezüglich des Versuchsaufbaus ist die Einzelhaltung der Versuchstiere auf Asphalt als günstig zu bewerten, da äußere Stressfaktoren (Rang- bzw. Hierarchiekämpfe innerhalb der Gruppe) und mögliche Kontaminationen durch Einstreu den Einfluss einer DON-Belastung verfälschen könnten. Zudem wurde sichergestellt, dass jede Sau die gleiche Menge des bereitgestellten Futtermittels aufnimmt.

Zwei Stunden vor dem Kaiserschnitt erhielten die Sauen die letzte Futtermittelration. Diese Zeitspanne entspricht in etwa der Dauer der DON-bedingten Aktivierung der p38 MAP-Kinase und der Caspasen sowie des TNF- α , wodurch die immunhistologische Untersuchung dieser Enzyme sinnvoll ist.

Viele Proteine besitzen eine sehr geringe Halbwertszeit, so dass eine verzögerte Fixierung die Ergebnisse immunhistologischer Untersuchungen negativ beeinflussen könnte (BOJAR 1988). Die unmittelbar nach der Schlachtung erfolgte Organ- bzw. Organprobenentnahme und -fixierung bildete somit die Voraussetzung für eine unter standardisierten Bedingungen durchgeführte Auswertung der immunhistologisch eingesetzten Marker.

Die Versuchsgruppen, die in dieser Studie verwendet wurden, sind mit 15 Kontroll- und 21 Versuchstieren im quantitativen Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Versuchsdesigns relativ groß, so dass eine belastbare statistische Auswertung der erfassten Untersuchungsergebnisse möglich scheint.

Die zusätzliche Belastung der Tiere mit ZON wird im Rahmen dieser Arbeit außer Acht gelassen, da die ZON-Konzentration im Futtermittel so gering ist, dass ein diaplazentarer ZON-Transfer von den Sauen auf die Feten des eigenen Untersuchungsgutes mittels HPCL („high performance liquid chromatography“) nicht nachgewiesen werden konnte (GOYARTS et al. 2007). Zudem unterscheidet sich ZON mit seiner östrogenen Wirkung auf den Reproduktionstrakt als primär affines Organ grundlegend von DON. Obwohl der Reproduktionstrakt im Rahmen dieser Studie nicht untersucht wurde, kann dennoch ein direkter Einfluss diaplazentär transferierten ZONs (vgl. Kap. 2.1.1.10, S. 13) auf die fetalen Organe, aufgrund der Östrogen entsprechenden biologischen (z.B. Zellproliferation) und biochemischen (z.B. Proteinsynthese) Wirkung (UNEO u. YAGASAKI 1975, KATZENELLENBOGEN et al. 1979), nicht definitiv ausgeschlossen werden. Zudem sind indirekte Auswirkungen auf die Feten durch die östrogene Wirksamkeit des ZONs in den Muttersauen in Betracht zu ziehen.

Die DON-Konzentration im eigenen Versuchsfutter (4,42 mg DON/kg Futtermittel) war niedriger als die meisten der in der Literatur beschriebenen Belastungen anderer Versuchsansätze (vgl. Tab. 2.3, S. 6 – hierbei ist zu beachten, dass in den meisten anderen Versuchen DON pro kg Körpermasse und nicht pro kg Futtermittel angegeben wird). Jedoch war sie nur geringfügig höher, als die in den letzten Jahren durchschnittlich in der deutschen Landwirtschaft nachgewiesenen Futtermittelbelastungen, wodurch die Praxisrelevanz des Versuchs als gegeben anzusehen ist.

5.3 Histomorphologische und immunhistologische Befunde

Aufgrund der immunsuppressiven/-stimulierenden Wirkung des Deoxynivalenols (PESTKA et al. 2004) gelangten im Rahmen dieser Studie Lymphknoten, Milz, Thymus und Knochenmark sowie wegen der hemmenden Wirkung auf die Proteinbiosynthese (EHRlich u. DAIGLE 1987) Leber und Dünndarm zur Untersuchung. Es ist davon auszugehen, dass die anti-proliferative Wirkung des DON auch bei den Organen des Immunsystems aufgrund ihrer hohen Zellteilungsrate eine wichtige Rolle spielt. Zudem befinden sich die Feten im Wachstum, so dass ohnehin in jedem der untersuchten Organe eine hohe Proliferationsrate zu erwarten ist.

Trotz des nachgewiesenen diaplazentaren DON-Transfers von den Muttertieren auf die Feten (GOYARTS et al. 2007), konnten – anders als bei KHERA et al. (1982), DEBOUCKE et al. (2001) und COLLINS et al. (2006) – mittels pathologisch-anatomischen, histomorphologischen und immunhistologischen Untersuchungsverfahren, bis auf zwei Ausnahmen (vgl. Kap. 5.3.4, S. 64 u. Kap. 5.3.6, S. 66) an keinem der untersuchten Organe gruppenspezifische, DON-abhängige Unterschiede nachgewiesen werden. KHERA et al. (1982), DEBOUCKE et al. (2001) und COLLINS et al. (2006) konnten in Fütterungsversuchen mit trächtigen Mäusen bzw. Ratten bei steigenden DON-Konzentrationen einen letalen Effekt auf den Embryo/Fetus, eine Zunahme von Resorptionen, multiple teratogene Effekte sowie eine signifikante Reduktion des fetalen Körpergewichts, der Scheitel-Steiß-Länge und der Ossifikation beobachten (vgl. Kap. 2.1.1.3, S. 5). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass bei allen drei Versuchen höhere Toxinkonzentrationen verwendet worden sind (bei KHERA bis zu 15 mg/kg KM, bei DEBOUCKE bis zu 10 mg/kg KM,

bei COLLINS bis zu 5 mg/kg KM). Dies bezüglich weisen DÄNICKE et al. (2007) darauf hin, dass aus biologischer Sicht auch bedacht werden muss, dass Mäuse und Ratten eine Plazenta hämochorialis besitzen, bei der es zu einem direkten Kontakt zwischen maternalem Blut und fetalem Chorion kommt, während Schweine zu den Spezies mit einer Plazenta epithelichorialis gehören. Hierbei werden das maternale und das fetale Blut durch die Endothelzellen der maternalen und fetale Gefäße, durch maternales und fetales Bindegewebe, durch das endometriale Epithel und das Chorionepithel sowie die dazugehörigen Basalmembranen getrennt. (vgl. Kap. 2.1.1.10, S.13). Die in der Literatur beschriebenen und in Tab. 2.3 (S.6) zusammengefassten DON-bedingten Gewebeerkrankungen bei adulten und juvenilen Schweinen sowie anderen Tierarten, wie z.B. lymphoide Depletion des Thymus oder hepatozelluläre Alterationen, konnten am eigenen fetalen Untersuchungsmaterial nicht nachgewiesen werden.

Die an lebenden Mäusen dokumentierte und in der Literatur beschriebene DON-induzierte Aktivierung von MAP-Kinasen mit anschließender Aktivierung der Caspase-Kaskade und die daraus resultierende Leukozytenapoptose (ZHOU et al. 2000, ZHOU et al. 2003a, ISLAM u. PESTKA 2006), wurde im Rahmen dieser Studie an 70 Tage alten Schweinefeten mittels histologischer und immunhistologischer Methoden nicht nachgewiesen. Gleiches gilt für die ebenfalls in vivo bei Mäusen festgestellte Aufregulierung und Stabilitätssteigerung der mRNAs von Genen diverser proinflammatorischer Proteine (Zytokine), zum Beispiel des TNF α (ZHOU et al. 2003). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass bei ZHOU et al. (2003) eine wesentlich höhere Toxindosis (12,5mg DON/kg KM) sowie molekularbiologische Untersuchungsverfahren verwendet worden sind.

Eine immunsuppressive/-stimulierende Wirkung des Deoxynivalenols (PESTKA et al. 2004) konnte mittels der durchgeführten Lymphozytendifferenzierung in T- und B-Lymphozyten am vorliegenden Untersuchungsmaterial nicht dargestellt werden. Im Gegensatz zu ZHOU et al. 2005 konnte kein gruppenspezifischer Unterschied in Bezug auf die Makrophagen mittels MAC 387 beobachtet werden. ZHOU et al. (2005) haben mittels Zellkultur eine DON-bedingte Induktion des Apoptose-Signalweges in Makrophagen von Mäusen nachgewiesen, jedoch ebenfalls mit höheren Toxinkonzentrationen (Zellkultur mit bis zu 500 ng DON/ml Lösung, was in etwa einer oralen Dosis zwischen 5 u. 25 mg/kg KM entspricht (AZCONA-OLIVERA et al. 1995)).

Die Kontrollgruppe wurde im Rahmen dieser Studie als physiologischer Standard herangezogen, weil bis heute immunhistologische Studien über das physiologische Expressionsverhalten der in der eigenen Studie verwendeten immunhistologischen Marker in Organen von Schweinefeten am 70. Trächtigkeitstag in der Literatur fehlen. Demzufolge ist auch der mögliche Einfluss des Mykotoxins Deoxynivalenol auf das Expressionsverhalten der immunhistologischen Marker unbekannt.

5.3.1 Histomorphologische und immunhistologische Untersuchung der Lymphknoten

Die histomorphologischen Befunde des eigenen Untersuchungsmaterials korrelieren weitestgehend mit den Beschreibungen von SABIN (1905). Entsprechend den Beobachtungen von RICHTER (1902), dass zwischen den Lymphknoten verschiedener Körperlokalisationen

geringgradige histologische Unterschiede bestehen können, fällt am eigenen Untersuchungsmaterial auf, dass die Mediastinallymphknoten in ihrer Entwicklung wesentlich weiter vorgeschritten sind als die Mesenteriallymphknoten. Dies wird vor allem im „cortex like tissue“ deutlich. Während bei sämtlichen Mediastinallymphknoten im Durchschnitt ca. fünf bis sieben, noch im Aufbau befindliche, zeldichte Follikel nachgewiesen werden können, sind lediglich bei einzelnen Mesenteriallymphknoten ein bis höchstens drei, relativ kleine, nur in Ansätzen ausgebildete Follikel vorhanden (vgl. Kap. 4.2.1, S. 39). Mit nur sechs untersuchten Mediastinallymphknoten kann natürlich kein Anspruch auf Repräsentativität erhoben werden; vielmehr sollen damit lediglich Unterschiede im Entwicklungsstand der Lymphknoten veranschaulicht werden.

Durch immunhistologische Untersuchung der Lymphknoten konnte mittels Ki-67 Antigen erwartungsgemäß sowohl im „cortex like tissue“ als auch im „medulla like tissue“ eine hohe Dichte an proliferativ aktiven Zellen nachgewiesen werden, was sich dadurch erklären lässt, dass es sich um einen in der Entwicklung befindlichen Organismus handelt. Die Anzahl an p-p38 MAP-Kinase-, Caspase 3- und 9-positiven Zellen ist im Vergleich zu den übrigen untersuchten Organen, in denen vor allem die hämatopoetisch aktiven Zellen positiv sind, recht gering. Die hohe Anzahl positiver Zellen in den übrigen Organen liegt wahrscheinlich an der hohen „turn over“ Rate fetaler Gewebe (MARSDEN u. STRASSER 2003). Die Lymphoblasten der Lymphknoten haben jedoch zum Zeitpunkt ihrer Ansiedlung im Lymphknoten bereits ein gewisses Entwicklungsstadium erreicht, was als mögliche Ursache einer geringen Apoptoserate anzusehen ist. Durch die vereinzelt TNF- α -positiven mononukleären Zellen werden die in der Literatur getroffenen Feststellungen bezüglich TNF- α produzierende Zellen größtenteils bestätigt (vgl. Kap. 2.5, S. 22). Der vereinzelte Nachweis von TNF- α -positiven Reaktionsmustern, denen keine spezifischen Zellstrukturen zuzuordnen sind, passt zu dem vom Hersteller beschriebenen auch extrazytoplasmatischen Reaktionsmuster des Markers (bedingt durch die Sekretion des TNF- α).

5.3.2 Histomorphologische und immunhistologische Untersuchung des Thymus

Die histologischen Befunde der Thymi entsprechen weitestgehend den in der Literatur beschriebenen Charakteristika der Thymi am 70. Trächtigkeitstag. Das histomorphologische Bild gleicht dem eines Thymus post partum, mit einem dichten Kortex und einer aufgelockerten Medulla mit zahlreichen Hassall-Körperchen.

Mittels der immunhistologischen Untersuchung fällt auf, dass im Kortex nur ein Teil der Lymphozyten CD3-positiv ist, obwohl zu erwarten wäre, dass alle Lymphozyten CD3 exprimieren. Auch zeigt ein Großteil der CD3-positiven Zellen nur eine sehr schwache Expressionsintensität. Dies liegt wahrscheinlich am Entwicklungsstand der juvenilen T-Lymphozyten, die das CD3 Molekül erst im Thymus zu exprimieren beginnen (SINKORA et al. 2000), und korreliert möglicherweise mit der Beobachtung, dass die CD3 Expression bei unreifen Thymozyten ausschließlich zytoplasmatisch verteilt ist, während eine membranassoziierte Expression des Markers erst im Rahmen der Zellreifung auftritt (CAMPANA et al. 1987). Mehrere Lymphozyten in Kortex und Medulla sind Caspase 9-positiv, was wahrscheinlich an der

hohen „turnover“ Rate fetaler Gewebe liegt (MARSDEN u. STRASSER 2003). Sämtliche in der Medulla befindlichen Hassall-Körperchen zeigen eine Expression von MAC 387 und einzelne von CD79a. RAICA et al. (2005) konnten CD3-positive Hassall-Körperchen nachweisen und folgerten daraus, dass dieser Typ von Hassall-Körperchen in die Negativselektion der T-Lymphozyten involviert ist. Würde man diese Schlussfolgerung auf die eigene Studie projizieren, könnte man die These aufstellen, dass die Hassall-Körperchen ebenfalls in die Negativselektion der B-Lymphozyten und der Makrophagen involviert sind.

5.3.3 Histomorphologische und immunhistologische Untersuchung der Milz

Aufgrund einer hochgradigen, nahezu diffusen, extramedullären Hämatopoese im eigenen Untersuchungsmaterial war eine exakte und detaillierte histopathologische Charakterisierung der Milz mittels konventioneller Histologie nur eingeschränkt möglich. Dennoch entsprechen die Beschreibungen von THIEL und DOWNY (1921) sowie von KRUML et al. (1970), vor allem in Bezug auf die extramedulläre Hämatopoese, den eigenen Beobachtungen.

Im Rahmen der immunhistologischen Untersuchungen kann erwartungsgemäß bei zahlreichen Zellen der Hämatopoese eine proliferative Aktivität mittels Ki-67 Antigen nachgewiesen werden. Ein geringer Anteil der hämatopoetischen Zellen ist p-p38 MAP-Kinase-, Caspase 3- und 9-positiv, was sich durch die hohe „turnover“ Rate fetaler Gewebe erklären lässt (MARSDEN u. STRASSER 2003). Eine Ausnahme bilden die Megakaryozyten, welche nahezu alle p-p38 MAP-Kinase-, Caspase 3- und 9-positiv sind. Dies lässt sich damit begründen, dass die MAP-Kinasen die Proliferation und Differenzierung der Megakaryozyten regulieren (FICHELSON et al. 2008). Dem entsprechend konnten BOTTON et al. (2002) auch die Caspasen in Megakaryoblasten/-zyten nachweisen und gehen daher davon aus, dass die Caspasen eine Rolle bei der Bildung der Prothrombozyten spielen. Cluster von MAC 387-positiven hämatopoetischen Zellen, wie sie in der Leber beobachtet werden konnten (vgl. Kap 4.3.5, S. 52), sind interessanterweise in der Milz nicht zu finden. Diese Beobachtung korreliert möglicherweise mit der Aussage, dass der Milz im Bezug auf die Hepato-Lienale Blutbildung eine geringere Bedeutung als der Leber zukommt (vgl. Kap. 2.2.1, S.15).

5.3.4 Histomorphologische und immunhistologische Untersuchung der Leber

Die in der Literatur beschriebene Histomorphologie der Leber am 70. Tag p.c. wurde am eigenen Untersuchungsgut ergänzt und präzisiert. Auffällig ist vor allem die mittelgradige, multifokale bis diffuse extramedulläre Hämatopoese, die zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung als physiologisch zu betrachten ist (KOSTANECKI 1892, MOLLIER 1909; JOHNSON 1919). Die Hepatozyten besitzen ein teils schaumiges, teils vakuolisiertes Zytoplasma. In einigen Vakuolen konnte mittels Sudan-III-Färbung Fett nachgewiesen werden; der größere Anteil der Vakuolen bzw. des schaumigen Zytoplasmas ist, wie von TIEMANN et al. (2008) für das selbe Untersuchungsgut beschrieben, mit Glykogen gefüllt (Nachweis mittels PAS-Reaktion). TIEMANN et al. (2008) konnten jedoch erst mittels einer Fotoanalyse (AnalySIS®) einen Glykogenanstieg in

den Hepatozyten der Feten der DON-Gruppe nachweisen. Im Rahmen der eigenen Studie diente der Glykogennachweis lediglich zur qualitativen Charakterisierung des schaumigen Zytoplasmas der Hepatozyten. Zudem konnten mittels semiquantitativer Untersuchungsmethoden an den exemplarisch gewählten Präparaten keine gruppenspezifischen Abweichungen des Glykogengehaltes festgestellt werden. Das in den Vakuolen nachgewiesene Fett ist als physiologisch zu bewerten, da es in der Kontroll- wie der DON-Gruppe gleichermaßen vorkommt.

Die immunhistologischen Untersuchungsergebnisse mittels Ki-67 Antigen zeigen, dass die Leber am 70. Tag p.c. eine hochgradige proliferative Aktivität aufweist. Nahezu sämtliche Hepatozyten sind Ki-67-Antigen-positiv, was sich dadurch erklären lässt, dass der Organismus sich im Wachstum befindet und die Leber in diesem Stadium eine hohe Zellteilungsrate aufweist. Trotz dieser hohen Proliferationsaktivität konnten keine gruppenspezifischen Unterschiede, wie z.B. eine erhöhte Apoptoserate oder eine verminderte Proliferation, nachgewiesen werden.

Entsprechend den Befunden in der Milz sind nahezu sämtliche Megakaryoblasten/-zyten p-p38 MAP-Kinase- und Caspase 3- und 9-positiv (vgl. Kap. 5.3.3, S. 64). Zudem sind neben den Megakaryoblasten auch mehrere der übrigen hämatopoetischen Zellen p-p38 MAP-Kinase-, Caspase 3- und 9-positiv; mehrere Hepatozyten sind Caspase 9-positiv, was sich jeweils durch hohe „turnover“ Rate fetaler Gewebe erklären lässt (MARSDEN u. STRASSER 2003).

Im Rahmen der statistischen Untersuchungen konnte im Gruppenvergleich eine signifikante Abweichung ($p = 0,03$) des p-p38 MAP-Kinase-IRS bei den Lymphozyten/-blasten der Leber (vgl. Tab. 9.17, S. 115) nachgewiesen werden. Der IRS-Wert der Tiere der DON-Gruppe (Median: 2,05) ist höher als der der Kontrolltiere (Median: 1,6). Diese Ergebnisse spiegeln möglicherweise eine DON-abhängige Induktion der Apoptose wieder. Sie sollten jedoch an einem größeren Versuchsgut verifiziert werden, denn es ist auffällig, dass lediglich in der Leber signifikante Abweichungen bezüglich der Lymphozyten nachgewiesen werden konnten und nicht auch in den primären lymphatischen Organen. Möglicherweise ist der Unterschied in der Leber aber deswegen besser sichtbar, weil dort die Anzahl der Lymphozyten/-blasten geringer ist und die Strukturen überschaubarer sind. Es gilt jedoch zu beachten, dass es sich um recht kleine IRS-Werte mit einer geringen Schwankungsbreite handelt, die ein relativ schwaches Expressionsniveau widerspiegeln, weshalb die Aussagekraft nicht überschätzt werden sollte.

5.3.5 Histomorphologische und immunhistologische Untersuchung des Knochenmarks

Die histomorphologischen Beobachtungen hinsichtlich der hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks entsprechen den Beobachtungen von ENGEL (1899) und JORDAN (1918a u. b). Auch im eigenen Untersuchungsmaterial stellen die Erythrozyten/Erythro-/Normoblasten quantitativ die größte Zellpopulation dar, gefolgt von Lymphozyten/-blasten, Myeloblasten und Megakaryoblasten.

Im Rahmen der immunhistologischen Untersuchungen konnten erwartungsgemäß zahlreiche proliferativ aktive hämatopoetische Zellen mittels Ki-67 Antigen nachgewiesen werden. Ein geringer Anteil der hämatopoetisch aktiven Zellen ist p-p38 MAP-Kinase-, Caspase 3- und 9-positiv. Dies lässt sich mit der hohen „turnover“ Rate fetaler Gewebe erklären (MARSDEN u.

STRASSER 2003). Eine Ausnahme bilden die Megakaryozyten, welche nahezu alle p-p38 MAP-Kinase- und Caspase 3-positiv sind (vgl. Kap. 5.3.3, S. 64). Mit den vereinzelt TNF- α -positiven mononukleären Zellen werden die in der Literatur getroffenen Feststellungen bezüglich TNF- α -produzierende Zellen (vgl. Kap. 2.5, S. 22) größtenteils bestätigt. Die TNF- α Expression mehrerer Megakaryoblasten entspricht der von SANDROCK et al. (1996) und AVRAHAM et al. (1992) beschriebenen autokrinen Zytokinproduktion (inkl. TNF- α) dieser Zellen während des eigenen Wachstums und der eigenen Differenzierung bzw. ihrem Einfluss auf die Replikation und Funktion anderer hämatopoetischer Zellen.

5.3.6 Histomorphologische und immunhistologische Untersuchung des Dünndarms

In der Literatur über die morphologische Charakterisierung des Dünndarms 70 Tage alter Schweinefeten existiert keine vollständige histologische Beschreibung der Organstrukturen, so dass die Beschreibung anhand des eigenen Untersuchungsmaterials ergänzt und präzisiert wurde. Die Beobachtungen von HEUER (1909), CHAPMAN et al. (1974), PABST et al. (1988) und ROTHKOTTER u. PABST (1989) entsprechen jedoch den eigenen Befunden. Wie in der Literatur beschrieben, konnten auch im Rahmen dieser Studie am 70. Tag p.c. weder vollständige folliculäre Aggregationen lymphoider Zellen noch Peyer-Platten nachgewiesen werden. Die Lamina muscularis mucosae ist zu diesem Zeitpunkt ebenfalls noch nicht nachweisbar.

Obwohl nach allgemeiner Lehrmeinung die Paneth-Zellen beim Schwein nicht sicher nachgewiesen werden können (LIEBICH 2010c) (vgl. Kap. 2.6.6.2, S. 29), konnten sie am eigenen fetalen Untersuchungsgut sowohl mittels H.-E.-Färbung als auch mittels einer Bodian-Ver Silberung gut dargestellt werden.

Durch immunhistologische Untersuchung konnten mittels Ki-67-Antigen zahlreiche proliferativ aktive Enterozyten nachgewiesen werden. Dies entspricht den Befunden in einem sich entwickelnden Organismus. Die Anzahl positiver Zellen im Kryptenbereich ist etwas höher als die im Zottenbereich, was sich durch die Tatsache erklären lässt, dass die Zellteilung der Enterozyten im Kryptenbereich vollzogen wird. Eine Vielzahl der Enterozyten sind p-p38 MAP-Kinase-, Caspase 3- und 9-positiv, was sich mit der physiologischen Weise hohen Apoptoserate während der fetalen und embryonalen Entwicklung begründen lässt (HURLE 1988) (vgl. Kap. 5.3.3, S. 64). Korrelierend mit der eher basalen Lokalisation der Ki-67 Antigen-exprimierenden Enterozyten, ist der größere Anteil der MAP-Kinase- und Caspase-positiven Zellen in den apikalen Zottenanteilen zu finden, also dort, wo die "älteren" Enterozyten lokalisiert sind.

Im Rahmen der statistischen Untersuchungen konnte im Gruppenvergleich eine signifikante Abweichung ($p = 0,02$) des p-p38 MAP-Kinase-IRS der Neuronen im Bereich des Stratum intermusculare des Ileums (vgl. Tab. 9.28, S. 126) nachgewiesen werden. Der IRS-Wert bei den Tieren der Kontrollgruppe (Median: 0,6) ist höher als bei den Tieren der DON-Gruppe (Median: 0,55). Die IRS-Werte sind jedoch generell sehr klein und spiegeln demnach ein sehr schwaches Expressionsniveau wider. Zudem konnten äquivalente Veränderungen im Duodenum und Jejunum nicht beobachtet werden. Die Aussagekraft dieses Untersuchungsergebnisses sollte

anhand eines größeren Untersuchungsgutes verifiziert bzw. anhand spezifischer Antikörper für die Darstellung neuronalen Gewebes näher charakterisiert werden.

5.4 Abschließende Betrachtung

Im Rahmen dieser Studie konnte, trotz des nachgewiesenen diaplazentaren DON-Transfers von den Muttertieren auf die Feten (GOYARTS et al. 2007), kein direkter Einfluss des Mykotoxins auf die untersuchten Parameter von Lymphknoten, Thymus, Milz, Leber, Knochenmark und Dünndarm von Schweinefeten am 70. Trächtigkeitstag nachgewiesen werden. Mittels der makroskopischen, histologischen und immunhistologischen Untersuchungen konnten, bis auf zwei Ausnahmen, keine Befunde dokumentiert werden, die im Vergleich zur Kontrollgruppe als charakteristisch für eine DON-Intoxikation angesehen werden können. Die beiden mit Hilfe des U-Tests nach Mann-Whitney, in Abhängigkeit von der Versuchsgruppenzugehörigkeit, ermittelten, signifikant abweichenden immunhistologischen Untersuchungsparameter, sind als wenig aussagekräftig einzustufen und sollten an einem größeren Versuchsgut verifiziert werden (vgl. Kap. 5.3.4, S. 64 u. 5.3.6, S. 66).

Es ist zu beachten, dass im Rahmen dieser Studie ein möglicher Einfluss von ZON auf die Feten außer Acht gelassen wurde, weil sich ZON mit seiner östrogenen Wirkung auf den Reproduktionstrakt als primär affines Organ grundlegend von DON unterscheidet (DÄNICKE et al. 2000). Zudem waren die Futtermittelkonzentrationen des ZON so gering, dass kein diaplazentarer ZON-Transfer nachgewiesen werden konnte (GOYARTS et al. 2007).

Abschließend kann mit Blick auf die initiale Fragestellung festgestellt werden, dass unter den Bedingungen unseres Versuchsansatzes (bei einer DON-Futtermittelbelastung von 4,42 mg/kg Futter) selbst detaillierte histologische und immunhistologische Untersuchungen von Lymphknoten, Thymus, Milz, Leber, Knochenmark und Dünndarm bei 70 Tage alten Schweinefeten kein diagnostisch verwertbares Hilfsmittel zur Diagnosestellung und/oder -sicherung darstellen. Als diagnostisch verwertbares und zuverlässiges Hilfsmittel ist demnach ausschließlich das klinische Bild in Verbindung mit Futtermittelanalysen und Rückstandsuntersuchungen anzusehen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Wolf Wippermann

Diaplazentare Deoxynivalenolintoxikation bei Schweinefeten. Lassen sich am 70.

Trächtigkeitstag histomorphologisch und immunhistologisch diagnostisch verwertbare Befunde erheben?

Institut für Veterinär-Pathologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im August 2010

(71 Seiten, 27 Abbildungen, 47 Tabellen, 342 Literaturangaben, 32 Seiten Anhang)

Schlüsselwörter: Schwein, Deoxynivalenol, diaplazentar, Fetus

Belastungen von Futtermitteln mit dem Mykotoxin Deoxynivalenol (DON) können weltweit in zunehmendem Maße beobachtet werden, wobei Schweine unter den Nutztieren als besonders anfällig gegenüber DON-Intoxikationen gelten. Als erstes klinische Symptom ist der Vomit beschrieben worden, wodurch DON den Trivialnamen Vomitoxin erhielt. Weiter klassische klinische Symptome sind Diarrhoe sowie eine reduzierte Futteraufnahme und Lebendmassenzunahme.

Derzeit sind zwei Wirkungsmechanismen dieses Mykotoxins bekannt. Eine antiproliferative Aktivität, die sich als Hemmung der Proteinbiosynthese in eukaryotischen Zellen auswirkt und eine Aktivierung von MAP-Kinasen (mitogenaktivierte Proteinkinasen), die in Abhängigkeit von der Toxindosis, zu einer Immunstimulation oder Immunsuppression via Apoptose führt. Ausgehend von diesen beiden Mechanismen wird in der Fachliteratur vielfach darauf hingewiesen, dass Organe mit einem hohen Proteinturnover - wie Leber, Knochenmark und Darm - sowie die Zellen des Immunsystems eine besonders hohe Anfälligkeit gegenüber einer DON-Intoxikation aufweisen.

Bei Schweinen, Mäusen und Ratten konnte ein diaplazentarer Transfer des DON vom Muttertier auf die Feten nachgewiesen werden. Zudem gibt es mehrere Studien mit Mäuse- und Rattenfeten von DON-behandelten Muttertieren, in denen diverse pathologische Effekte des Mykotoxins auf die Embryonen bzw. Feten beobachtet wurden, wie z.B. die Embryoletalität, die Zunahme von Fruchtresorptionen, multiple teratogene Effekte sowie eine signifikante Reduktion des fetalen Körpergewichtes, der Scheitelsteißlänge und der Ossifikation. Die Auswirkungen von DON auf Schweinefeten sind demgegenüber nur unzulänglich bekannt.

Ziel der vorliegenden Studie war es daher, mittels histomorphologischer und immunhistologischer Untersuchungsverfahren ein pathomorphologisches Korrelat zu den klinisch beschriebenen Veränderungen mittels einer experimentellen DON-Intoxikation zu finden bzw. Parameter zu erfassen, die den Einfluss von DON charakterisieren, und damit ein mögliches diagnostisches Mittel für die Fragestellung einer DON-Mykotoxikose zu erarbeiten. Die Methodik und der finanzielle Aufwand der angewandten Untersuchungsverfahren sollten hierbei praxisrelevanten Bedingungen aus Sicht der diagnostischen Pathologie entsprechen. Zu diesem Zweck wurden 12 trächtige Sauen in zwei Versuchsgruppen zu fünf (Kontrollgruppe) bzw. sieben (DON-Gruppe)

Tieren unterteilt. Sie wurden einzeln auf spaltfreiem Asphaltboden aufgestellt und erhielten Wasser ad libitum. Die Sauen der DON-Gruppe erhielten nach einer sechstägigen Eingewöhnungsphase mit einer schrittweise ansteigenden Mykotoxinkonzentration im Futtermittel das Versuchsfutter mit 4,42 mg DON pro kg Futter über einen Zeitraum von 35 Tagen. Die Toxinbelastung des Versuchsfutters erfolgte durch Zumischung von natürlich fusariumkontaminiertem Triticaleanteil. Die Tiere der Kontrollgruppe bekamen in diesem Zeitraum ein Kontrollfutter mit einer Toxinkonzentration von 0,15 mg DON pro kg Futter. Zum Abschluss des Versuchs am 70. Trächtigkeitstag wurden die Sauen anästhesiert und die Feten per Kaiserschnitt entwickelt.

Unmittelbar nach der Euthanasie der Feten erfolgte eine anatomische Präparation. Lymphknoten, Thymus, Milz, Leber, Knochenmark und Dünndarm wurden entnommen, in Formalin fixiert und anschließend routinemäßig für die Histologie aufbereitet. Es folgten makroskopische, histologische (H.-E.-Färbung, PAS-Reaktion, Sudan III-Färbung und Bodian-Versilberung) und immunhistologische Untersuchungsverfahren (CD3 (T-Lymphozyten), CD79a (B-Lymphozyten), MAC 387 (Makrophagen), Ki-67 Antigen (Zellproliferation), p-p38 MAP-Kinase (phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase, an der Apoptose beteiligtes Enzym), Caspase 3 und 9 (an der Apoptose beteiligte Enzyme) und TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor- α)).

Im Rahmen der makroskopischen, histologischen und immunhistologischen Untersuchungen konnten bis auf zwei Ausnahmen (s.u.) keine Befunde dokumentiert werden, die im Vergleich zur Kontrollgruppe als hinweisend für eine DON-Intoxikation angesehen werden können. Zudem konnte mittels der durchgeführten Verfahren im direkten Gruppenvergleich kein Hinweis auf eine vermehrte Apoptoserate oder Differenzen in der Organentwicklung gefunden werden. Mit Hilfe eines statistischen Auswertungsverfahrens wurden zwei verwertbare, gruppenspezifische Signifikanzen immunhistologischer Parameter nachgewiesen. Der p-p38 MAP-Kinase-IRS (immunreaktiver Score) der Neuronen im Bereich des Stratum intermusculare des Ileums ist bei den Kontrolltieren höher als bei den Tieren der DON-Gruppe und der p-p38 MAP-Kinase-IRS bei den Lymphozyten/-blasten der Leber ist bei den Tieren der DON-Gruppe höher als bei den Kontrolltieren. Die IRS-Werte sind jedoch generell sehr klein und spiegeln demnach ein sehr schwaches Expressionsniveau wider, so dass sie an einem größeren Versuchsgut verifiziert werden sollten.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Pathologie bei der Fragestellung einer diaplazentaren DON-Intoxikation von Schweinefeten am 70. Trächtigkeitstag zur Diagnose-sicherung nicht beitragen kann. Als diagnostisch zuverlässig sind momentan ausschließlich Futtermittelanalysen und Rückstandsuntersuchungen in Kombination mit dem klinischen Bild anzusehen.

7 SUMMARY

Wolf Wippermann

Diaplacentar deoxynivalenol intoxication in porcine fetuses. Are histomorphological and immunohistochemical investigations at the 70th day of gestation a helpful diagnostic tool?

Institut of Pathology of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in August 2010

(71 pages, 27 figures, 47 tables, 342 references, 32 pages appendices)

Keywords: swine, deoxynivalenol, diaplazental, fetus

Contamination of feedstuff with the mycotoxin deoxynivalenol (DON) can be observed world wide in an increasing manner. Concerning farm animals pigs are supposed to be highly susceptible to DON-intoxications. As vomiting was the first observed clinical symptom DON got the trivial name „vomitoxin“. Further typical clinical symptoms are diarrhoea, reduced feed intake and live weight gain.

Currently, two mechanisms of the mycotoxin are known. An antiproliferative activity resulting in the inhibition of the protein biosynthesis in eucaryotic cells as well as an activation of MAP-kinases (mitogen activated protein kinases) which lead to an immunostimulation or -suppression via apoptosis depending on dosage.

Based on these two mechanisms literature describes, that organs with a high protein turnover – such as liver, bone marrow and intestine – and the immune system are particularly vulnerable to DON-intoxications.

A diaplacentar transfer of DON from mother to fetus was proven in pigs, mice and rats. Furthermore, several studies describe multiple pathologic effects in mouse and rat fetuses of DON-intoxicated dams. Nevertheless, the effects of DON on porcine fetuses are inadequately known.

Therefore, the objective of this study was to evaluate potential pathomorphologic correlates to the known clinical symptoms due to experimental DON intoxication using histomorphological and immunohistochemical methods. Furthermore, in order to compile useful diagnostic tools in question of a DON mycotoxicosis, parameters should be identified which can be regarded as characteristic for the influence of DON. Methods and costs should meet relevant conditions of diagnostic pathological practice.

For the purpose of the present study, 12 pregnant sows were randomly allotted into two groups of five (control group) and seven (DON treated group) animals. The pigs were housed separately on a plain asphalt surface and received water ad libitum. In a six-day familiarisation period the animals of the DON treated group received successively increasing mycotoxin concentrations in the diet followed by a 35-day period of feeding the experimental diet with 4.42mg DON per kg diet. The toxin level of the experimental diet was reached by adding naturally contaminated triticale to the diet. At the same time, the animals of the control group received a control diet with a toxin concentration of 0.15 mg DON per kg diet.

At the end of the experiment at day 70 of gestation the fetuses were delivered by cesarean section under anesthesia.

Directly after euthanasia an anatomical preparation of the fetuses was carried out. Lymphonodi, thymus, spleen, liver, bone marrow and small intestine were removed, macroscopically investigated, fixed in formalin and processed routinely for histological purposes. Sections were stained for routine light microscopy (H.E.-stain, PAS-reaction, Sudan-III-stain, Bodian's silver stain) and immunohistochemical methods were carried out using antibodies against CD3 (T-lymphocytes), CD79a (B-lymphocytes), MAC 387 (macrophages), Ki-67 antigen (cell proliferation), p-p38 MAP-kinase (phosphorylated p38 mitogene activated protein kinase, an enzyme involved in apoptosis), caspase 3 and 9 (enzymes involved in apoptosis) and TNF- α (tumor-necrosis-factor- α).

Within the scope of the present study macroscopic, histologic and immunohistochemical investigation methods showed no findings (except of two parameters, see below), which could be regarded as proof or at least as indicative for a DON intoxication compared to the control group. Group comparison neither revealed differences in the rate of apoptoses or organ development.

Not until statistical methods two useful group specific significant immunohistochemical parameters could be found. P-p38 MAP-kinase-IRS (immunoreactive score) of the neurons within the stratum intermusculare of the ileum is higher in control animals than in DON treated pigs. Furthermore, p-p38 MAP-kinase-IRS in the lymphocytes/-blasts in the liver is higher in DON treated animals than in the control group. As IRS values are in general very low which reflects a weak expression intensity, those two parameters should be verified on a larger number of experimental animals.

Summing up, pathological investigation methods as used in this study cannot contribute to the confirmation of a questionable diaplacental DON intoxication in swine fetuses at day 70 of gestation.

The only reliable diagnostic tools, so far, remain diet analyses and mycotoxin residue analyses in combination with clinical symptoms.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Abouzied MM, Azcona JI, Braselton WE, Pestka JJ. Immunochemical assessment of mycotoxins in 1989 grain foods: evidence for deoxynivalenol (vomitoxin) contamination. *Appl Environ Microbiol.* 1991;57:672-7.

Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer SA, Henzel WJ et al. Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J Biol Chem.* 1985;260:2345-54.

Allen LH. Biological mechanisms that might underlie iron's effects on fetal growth and preterm birth. *J Nutr.* 2001; Suppl 131:S581-9.

Alm H, Brussow KP, Torner H, Vanselow J, Tomek W, Danicke S et al. Influence of Fusarium-toxin contaminated feed on initial quality and meiotic competence of gilt oocytes. *Reprod Toxicol.* 2006;22:44-50.

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 1996;87:171.

Amuzie CJ, Harkema JR, Pestka JJ. Tissue distribution and proinflammatory cytokine induction by the trichothecene deoxynivalenol in the mouse: comparison of nasal vs. oral exposure. *Toxicology.* 2008;248:39-44.

Anderson JC. The micro-anatomy of the lymph node of germ-free piglets. *Br J Exp Pathol.* 1972;53:37-9.

Anderson NG, Maller JL, Tonks NK, Sturgill TW. Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature.* 1990;343:651-3.

Anon. Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten. Orientierungswerte für Konzentrationen von Deoxinivalenol und Zearalenon im Futter von Schwein, Rind und Huhn. *VDM.* 2000;27/00:2-3.

Anon. Executive Summary. In: Richard JL, Payne GA, Desjardins AE, Maragos C, Norred WP, Pestka JJ, Phillips TD, van Egmond HP et al., Hrsg. *Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems*, Task Force Report No. 139, Council for Agricultural Science and Technology. 2003. S. 4-11.

Anthony RV, Pratt SL, Liang R, Holland MD. Placental-fetal hormonal interactions: impact on fetal growth. *J Anim Sci.* 1995;73:1861-71.

Appelgren LE, Arora RG, Larsson P. Autoradiographic studies of [³H]zearalenone in mice. *Toxicology.* 1982;25:243-53.

Arnold DL, McGuire PF, Nera EA, Karpinski KF, Bickis MG, Zawidzka ZZ et al. The toxicity of orally administered deoxynivalenol (vomitoxin) in rats and mice. *Food Chem Toxicol.* 1986;24:935-41.

Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998;281:1305-8.

Avraham H, Vannier E, Chi SY, Dinarello CA, Groopman JE. Cytokine gene-expression and synthesis by human megakaryocytic cells. *Int J CellCloning*. 1992;10:70-9.

Awad WA, Bohm J, Razzazi-Fazeli E, Ghareeb K, Zentek J. Effect of addition of a probiotic microorganism to broiler diets contaminated with deoxynivalenol on performance and histological alterations of intestinal villi of broiler chickens. *Poult Sci*. 2006a;85:974-9.

Awad WA, Bohm J, Razzazi-Fazeli E, Zentek J. Effects of feeding deoxynivalenol contaminated wheat on growth performance, organ weights and histological parameters of the intestine of broiler chickens. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2006b;90:32-7.

Azcona-Olivera JI, Ouyang Y, Murtha J, Chu FS, Pestka JJ. Induction of cytokine mRNAs in mice after oral exposure to the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol): relationship to toxin distribution and protein synthesis inhibition. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1995;133:109-20.

Badertscher JA. The development of the thymus in the pig. I. Morphogenesis. *Am J Anat*. 1915a;17:317-37.

Badertscher JA. The development of the thymus in the pig. II. Histogenesis. *Am J Anat*. 1915b;17:437-93.

Bae HK, Pestka JJ. Deoxynivalenol induces p38 interaction with the ribosome in monocytes and macrophages. *Toxicol Sci*. 2008;105:59-66.

Bauer J, Heinritzi K, Gareis M, Gedek B. Veränderungen am Genitaltrakt des weiblichen Schweines nach Verfütterung praxisrelevanter Zearalenonmengen. *Tierärz Prax*. 1987;15:33-6.

Beck R, Lebschy J, Obst A. Fusarien schon im Herbst aufs Korn nehmen. *DLZ-Agrarmagazin: die landwirtschaftliche Zeitung*. 1997a;9:28-32.

Beck R, Lebschy J, Obst A. Gefahr aus der Maisstoppel. *DLG-Mitteilungen*. 1997b:34-8.

Bell ET. The development of the thymus. *Am J Anat*. 1905;5:29-62.

Bergsjø B, Langseth W, Nafstad I, Jansen JH, Larsen HJS. The effects of naturally deoxynivalenol-contaminated oats on the clinical condition, blood parameters, performance and carcass composition of growing pigs. *Vet Res Commun*. 1993;17:283-94.

Bernard A, Boumsell L. Differentiation human-leukocyte antigens - A proposed nomenclature. *Immunol Today*. 1984a;5:158-9.

Bernard A, Boumsell L. The clusters of differentiation (Cd) defined by the 1st international workshop on human-leukocyte differentiation antigens. *Hum Immunol*. 1984b;11:1-10.

Bernhoft A, Behrens GHG, Ingebrigtsen K, Langseth W, Berndt S, Haugen TB et al. Placental transfer of the estrogenic mycotoxin zearalenone in rats. *Reprod Toxicol*. 2001;15:545-50.

Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:625-55.

Bhatnagar D, Yu J, Ehrlich KC. Toxins of filamentous fungi. *Chem Immunol*. 2002;81:167-206.

- Biehl ML, Prelusky DB, Koritz GD, Hartin KE, Buck WB, Trenholm HL. Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1993;121:152-9.
- Binns RM. Cellular immunology in pig. *Proceedings of the royal society of Medicine-London.* 1973;66:1155-60.
- Binns RM. Organisation of the lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig. *Vet Immunol Immunopathol.* 1982;3:95-146.
- Blin PC, Pontois M. Le thymus et la thymectomie chez le Porcelet. *Rec Med Vet.* 1972;148:411-26.
- Böck P. *Romeis-Mikroskopische Technik.* 17. Aufl. Wien: Verlag Urban und Schwarzenberg; 1989.
- Bodian D. A new method for staining nerve fibres and nerv endings in mounted paraffin sections. *Anat Rec.* 1936;65:89-97.
- Bojar H. Rezeptortheorie, Rezeptoranalytik, Möglichkeit der Therapie von Tumoren Steroidhormonen. *Onkologische Diagnostik.* 1988:3-10.
- Bondy GS, Pestka JJ. Immunomodulation by fungal toxins. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2000;3:109-43.
- Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111 Suppl :S460-75.
- Brandtzaeg P, Dale I, Fagerhol MK. Distribution of a formalin-resistant myelomonocytic antigen (L1) in human tissues. I. Comparison with other leukocyte markers by paired immunofluorescence and immunoenzyme staining. *Am J Clin Pathol.* 1987;87:681-99.
- Bu`Lock JD. Secondary metabolism in fungi and its relationship to growth and development. In: Smith JE, Berry DR, Hrsg. *The filamentous fungi.* London, Vol. 1: Edwards Arnold; 1975. S. 33-58.
- Butler JE, Lager KM, Splichal I, Francis D, Kacs Kovics I, Sinkora M et al. The piglet as a model for B cell and immune system development. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;128:147-70.
- Calhoun ML, Smith EM. Hematology and hematopoietic organs. In: Dunne HW, Hrsg. *Diseases of swine.* 3. Aufl. Ames: Iowa State University Press; 1970. S. 38-73.
- Campana D, Thompson JS, Amlot P, Brown S, Janossy G. The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage. *J Immunol.* 1987;138:648-55.
- Carter CJ, Cannon M, Smith KE. Inhibition of protein-synthesis in reticulocyte lysates by trichodermin. *Biochem J.* 1976;154:171-8.
- Cave AJE, Aumonier FJ. Elephant and rhinoceros lymph-node histology. *J Royal Microscop Soc.* 1962;80:209-14.

Chapman HA, Johnson JS, Cooper MD. Ontogeny of Peyer's patches and immunoglobulin-containing cells in pigs. *J Immunol.* 1974;112:555-63.

Chareerntantanakul W, Roth JA. Biology of porcine T lymphocytes. *Anim Health Res Rev.* 2006;7:81-96.

Chelkowski J. Distribution of *Fusarium* species and their mycotoxins in cereal grains. In: Sinha KK, Bhatnagar D, Hrsg. *Mycotoxins in agriculture and food safety.* New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker Inc.; 1998. S. 45-64.

Chievitz JH. Zur Anatomie einiger Lymphdrüsen im erwachsenen und fötalen Zustande. *Arch Anat Physiol.* 1881;5:347-70.

Christensen CM, Nelso GH, Mirocha CJ. Detoriation of stored grains by fungi. *Ann Rev Phytopathol.* 1965a;3:69-84.

Christensen CM, Nelson GH, Mirocha CJ. Effect on the white rat uterus of a toxic substance isolated from *Fusarium*. *Appl Microbiol.* 1965b;13:653-9.

Chuang SS, Li CY. Useful panel of antibodies for the classification of acute leukemia by immunohistochemical methods in bone marrow trephine biopsy specimens. *Am J Clin Pathol.* 1997;107:410-8.

Chung YJ, Zhou HR, Pestka JJ. Transcriptional and posttranscriptional roles for p38 mitogen-activated protein kinase in upregulation of TNF-alpha expression by deoxynivalenol (vomitoxin). *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003;193:188-201.

Cobb MH. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol.* 1999;71:479-500.

Collins TF, Sprando RL, Black TN, Olejnik N, Eppley RM, Hines FA et al. Effects of deoxynivalenol (DON, vomitoxin) on in utero development in rats. *Food Chem Toxicol.* 2006;44:747-57.

Cook RJ. *Fusarium* foot rot of wheat and its control in the pacific northwest. *Plant Dis.* 1980;64:1061-6.

Coppock RW, Swanson SP, Gelberg HB, Koritz GD, Hoffman WE, Buck WB et al. Preliminary-study of the pharmacokinetics and toxicopathy of deoxynivalenol (vomitoxin) in swine. *Am J Vet Res.* 1985;46:169-74.

Costantini P, Bruey JM, Castedo M, Metivier D, Loeffler M, Susin SA et al. Pre-processed caspase-9 contained in mitochondria participates in apoptosis. *Cell Death Differ.* 2002;9:82-8.

Cote LM, Reynolds JD, Vesonder RF, Buck WB, Swanson SP, Coffey RT et al. Survey of vomitoxin-contaminated feed grains in midwestern United States, and associated health problems in swine. *J Am Vet Med Assoc.* 1984;184:189-92.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 1995;378:785-9.

- Cundliffe E, Cannon M, Davies J. Mechanism of inhibition of eukaryotic protein-synthesis by trichothecene fungal toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1974;71:30-4.
- Cundliffe E, Davies JE. Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein-synthesis by trichothecene fungal toxins. *Antimicrob Agents Chemother*. 1977;11:491-9.
- Daddi L. Nouvelle methode pour colorer la graisse dans les tissus. *Arch ital Biol*. 1896; 26:142-6.
- Dale I, Brandtzaeg P, Fagerhol MK, Scott H. Distribution of a new myelomonocytic antigen (L1) in human peripheral blood leukocytes. Immunofluorescence and immunoperoxidase staining features in comparison with lysozyme and lactoferrin. *Am J Clin Pathol*. 1985;84:24-34.
- Dänicke S. Fusariumtoxine in der Tierernährung. *Großtierprax*. 2002;3:02:5-18.
- Dänicke S, Brussow KP, Goyarts T, Valenta H, Ueberschar KH, Tiemann U. On the transfer of the Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) from the sow to the full-term piglet during the last third of gestation. *Food Chem Toxicol*. 2007;45:1565-74.
- Dänicke S, Goyarts T, Doll S, Grove N, Spolders M, Flachowsky G. Effects of the Fusarium toxin deoxynivalenol on tissue protein synthesis in pigs. *Toxicol Lett*. 2006;165:297-311.
- Dänicke S, Valenta H, Ueberschar KH. Risikoabschätzung und Vermeidungsstrategien bei der Fütterung. In: Dänicke S, Oldenburg E, Hrsg. *Risikofaktoren für die Fusariumtoxinbildung in Futtermitteln und Vermeidungsstrategien bei der Futtermittelerzeugung und Fütterung*. Sonderausgabe Nr. 216. *Landbauforschung Völkerode*: 2000. S. 35-139.
- Davis RJ. Mapks - New Jnk expands the group. *Trends Biochem Sci*. 1994;19:470-3.
- Dawlatana M, Coker R, Nagler M, Wild C, Hassan M, Blunden G. The occurrence of mycotoxins in key commodities in Bangladesh: Surveillance results from 1993 to 1995. *J Nat Toxins*. 2002;11:379-86.
- de Botton S, Sabri S, Daugas E, Zermati Y, Guidotti JE, Hermine O, et al. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood* 2002;100:1310-7.
- De Togni P, Goellner J, Ruddle NH, Streeter PR, Fick A, Mariathasan S et al. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science*. 1994;264:703-7.
- Debouck C, Haubruge E, Bollaerts P, van Bignoot D, Brostaux Y, Werry A et al. Skeletal deformities induced by the intraperitoneal administration of deoxynivalenol (vomitoxin) in mice. *Int Orthop*. 2001;25:194-8.
- del Moral MG, Ortuno E, Fernandez-Zapatero P, Alonso F, Alonso C, Ezquerro A, et al. African swine fever virus infection induces tumor necrosis factor alpha production: Implications in pathogenesis. *J Virol*. 1999;73:2173-80.
- del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*. 1997;278:687-9.

- Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T et al. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*. 1994;76:1025-37.
- Di Bartolomeo S, Cecconi F . CASP-9 (caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. December 2006 (zitiert vom 08.10.2009), ISSN 1768-3262 <<http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/CASP9ID423ch1p36.html>>.
- Diekman MA, Green ML. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *J Anim Sci*. 1992;70:1615-27.
- Dimova T, Mihaylova A, Spassova P, Georgieva R. Establishment of the porcine epitheliochorial placenta is associated with endometrial T-cell recruitment. *Am J Reprod Immunol*. 2007;57:250-61.
- Doll S, Danicke S, Ueberschar KH, Valenta H, Schnurrbusch U, Ganter M et al. Effects of graded levels of Fusarium toxin contaminated maize in diets for female weaned piglets. *Arch Tierernahr*. 2003;57:311-34.
- Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:55-72.
- Downward J. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol*. 2004;15:177-82.
- Duan H, Chinnaiyan AM, Hudson PL, Wing JP, He WW, Dixit VM. ICE-LAP3, a novel mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 is activated during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 1996;271:1621-5.
- D'Mello JPF, Macdonald AMC. Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology*. 1997;69:155-66.
- Edwards S, Cantley TC, Day BN. The effects of zearalenone on reproduction in swine. II. The effect on puberty attainment and postweaning rebreeding performance. *Theriogenology*. 1987a;28:51-8.
- Edwards S, Cantley TC, Rottinghaus GE, Osweiler GD, Day BN. The effects of zearalenone on reproduction in swine. I. The relationship between ingested zearalenone dose and anestrus in non-pregnant, sexually mature gilts. *Theriogenology*. 1987b;28:43-9.
- Ehrlich KC, Daigle KW. Protein synthesis inhibition by 8-oxo-12,13-epoxytrichothecenes. *Biochim Biophys Acta*. 1987;923:206-13.
- Ellenberger C, Wilsher S, Allen WR, Hoffmann C, Kolling M, Bazer FW, et al. Immunolocalisation of the uterine secretory proteins uterocalin, uteroferrin and uteroglobin in the mare's uterus and placenta throughout pregnancy. *Theriogenology*. 2008;70:746-57.
- Engel CS. Die Blutkörperchen des Schweins in der ersten Hälfte des embryonalen Lebens. *Arch f mikr Anat*. 1899;54:24-59.
- Enzan H, Hara H, Yamashita Y, Ohkita T, Yamane T. Fine structure of hepatic sinusoids and their development in human embryos and fetuses. *Acta Pathol Jpn*. 1983;33:447-66.

- Ernstmeyer D. Beitrag zur topographischen Anatomie des Halses des Schweines [Dissertation med. vet]. Berlin: Univ. Berlin; 1962.
- Esser K, Lemke PA. Series preface. In: Howard DH, Miller JD, Hrsg. The mycota. Vol. VI. Berlin: Springer Verlag; 1996.
- Fagerhol MK. Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein? Clin Mol Pathol. 1996;49:M74-9.
- Falini B, Flenghi L, Fagioli M, Stein H, Schwarting R, Riccardi C et al. Evolutionary conservation in various mammalian species of the human proliferation-associated epitope recognized by the Ki-67 monoclonal antibody. J Histochem Cytochem. 1989;37:1471-8.
- Fall CH, Yajnik CS, Rao S, Davies AA, Brown N, Farrant HJ. Micronutrients and fetal growth. J Nutr. 2003; Suppl 133:S1747-56.
- Farnworth ER, Trenholm HL. The effect of acute administration of the mycotoxin zearalenone to female pigs. J Environ Sci Health B. 1981;16:239-52.
- Farnworth ER, Trenholm HL. The metabolism of the mycotoxin zearalenone and his effects on the reproductive tracts of young male and female pigs. Can J Anim Sci. 1983;967-75.
- Feinberg B, McLaughlin CS. Biochemical mechanism of action of trichotecene mycotoxins. In: Beasley VR, Hrsg. Trichothecene Mycotoxicosis: Pathophysiologic Effects. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1989. S. 27-35.
- Fichelson S, Freyssinier JM, Picard F, Fontenay-Roupie M, Guesnu M, Cherai M et al. Megakaryocyte growth and development factor-induced proliferation and differentiation are regulated by the mitogen-activated protein kinase pathway in primitive cord blood hematopoietic progenitors. Blood. 1999;94:1601-13.
- Flavell DJ, Jones DB, Wright DH. Identification of tissue histiocytes on paraffin sections by a new monoclonal antibody. J Histochem Cytochem. 1987;35:1217-26.
- Forsyth DM, Yoshizawa T, Morooka N, Tuite J. Emetic and refusal activity of deoxynivalenol to swine. Appl Environ Microbiol. 1977;34:547-552.
- Franklin RA, McCubrey JA. Review: spotlight on apoptosis: Kinases: positiv and negativ regulators of apoptosis. Leukemia. 2000;14:2019-34.
- Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J et al. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. Cell. 1994;78:1039-49.
- Friend DW, Trenholm HL, Thompson BK, Prelusky DB, Hartin KE. Effect of deoxynivalenol (DON)-contaminated diet fed to growing-finishing pigs on their performance at market weight, nitrogen retention and DON excretion. Can J Anim Sci. 1986;66:1075-85.
- Gareis M, Bauer J, Enders C, Gedek B. Contamination of cereals and feed with fusarium mycotoxins in european countries. In: Chelkowski J, Hrsg. Fusarium mycotoxins, taxonomy and pathogenicity. Amsterdam: Elsevier; 1989. S. 441-72.

Garson JA, Beverley PC, Coakham HB, Harper EI. Monoclonal antibodies against human T lymphocytes label Purkinje neurones of many species. *Nature*. 1982;298:375-7.

Gavrieli Y, Sherman Y, Bensasson SA. Identification of programmed cell-death insitu via specific labeling of nuclear-DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992;119:493-501.

Gedek B. Allgemeine Mykologie. In: Rolle M, Mayr A, Hrsg. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 7 Aufl. Stuttgart: Enke Verlag; 2002. S. 589-612.

Gedeck B. Kompendium der medizinischen Mykologie. Berlin, Hamburg: Verlag Paul Parey; 1980.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984;133:1710-5.

Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol*. 1991;138:867-73.

Goyarts T, Danicke S, Brussow KP, Valenta H, Ueberschar KH, Tiemann U. On the transfer of the Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) from sows to their fetuses during days 35-70 of gestation. *Toxicol Lett*. 2007;171:38-49.

Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology*. 1995;21:1465-8.

Green DR. Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system. *Immunol Rev*. 2003;193:5-9.

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998;281:1309-12.

Greene DM, Azconaolivera JI, Pestka JJ. Vomitoxin (deoxynivalenol)-induced Iga nephropathy in the B6C3F1 mouse - dose-response and male predilection. *Toxicology*. 1994;92:245-60.

Grove JF. Non-macrocyclic trichothecenes. *Nat Prod Rep*. 1988;5:187-209.

Grove JF. Non-macrocyclic trichothecenes, part 2. *Prog Chem Org Nat Prod*. 1996;96:1-70.

Habermehl G. Die Bedeutung der Mycotoxikosen für Mensch und Tier. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 1989;7:335-8.

Harvey RB, Edrington TS, Kubena LF, Elissalde MH, Casper HH, Rottinghaus GE et al. Effects of dietary fumonisin B1-containing culture material, deoxynivalenol-contaminated wheat, or their combination on growing barrows. *Am J Vet Res*. 1996;57:1790-4.

Hawksworth DL. The fungal dimension of biodiversity - magnitude, significance, and conservation. *Mycol Res*. 1991;95:641-55.

He P, Young LG, Forsberg C. Microbial transformation of deoxynivalenol (vomitoxin). *Appl Environ Microbiol*. 1992;58:3857-63.

- Heidemann SR. Cancer: a disease of proliferation, life span, and death. In: Cunningham JG, Klein Hrsg, *Veterinary Physiology*. 5. Aufl. St. Louis:Saunders Elsevier; 2007. S. 34-57.
- Heuer G. The development of the lymphatics in the small intestine of the pig. *Am J Anat*. 1909;9:93-118.
- Hirschberger, J. Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen T-Lymphozyten des Huhns [Dissertation med. vet.]. Gießen: Justus-Liebig Univ.; 1987.
- Hinterholzer J. Pflanzenbauliche Aspekte zum Toxinproblem bei Mais. *Veröffentlichungen der Bundesanstalt für Agrarbiologie Linz/Donau*. 1993;21:69-80.
- Hintikka EL, Nikulin M. Airborne mycotoxins in agricultural and indoor environments. *Indoor Air*. 1998;66-70.
- Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25:177-81.
- Horsch F. Entwicklung und Leistung des Immunsystems des Ferkels. *Mh Vet Med*. 1976;11:418-22.
- Hörügel K, Gebhard C, Hanschmann G, Mietke H. Auswirkungen von Verpilzungen und Mykotoxinbehaftung der Futtermittel auf Leistung und Gesundheit bei Schweinen und Rindern. *Gesunde Pflanzen*. 2003;55:151-7.
- Hoshi N, Hashimoto Y, Kitagawa H, Kon Y, Kudo N. Histological and immunohistochemical studies on the architecture of lymph nodes in pig. *J Vet Med Sci*. 1986;48:1097-107.
- Hunt AC. Micro-Anatomy of Lymph Nodes of Pig. *Br J Exp Pathol*. 1968;49:338-9.
- Hurle JM. Cell death in developing systems. *Methods Achiev Exp Pathol*. 1988;13:55-86.
- Hussein HS, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. 2001;167:101-34.
- Ihara T, Yamamoto T, Sugamata M, Okumura H, Ueno Y. The process of ultrastructural changes from nuclei to apoptotic body. *Virchows Arch*. 1998;433:443-7.
- Inderlied CB, Cihlar RL, Sypherd PS. Regulation of ornithine decarboxylase during morphogenesis of *Mucor racemosus*. *J Bacteriol*. 1980;141:699-706.
- Iordanov MS, Pribnow D, Magun JL, Dinh TH, Pearson JA, Chen SL et al. Ribotoxic stress response: activation of the stress-activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the alpha-sarcin/ricin loop in the 28S rRNA. *Mol Cell Biol*. 1997;17:3373-81.
- Islam Z, Nagase M, Ota A, Ueda S, Yoshizawa T, Sakato N. Structure-function relationship of T-2 toxin and its metabolites in inducing thymic apoptosis in vivo in mice. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1998a;62:1492-7.
- Islam Z, Nagase M, Yoshizawa T, Yamauchi K, Sakato N. T-2 toxin induces thymic apoptosis in vivo in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998b;148:205-14.

Islam Z, Pestka JJ. LPS priming potentiates and prolongs proinflammatory cytokine response to the trichothecene deoxynivalenol in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;211:53-63.

Jacobs H. Pre-TCR/CD3 and TCR/CD3 complexes: decamers with differential signaling properties? *Immunol Today.* 1997;18:565-9.

Jelinek CF, Pohland AE, Wood GE. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds - An update. *J Assoc Off Anal Chem.* 1989;72:223-30.

Johnson FP. The development of the lobule of the pig's liver. *Am J Anat.* 1919;25:298-331.

Jonjic N, Jonjic S, Saalmuller A, Rukavina D, Koszinowski UH. Distribution of T-lymphocyte subsets in porcine lymphoid tissues. *Immunology.* 1987;60:395-401.

Jordan HE. A contribution to the problems concerning the origin, struter, genetic relationship and function of the giant-cells of hemopoietic and osteolytic foci. *Am J Anat.* 1918;24:225-69.

Jordan HE. The histogenesis of blood-platelets in the yolk-sac of the pig embryo. *Anat Rec.* 1919;15:390-406.

Kaeoket K, Persson E, Dalin AM. Influence of pre-ovulatory insemination and early pregnancy on the distribution of CD2, CD4, CD8 and MHC class II expressing cells in the sow endometrium. *Anim Reprod Sci.* 2003;76:231-44.

Kadota K, Nakajima H. Histological progression of follicular centre cell lymphomas to immunoglobulin-producing tumours in two pigs. *J Comp Pathol.* 1988;99:145-58.

Kamada S, Kikkawa U, Tsujimoto Y, Hunter T. Nuclear translocation of caspase-3 is dependent on its proteolytic activation and recognition of a substrate-like protein(s). *J Biol Chem.* 2005;280:857-60.

Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA, Mordecai D. Zearalenones: characterization of the estrogenic potencies and receptor interactions of a series of fungal beta-resorcylic acid lactones. *Endocrinology.* 1979;105:33-40.

Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK, Hay N. Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol.* 1999;19:5800-10.

Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology.* 2002;181-182:471-4.

Khera KS, Whalen C, Angers G, Vesonder RF, Kuiper-Goodman T. Embryotoxicity of 4-deoxynivalenol (vomitoxin) in mice. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1982;29:487-91.

Kiang DT, Kennedy BJ, Pathre SV, Mirocha CJ. Binding characteristics of zearalenone analogs to estrogen receptors. *Cancer Res.* 1978;38:3611-5.

King RR, Mcqueen RE, Levesque D, Greenhalgh R. Transformation of deoxynivalenol (vomitoxin) by rumen microorganisms. *J Agric Food Chem.* 1984;32:1181-3.

- Kinser S, Jia Q, Li M, Laughter A, Cornwell P, Corton JC et al. Gene expression profiling in spleens of deoxynivalenol-exposed mice: immediate early genes as primary targets. *J Toxicol Environ Health A*. 2004;67:1423-41.
- Kirkham PA, Takamatsu H, Yang H, Parkhouse RM. Porcine CD3 epsilon: its characterization, expression and involvement in activation of porcine T lymphocytes. *Immunology*. 1996;87:616-23.
- Knight JW, Bazer FW, Thatcher WW, Franke DE, Wallace HD. Conceptus development in intact and unilaterally hysterectomized-ovariectomized gilts: interrelations among hormonal status, placental development, fetal fluids and fetal growth. *J Anim Sci*. 1977;44:620-37.
- Konjevic D, Srebocan E, Gudan A, Lojkic I, Severin K, Sokolovic M. A pathological condition possibly caused by spontaneous trichotecene poisoning in Brahma poultry: first report. *Avian Pathol*. 2004;33:377-80.
- Kostanecki K. Die embryonale Leber in ihrer Beziehung zur Blutbildung. *Anat Hefte*. 1892;1:303-22.
- Kovaru F, Pospisil M, Hofman J, Trebichavsky I. The morphological development and some functional features of the lymphatic tissue in pig fetuses. In: Malek P, Bartos V, Weissleder H, Witte MH, Hrsg. *Lymphology - Proceedings of the VIth International Congress, Prague*. 1977. S. 252-5.
- Koyama M, Ishihara K, Karasuyama H, Cordell JL, Iwamoto A, Nakamura T. CD79 alpha/CD79 beta heterodimers are expressed on pro-B cell surfaces without associated mu heavy chain. *Int Immunol*. 1997;9:1767-72.
- Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, Zapata JM, Shabaik A, Gascoyne R et al. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res*. 1997;57:1605-13.
- Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL et al. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:5752-7.
- Kruml J, Kovaru F, Ludvik J, Trebichavsky I. The development of lymphoid and haemopoietic tissues in pig fetuses. *Folia Microbiol*. 1970a;15:17-22.
- Kruml J, Kovaru F, Pospisil M, Trebichavsky I. The development of lymphatic tissue during ontogeny. In: Sterzl J, Riha I, Hrsg. *Developmental aspects of antibody formation and structure, Proceedings of a symposium held in Prague and Slapy on June 1-7. Prague: Academia*. 1970b. S. 35-54.
- Krysinska-Traczyk E, Kiecana I, Perkowski J, Dutkiewicz J. Levels of fungi and mycotoxins in samples of grain and grain dust collected on farms in Eastern Poland. *Ann Agric Environ Med*. 2001;8:269-74.
- Krugliak L, Meyer PR, Taylor CR. The distribution of lysozyme, alpha-1-antitrypsin, and alpha-1-antichymotrypsin in normal hematopoietic cells and in myeloid leukemias: an immunoperoxidase study on cytocentrifuge preparations, smears, and paraffin sections. *Am J Hematol*. 1986;21:99-109.

Kurki P, Ogata K, Tan EM. Monoclonal-Antibodies to Proliferating Cell Nuclear Antigen (Pcna) Cyclin As Probes for Proliferating Cells by Immunofluorescence Microscopy and Flow-Cytometry. *J Immunol Methods*. 1988;109:49-59.

Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM. Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen (Pcna)/Cyclin During the Cell-Cycle. *Exp Cell Res*. 1986;166:209-19.

Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, et al. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: Critical evaluation and improvement. *J Histochem. Cytochem*. 1998;46:327-34.

Laskin JD, Heck DE, Laskin DL. The ribotoxic stress response as a potential mechanism for MAP kinase activation in xenobiotic toxicity. *Toxicol Sci*. 2002;69:289-91.

Lee EJ, Park HG, Kang HS. Sodium salicylate induces apoptosis in HCT116 colorectal cancer cells through activation of p38MAPK. *Int J Oncol*. 2003;23:503-8.

Lee K, Hyslop JA, Nanassy L, Machaty Z. Incidence of apoptosis in parthenogenetic porcine embryos generated by using protein kinase or protein synthesis inhibitors. *Anim Reprod Sci*. 2009 Jun;112:261-72.

Lesser T, Klinzing S, Schubert H, Kosmehl H. Consequences of one-lung flooding: a histological and immunological investigation. *Eur J Med Res*. 2008;13:432-8.

Lew H. Zur Taxonomie, Häufigkeitsverteilung und Toxogenität der Getreidefusarien. *Proceedings zum 16. Mykotoxin-Workshop und Symposium "Mycotoxin in der Nahrungskette"*, Hohenheim, 16.-18.05.1994, Laf-Informationen, Sonderheft 1. 1994. S. 77-80.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997a;91:479-89.

Li S, Ouyang YL, Pestka JJ, Dong W. Superinduction of IL-2 gene expression by vomitoxin (deoxynivalenol) involves increased mRNA stability. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997b;147:331-42.

Liebich HG. Blut und Blutzellbildung (Sanguis et haemocytogenesis). In: Liebich HG, Hrsg. *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel*. 5. Aufl. Stuttgart, New York: Schattauer. 2010a. S. 143-56.

Liebich HG. Immunsystem und lymphatische Organe (Organa lymphopoetica). In: Liebich HG, Hrsg. *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel*. 5. Aufl. Stuttgart, New York: Schattauer. 2010b. S. 157-72.

Liebich HG. Verdauungsapparat (Apparatus digestorius). In: Liebich HG, Hrsg. *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel*. 5. Aufl. Stuttgart, New York: Schattauer. 2010c. S. 191-254.

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 1996;86:147-57.

- Lun AK, Young LG, Lumsden JH. The effects of vomitoxin and feed intake on the performance and blood characteristics of young pigs. *J Anim Sci.* 1985;61:1178-85.
- Lunney JK, Pescovitz MD. Phenotypic and functional characterization of pig lymphocyte populations. *Vet Immunol Immunopathol.* 1987;17:135-44.
- Malekinejad H, Maas-Bakker R, Fink-Gremmels J. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *Vet J.* 2006;172:96-102.
- Marcaccini A, Aleman N, Quiroga MI, Lopez M, Guerrero F, Nieto JM. Temporary inhibition of neuronal apoptosis in Aujeszky's disease virus-infected swine. *Vet Microbiol.* 2006 Mar 31;113(3-4):237-42.
- Marsden VS, Strasser A. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:71-105.
- Mason DY, Cordell J, Brown M, Pallesen G, Ralfkiaer E, Rothbard J et al. Detection of T-Cells in paraffin wax embedded tissue using antibodies against a peptide sequence from the Cd3 antigen. *J Clin Pathol.* 1989;42:1194-200.
- Mason DY, Cordell JL, Tse AGD, Vandongen JJM, Vannoessel CJM, Micklem K et al. The Igm-associated protein Mb-1 as a marker of normal and neoplastic B-Cells. *J Immunol.* 1991;147:2474-82.
- Mastel K, Michels K. Dauerbrenner Fusarium. *Landinfo.* 2000;9:9-13.
- Matise I, Sirinarumitr T, Bosworth BT, Moon HW. Vascular ultrastructure and DNA fragmentation in swine infected with shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Vet Pathol.* 2000 Jul;37:318-27.
- Mc Laughlin CS, Vaughan MH, Campbell IM, Wei CM, Stafford ME, Hansen BS. Inhibition of protein synthesis by tricothecenes. In: Rodricks JV, Hesseltine CW, Mehlman MA, Hrsg. *Mycotoxins in Human and Animal Health.* Park Forest South: Pathotox Publishers; 1997. S. 263-73.
- Mc Manus JFA. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.* 1948;23:99-108.
- Meky FA, Hardie LJ, Evans SW, Wild CP. Deoxynivalenol-induced immunomodulation of human lymphocyte proliferation and cytokine production. *Food Chem Toxicol.* 2001;39:827-36.
- Meng W, Lahrssen-Wiederholt M, Dänicke S. Undesirable substances in animal nutrition-minimising is possible. *Feed Mag /Kraftfutter.* 2006;1-2:26-33.
- Mesterhazy A, Bartok T. Bekämpfung von Ahrenfusariosen des Weizens durch Fungizide und deren Effekt auf die Toxinverseuchung der Körner. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer.* 1996;49:187-206.
- Miyazawa K, Aso H, Kanaya T, Kido T, Minashima T, Watanabe K, et al. Apoptotic process of porcine intestinal M cells. *Cell Tissue Res.* 2006;323:425-32.

- Minervini F, Dell'Aquila ME, Maritato F, Minoia P, Visconti A. Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on in vitro maturation of bovine oocytes and 17 beta-estradiol levels in mural granulosa cell cultures. *Toxicol In Vitro*. 2001;15:489-95.
- Mirocha CJ, Pathre SV, Robison TS. Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Food Cosmet Toxicol*. 1981;19:25-30.
- Miura K, Nakajima Y, Yamanaka N, Terao K, Shibato T, Ishino S. Induction of apoptosis with fusarenon-X in mouse thymocytes. *Toxicology*. 1998;127:195-206.
- Mollier S. Die Blutbildung in der embryonalen Leber des Menschen und der Säugetiere. *Arch f mikr Anat*. 1909;74:474-524.
- Moon Y, Pestka JJ. Vomitoxin-induced cyclooxygenase-2 gene expression in macrophages mediated by activation of ERK and p38 but not JNK mitogen-activated protein kinases. *Toxicol Sci*. 2002;69:373-82.
- Moon Y, Pestka JJ. Cyclooxygenase-2 mediates interleukin-6 upregulation by vomitoxin (deoxynivalenol) in vitro and in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003;187:80-8.
- Moore KS, Sullivan K, Tan EM, Prystowsky MB. Proliferating Cell Nuclear Antigen Cyclin Is An Interleukin-2-Responsive Gene. *J Biol Chem*. 1987;262:8447-50.
- Morooka N, Uratsuji N, Yoshizawa T, Yamamoto H. Studies on the toxic substances in barley infected with fusarium ssp. *J Food Hyg Soc Japan*. 1972;13:368-75.
- Moskov M, Schiwatschewa T, Bonev S. Vergleichshistologische Untersuchung der Lymphknoten der Säuger Die Lymphknoten des Delphins. *Anat Anz*. 1968;124:49-67.
- Moss MO. The environmental factors controlling mycotoxin formation. In: Smith JE, Anderson RA, Hrsg. *Mycotoxins and animal foods*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1991. S. 37-56.
- Nakamura T, Koyama M, Koike Y, Miyazaki K, Yoneyama A, Higashihara M et al. Suppression of humoral immunity by monoclonal antibody to CD79b, an invariant component of antigen receptors on B lymphocytes. *Int J Hematol*. 1996;64:39-46.
- Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, Brambilla E, Labat-Moleur F. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. *Biomed Pharmacother*. 1998;52:252-8.
- Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D et al. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res*. 1985;13:6361-73.
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*. 1995;376:37-43.
- Nieder C, Petersen S, Petersen C, Thames HD. The challenge of p53 as prognostic and predictive factor in Hodgkin's or non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Hematol*. 2001;80:2-8.

- Notario V, Gale EF, Kerridge D, Wayman F. Phenotypic resistance to Amphotericin-B in *Candida-albicans* - Relationship to glucan metabolism. *J Gen Microbiol.* 1982;128:761-77.
- Oberleithner H. Grundlage der Zellphysiologie. In: Schmidt R, Lang F, Thews G, Hrsg. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie.* 29. Aufl. Berlin: Springer-Verlag; 2005. S. 3-24.
- Obst A. Wie man Ährenfusariosen vermeidet. *DLG-Mitteilungen.* 1988;9:470-1.
- Ohtsubo K, Kaden P, Mittermayer C. Polyribosomal breakdown in mouse fibroblasts (L-cells) by fusarenon-X, a toxic principle isolated from *Fusarium nivale*. *Biochim Biophys Acta.* 1972;287:520-5.
- Oldenburg E, Valenta H, Sator C. Risikoabschätzung und Vermeidungsstrategien bei der Futtermittelerzeugung. In: Dänicke S, Oldenburg E, Hrsg. *Risikofaktoren für die Fusariumtoxinbildung in Futtermitteln und Vermeidungsstrategien bei der Futtermittelerzeugung und Fütterung.* Sonderausgabe Nr. 216. *Landbauforschung Völkerode:* 2000. S. 5-34.
- Olsen M, Kiessling KH. Species differences in zearalenone-reducing activity in subcellular fractions of liver from female domestic animals. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 1983;52:287-91.
- Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ.* 2003;10:431-42.
- Özgen S, Rasch K, Kropp G., Schoon HA, Aupperle H, Sieme H, et al. Aetiopathogenesis and therapy of equine hydromucometra: preliminary data. *Pferdeheilkunde.* 1997;13:533-34.
- Pabst R, Geist M, Rothkotter HJ, Fritz FJ. Postnatal development and lymphocyte production of jejunal and ileal Peyer's patches in normal and gnotobiotic pigs. *Immunology.* 1988;64:539-44.
- Parry DW, Jenkinson P, Mcleod L. *Fusarium ear blight (Scab) in small-grain cereals - A review.* *Plant Pathology.* 1995;44:207-38.
- Pescovitz MD, Book BK, Aasted B, Dominguez J, Ezquerria A, Trebichavsky I et al. Analyses of monoclonal antibodies reacting with porcine CD3: results from the Second International Swine CD Workshop. *Vet Immunol Immunopathol.* 1998;60:261-8.
- Pestka JJ, Bondy GS. Mycotoxin-Induced immune modulation. In: Dean JH, Luster MI, Munson AE, Kimber I, Hrsg. *Immunotoxicology and immunopharmacology.* 2 Aufl. New York: Raven Pree, Ltd; 1994. S. 163-82.
- Pestka JJ, Casale W. Naturally occurring Fungal Toxins. In: Simmons MS, Nriagu J, Hrsg. *Food contamination from environmental sources.* John Wiley and sons, Ltd; 1989. S. 613-38.
- Pestka JJ, Islam Z, Amuzie CJ. Immunochemical assessment of deoxynivalenol tissue distribution following oral exposure in the mouse. *Toxicol Lett.* 2008;178:83-7.
- Pestka JJ. Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis. *Food Addit Contam.* 2008;24:1-13.
- Pestka JJ, Smolinski AT. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2005;8:39-69.

- Pestka JJ, Yan D, King LE. Flow cytometric analysis of the effects of in vitro exposure to vomitoxin (deoxynivalenol) on apoptosis in murine T, B and IgA⁺ cells. *Food Chem Toxicol.* 1994;32:1125-36.
- Pestka JJ, Zhou HR. Interleukin-6-deficient mice refractory to IgA dysregulation but not anorexia induction by vomitoxin (deoxynivalenol) ingestion. *Food Chem Toxicol.* 2000;38:565-75.
- Pestka JJ, Zhou HR, Moon Y, Chung YJ. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. *Toxicol Lett.* 2004;153:61-73.
- Pilozzi E, Pulford K, Jones M, Muller-Hermelink HK, Falini B, Ralfkiaer E et al. Co-expression of CD79a (JCB117) and CD3 by lymphoblastic lymphoma. *J Pathol.* 1998;186:140-3.
- Pluquet O, Hainaut P. Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction. *Cancer Lett.* 2001;174:1-15.
- Pond WG, Mersmann HJ. General characteristics. In: Pond WG, Mersmann HJ, Hrsg. *Biology of the domestic pig.* Ithaca, NY: Cornell Univ.; 2001. S. 1-40.
- Prange-Kiel J, Kreutzkamm C, Wehrenberg U, Rune GM. Role of tumor necrosis factor in preovulatory follicles of swine. *Biol Reprod.* 2001;65:928-35.
- Prelusky DB, Gerdes RG, Underhill KL, Rotter BA, Jui PY, Trenholm HL. Effects of low-level dietary deoxynivalenol on haematological and clinical parameters of the pig. *Nat Toxins.* 1994;2:97-104.
- Prelusky DB, Hamilton RM, Trenholm HL, Miller JD. Tissue distribution and excretion of radioactivity following administration of ¹⁴C-labeled deoxynivalenol to White Leghorn hens. *Fundam Appl Toxicol.* 1986;7:635-45.
- Prelusky DB, Hartin KE, Trenholm HL, Miller JD. Pharmacokinetic fate of ¹⁴C-labeled deoxynivalenol in swine. *Fundam Appl Toxicol.* 1988;10:276-86.
- Pries AR, Zakrzewicz A. Abwehr und Immunität. In: Deetjen P, Speckmann E-J, Hescheler J, Hrsg. *Physiologie.* 4. Aufl. München: Urban und Fischer; 2005. S. 379-415.
- Racke FK, Lewandowska K, Goueli S, Goldfarb AN. Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway is required for megakaryocytic differentiation of K562 cells. *J Biol Chem.* 1997;272:23366-70.
- Radford M. Development of the spleen. *J Anat Physiol.* 1908;42:288-301.
- Radon K, Nowak D. Respiratory diseases in European farmers. Part 1: literature review. *Pneumologie.* 2003;57:444-8.
- Raica M, Cimpean AM, Encica S, Motoc A. Lymphocyte-rich Hassall bodies in the normal human thymus. *Ann Anat.* 2005;187:175-7.

Raingaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem.* 1995;270:7420-6.

Ramael M, Lemmens G, Eerdeken C, Buysse C, Deblie I, Jacobs W, et al. Immunoreactivity for p53 protein in malignant mesothelioma and non-neoplastic mesothelium. *J Pathol.* 1992;168:371-5.

Rankin SL, Partlow GD, McCurdy RD, Giles ED, Fisher KRS. The use of proliferating cell nuclear antigen immunohistochemistry with a unique functional marker to detect postnatal neurogenesis in paraffin-embedded sections of the mature pig brain. *Brain Res Protoc.* 2004;13:69-75.

Rao KM. MAP kinase activation in macrophages. *J Leukoc Biol.* 2001;69:3-10.

Rehakova Z, Trebichavsky I, Sinkora J, Splichal I, Sinkora M. Early ontogeny of monocytes and macrophages in the pig. *Physiol Res.* 1998;47:357-63.

Reth M. Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:97-121.

Richter J. Vergleichende Untersuchungen über den mikroskopischen Bau der Lymphdrüsen von Pferd, Rind, Schwein und Hund. *Arch f mikr Anat.* 1902;60(1):469-514.

Riede UN, Blum HE, Freudenberg N, Werner M. Nekrosemuster. In: Riede UN, Freudenberg N, Werner M, Hrsg. *Basiswissen Allgemeine und Spezielle Pathologie.* Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2009. S. 33-40.

Ritter PM, Marti A, Blanc C, Baltzer A, Krajewski S, Reed JC et al. Nuclear localization of procaspase-9 and processing by a caspase-3-like activity in mammary epithelial cells. *Eur J Cell Biol.* 2000;79:358-64.

Rojnuckarin P, Drachman JG, Kaushansky K. Thrombopoietin-induced activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in normal megakaryocytes: role in endomitosis. *Blood.* 1999;94:1273-82.

Rothkotter HJ, Pabst R. Lymphocyte subsets in jejunal and ileal Peyer's patches of normal and gnotobiotic minipigs. *Immunology.* 1989;67:103-8.

Rotter BA, Prelusky DB, Pestka JJ. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J Toxicol Environ Health.* 1996;48:1-34.

Rotter BA, Thompson BK, Clarkin S, Owen TC. Rapid colorimetric bioassay for screening of *Fusarium* mycotoxins. *Nat Toxins.* 1993;1:303-7.

Rotter BA, Thompson BK, Lessard M. Effects of deoxynivalenol-contaminated diet on selected blood parameters in growing swine. *Can J Anim Sci.* 1995;75:297-302.

Rotter BA, Thompson BK, Lessard M, Trenholm HL, Tryphonas H. Influence of low-level exposure to *Fusarium* mycotoxins on selected immunological hematological parameters in young swine. *Fundam Appl Toxicol.* 1994;23:117-24.

Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M,onso-Llamazares A, Zamanillo D et al. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*. 1994;78:1027-37.

Rüsse I. Herz- und Kreislaufsystem. In: Rüsse I, Sinowatz F, Hrsg. Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Berlin und Hamburg: Verlag Paul Parey; 1991. S. 221-46.

Saalmuller A, Bryant J. Characteristics of porcine T lymphocytes and T-cell lines. *Vet Immunol Immunopathol*. 1994;43:45-52.

Sabin FR. The development of the lymphatic nodes in the pig and their relation to the lymph hearts. *Am J Anat*. 1905;4:355-89.

Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*. 1997;91:443-6.

Sandrock B, Hudson KM, Williams DE, Lieberman MA. Cytokine production by a megakaryocytic cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1996;32:225-33.

Sato M, Mikami O, Kobayashi M, Nakajima Y. Apoptosis in the lymphatic organs of piglets inoculated with classical swine fever virus. *Vet Microbiol*. 2000 Jul 3;75:1-9.

Sawhney N, Hall PA. Ki67--structure, function, and new antibodies. *J Pathol*. 1992;168:161-2.

Schaafsma AW. Economic changes imposed by mycotoxins in food grains: case study of deoxynivalenol in winter wheat. *Adv Exp Med Biol*. 2002;504:271-6.

Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol*. 1999;19:2435-44.

Schafer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci*. 1996;21:134-40.

Schlegel J, Peters I, Orrenius S, Miller DK, Thornberry NA, Yamin TT et al. CPP32/apopain is a key interleukin 1 beta converting enzyme-like protease involved in Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem*. 1996;271:1841-4.

Schnurrbusch U, Heinze A. Achtung Mykotoxine! dlz agrarmagazin, Ausgabe Österreich. 2002;10:112-117.

Schoenebeck F. Pflanzenkrankheiten. Stuttgart: B.G. Teubner; 1997.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182:311-22.

Schuh M. Klinische Auswirkungen der in Österreich vorkommenden Mykotoxine. *Wien tierärztl Mschr*. 1981;68:308-12.

Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev*. 1993;14:133-51.

- Scudamore KA, Nawaz S, Hetmanski MT. Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: II. determination of mycotoxins in maize and maize products. *Food Addit Contam.* 1998;15:30-55.
- Shifrin VI, Anderson P. Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis. *J Biol Chem.* 1999;274:13985-92.
- Shinozuka J, Suzuki M, Noguchi N, Sugimoto T, Uetsuka K, Nakayama H et al. T-2 toxin-induced apoptosis in hematopoietic tissues of mice. *Toxicol Pathol.* 1998;26:674-81.
- Sinkora J, Rehakova Z, Sinkora M, Cukrowska B, Tlaskalova-Hogenova H. Early development of immune system in pigs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002a;87:301-6.
- Sinkora M, Butler JE. The ontogeny of the porcine immune system. *Dev Comp Immunol.* 2009;33:273-83.
- Sinkora M, Butler JE, Holtmeier W, Sinkorova J. Lymphocyte development in fetal piglets: facts and surprises. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005;108:177-84.
- Sinkora M, Sinkora J, Rehakova Z, Butler JE. Early ontogeny of thymocytes in pigs: sequential colonization of the thymus by T cell progenitors. *J Immunol.* 2000;165:1832-9.
- Sinkora M, Sinkora J, Rehakova Z, Splichal I, Yang H, Parkhouse RM et al. Prenatal ontogeny of lymphocyte subpopulations in pigs. *Immunology.* 1998;95:595-603.
- Sinkora M, Sinkorova J, Butler JE. B cell development and VDJ rearrangement in the fetal pig. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002b;87:341-6.
- Sinkora M, Sun J, Sinkorova J, Christenson RK, Ford SP, Butler JE. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. VI. B cell lymphogenesis occurs at multiple sites with differences in the frequency of in-frame rearrangements. *J Immunol.* 2003;170:1781-8.
- Sinowatz F. Bewegungsapparat. In: Rüsse I, Sinowatz F, Hrsg. *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere.* Berlin und Hamburg: Verlag Paul Parey; 1991a. S. 379-98.
- Sinowatz F. Verdauungskanal und Anhangsorgane. In: Rüsse I, Sinowatz F, Hrsg. *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere.* Berlin und Hamburg: Verlag Paul Parey; 1991b. S. 338-67.
- Smith KE, David ET. Initiation of protein-synthesis in cell-free-extracts of *Tetrahymena-pyriformis*. *Biochem J.* 1981;196:641-4.
- Spalding H, Heath T. Pathways of lymph flow through superficial inguinal lymph nodes in the pig. *Anat Rec.* 1987;217:188-95.
- Sterzl J, Kovaru F. Development of lymphatic tissue and immunocompetency in pig foetuses and germ-free piglets. *Acta Vet. Brno.* 1977;46 Suppl :13-53.
- Stob M, Baldwin RS, Tuite J, Andrews FN, Gillette KG. Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*. *Nature.* 1962;196:1318.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N et al. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med.* 1999;189:381-94.

Sutton JC. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Can J Plant Pathol.* 1981;4:195-209.

Swanson SP, Nicoletti J, Rood HD, Jr., Buck WB, Cote LM, Yoshizawa T. Metabolism of three trichothecene mycotoxins, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol and deoxynivalenol, by bovine rumen microorganisms. *J Chromatogr.* 1987;414:335-42.

Tamm C. Chemistry and biosynthesis of trichothecenes. In: Rodricks JV, Hesseltine CW, Mehlman MA, Hrsg. *Mycotoxins in human and animal health.* Park Forest South, IL: Pathotox Publishers; 1977. S. 209-28.

Tanimoto T, Minami A, Yano S, Ohtsuki Y. Ileal lymphoma in swine. *Vet Pathol.* 1994;31:629-36.

Tanimoto T, Ohtsuki Y. T-cell-rich B-cell lymphoma in a pig. *Vet Pathol.* 1998;35:147-9.

The Commission of the European Communities. Commission recommendation of 17 August 2006: on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisin in products intended for animal feeding. *Off J European Union.* 2009;L229:7-9.

Thiel GA, Downey H. The development of the mammalian spleen, with special reference to its hematopoietic activity. *Am J Anat.* 1921;28:279-333.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science.* 1998;281:1312-6.

Tiemann U, Brussow KP, Dannenberger D, Jonas L, Pohland R, Jager K et al. The effect of feeding a diet naturally contaminated with deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) on the spleen and liver of sow and fetus from day 35 to 70 of gestation. *Toxicol Lett.* 2008;179:113-7.

Tiemann U, Brussow KP, Jonas L, Pohland R, Schneider F, Danicke S. Effects of diets with cereal grains contaminated by graded levels of two *Fusarium* toxins on selected immunological and histological measurements in the spleen of gilts. *J Anim Sci.* 2006;84:236-45.

Tiemann U, Danicke S. In vivo and in vitro effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs: a review. *Food Addit Contam.* 2007;24:306-14.

Trautmann A, Fiebiger J. Blutbildende Organe. In: Trautmann A, Fiebiger J, Hrsg. *Histologie und vergleichende mikroskopische Anatomie der Haustiere.* 9. Aufl. Berlin und Hamburg: Paul Parey Verlag; 1949. S. 98-117.

Tunnacliffe HA, Ollson C, Traunecker A, Krissansen GW, Karjalainen K, De La Hera A. The majority of CD3 epitopes are conferred by the epsilon chain. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, et al., Hrsg. *Leukocyte typing IV. With cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference, 1989 Feb 21-25.* Oxford, New York, Tokio: Oxford University Press; 1989. S. 295-6.

- Ueno Y, Hosoya M, Morita Y, Ueno I, Tatsuno T. Inhibition of the protein synthesis in rabbit reticulocyte by Nivalenol, a toxic principle isolated from *Fusarium nivale*-growing rice. *J Biochem.* 1968;64:479-85.
- Ueno Y. Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes. *Fundam Appl Toxicol.* 1984;4:S124-S32.
- Ueno Y, Yagasaki S. Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria*. X. Accelerating effect of zearalenone on RNA and protein syntheses in the uterus of ovariectomized mice. *Jpn J Exp Med.* 1975;45:199-205.
- Urry WH, Wehrmeister HL, Hodge EB, Hidy PH. The structure of zearalenone. *Tetra Lett.* 1966;27:3109-14.
- Van Noesel CJ, Borst J, De Vries EF, Van Lier RA. Identification of two distinct phosphoproteins as components of the human B cell antigen receptor complex. *Eur J Immunol.* 1990;20:2789-93.
- Vardon PJ. Potential economic costs of mycotoxins in the United States. In: Richard JL, Payne GA, Desjardins AE, Maragos C, Norred WP, Pestka JJ, Phillips TD, van Egmond HP et al., Hrsg. *Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems, Task Force Report No. 139, Council for Agricultural Science and Technology.* 2003. S. 136-42.
- Vesonder RF, Ciegler A, Jensen AH. Isolation of the emetic principle from *Fusarium*-infected corn. *Appl Microbiol.* 1973;26:1008-10.
- Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem.* 1991;266:7313-6.
- Vo TD, van Ederen AM, Ultee A, Hendriksen SW, van Beers-Schreurs HM, Gruys E. Lymphosarcoma in a boar. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2004;51:348-53.
- Vojtesek B, Bartek J, Midgley CA, Lane DP. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunol Methods.* 1992;151:237-44.
- Vollmerhaus B. Lymphatisches System. In: Nickel R, Schummer A, Seiferle E, Hrsg. In: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band III, Kreislaussystem, Haut und Hautorgane.* 2. Aufl. Berlin und Hamburg: Paul Parey Verlag; 1984. S. 276-452.
- Waibl H. Zur Anatomie des Schweinethymus: Gliederung, Topographie Skeletotopie und Vaskularisation. *Anat Histol Embryol.* 1982;11:213-33.
- Warren HL, Kommedahl T. Fertilization and wheat refuse effects on *Fusarium* species associated with wheat roots in Minnesota. *Phytopathol.* 1973;63:103-8.
- Waskiewicz AJ, Cooper JA. Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr Opin Cell Biol.* 1995;7:798-805.
- Wei CM, Campbell IM, McLaughlin CS, Vaughan MH. Binding of trichodermin to mammalian ribosomes and its inhibition by other 12,13-epoxytrichothecenes. *Mol Cell Biochem.* 1974;3:215-9.

- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 1999;79:143-80.
- Williams BRG. Signal Integration via PKR. *Sci STKE* 2001;(89):re2.
- Wollenhaupt K, Tomek W, Tiemann U. Comparison of the molecular effects of the mycotoxins beta-zearalenol and deoxynivalenol in porcine endometrial cells--a review. *Acta Vet Hung.* 2007;55:123-33.
- Wong SS, Zhou HR, Marin-Martinez ML, Brooks K, Pestka JJ. Modulation of IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha secretion and mRNA expression by the trichothecene vomitoxin in the RAW 264.7 murine macrophage cell line. *Food Chem Toxicol.* 1998;36:409-19.
- Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kagi D et al. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev.* 1998;12:806-19.
- Wu G, Ott TL, Knabe DA, Bazer FW. Amino acid composition of the fetal pig. *J Nutr.* 1999;129:1031-8.
- Yan D, Zhou HR, Brooks KH, Pestka JJ. Potential role for IL-5 and IL-6 in enhanced IgA secretion by Peyer's patch cells isolated from mice acutely exposed to vomitoxin. *Toxicology.* 1997;122:145-58.
- Yang GH, Jarvis BB, Chung YJ, Pestka JJ. Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: relationship to ERK, p38 MAPK, and SAPK/JNK activation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000;164:149-60.
- Yoshizawa T, Morooka N. Deoxynivalenol and its monoacetate: new mycotoxins from *Fusarium roseum* and moldy barley. *Agr Biol Chem.* 1973;37:2933-4.
- Young LG, McGirr L, Valli VE, Lumsden JH, Lun A. Vomitoxin in corn fed to young pigs. *J Anim Sci.* 1983;57:655-64.
- Zheng TS, Schlosser SF, Dao T, Hingorani R, Crispe IN, Boyer JL et al. Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:13618-23.
- Zhou HR, Harkema JR, Hotchkiss JA, Yan D, Roth RA, Pestka JJ. Lipopolysaccharide and the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol) synergistically induce apoptosis in murine lymphoid organs. *Toxicol Sci.* 2000;53:253-63.
- Zhou HR, Islam Z, Pestka JJ. Rapid, sequential activation of mitogen-activated protein kinases and transcription factors precedes proinflammatory cytokine mRNA expression in spleens of mice exposed to the trichothecene vomitoxin. *Toxicol Sci.* 2003a;72:130-42.
- Zhou HR, Islam Z, Pestka JJ. Induction of competing apoptotic and survival signaling pathways in the macrophage by the ribotoxic trichothecene deoxynivalenol. *Toxicol Sci.* 2005a;87:113-22.
- Zhou HR, Jia Q, Pestka JJ. Ribotoxic stress response to the trichothecene deoxynivalenol in the macrophage involves the SRC family kinase Hck. *Toxicol Sci.* 2005b;85:916-26.

Zhou HR, Lau AS, Pestka JJ. Role of double-stranded RNA-activated protein kinase R (PKR) in deoxynivalenol-induced ribotoxic stress response. *Toxicol Sci.* 2003b;74:335-44.

Zhou HR, Yan D, Pestka JJ. Differential cytokine mRNA expression in mice after oral exposure to the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol): dose response and time course. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997;144:294-305.

Zhou HR, Yan D, Pestka JJ. Induction of cytokine gene expression in mice after repeated and subchronic oral exposure to vomitoxin (deoxynivalenol): differential toxin-induced hyporesponsiveness and recovery. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998;151:347-58.

Zietzschmann O, Krölling O. Die Entwicklung der Organsysteme (Organogenese). In: Zietzschmann O, Krölling O, Hrsg. *Lehrbuch der Entwicklungsgeschichte der Haustiere.* 2. Aufl. Berlin und Hamburg: Paul Parey Verlag; 1955. S. 189-468.

Zollner P, Jodlbauer J, Kleinova M, Kahlbacher H, Kuhn T, Hochsteiner W et al. Concentration levels of zearalenone and its metabolites in urine, muscle tissue, and liver samples of pigs fed with mycotoxin-contaminated oats. *J Agric Food Chem.* 2002;50:2494-501.

9 ANHANG

9.1 Futtermittelzusammensetzung und Analyse nach GOYARTS et al. 2007

Tab. 9.1: Futtermittelzusammensetzung (g/kg), umsetzbare Energie und Analyse ausgewählter Inhaltsstoffe

	Kontrollgruppe	Versuchsgruppe
Zusammensetzung		
Kontrolltritikale	150	0
Kontaminierte Triticale	0	150
Weizen	250	250
Gerste	284,3	284,3
Getrocknete Kartoffeln	100	100
Sojabohnenextraktionsmehl	175	175
Sojaöl	10	10
Vilomin 19730 ^a	30	30
L-Lysin HCL	0,7	0,7
Kalkulierte Zusammensetzung		
Trockensubstanz	875	875
Umsetzbare Energie (MJ/kg)	12,6	12,6
Rohprotein (g/kg TS)	167	167
Rohfaser (g/kg TS)	49	49
Lysin	8,6	8,6
Threonin	5,7	5,7
Tryptophan	2,0	2,0
Kalzium	1,6	1,6
Gesamtphosphor	3,2	3,2
Natrium	0,7	0,7
Deoxynivalenol (mg/kg) ^b	0,0	4,89
Zearalenon (µg/kg) ^b	0,0	57,4
Analysierte Inhaltsstoffe		
Trockensubstanz	901	903
Rohprotein (g/kg TS)	156	157
Deoxynivalenol (mg/kg) ^c	0,15	4,42
Zearalenon (µg/kg) ^c	3,5	48,3

Legende zu Tab. 9.1:

^a Vormischung Anteil/kg: Ca: 6,3 g; P: 2,1 g; Lysin: 0,6 g; Na: 1,8 g; Mg: 0,3 g; Vitamin A: 15,000 IE; Vitamin D3: 1500 IE; Vitamin E: 45 mg; Cu: 22,5 mg; Se: 0,36 mg

^b Berechnet auf der Basis der analysierten Konzentrationen der Getreidechargen

^c Gemessen mit HPLC-Methoden (high performance liquid chromatography)

TS: Trockensubstanz

9.2 Analyseergebnisse einiger Kontroll- und Versuchstiere

Tab. 9.2: Verteilung/Gehalt des Deoxynivalenols und seines konjugierten Derivates (deepoxy-DON) in Urin, Gallenflüssigkeit und Serum der Sauen und einiger Fetten der Kontroll- und der Versuchsgruppe (GOYARTS et al. 2007)

	Sauen Kontrollgr. (n = 5)	Sauen Versuchsgr. (n = 7)	Feten Kontrollgr. (n = 5)	Feten Versuchsgr. (n = 7)
Urin				
DON (ng/g)	57 (11–82)	1588* (482–3229)	0	4 (0–7)
deepoxy-DON (ng/g)	0	320* (148–483)	0	0
deepoxy-DON (%)	0	17,8* (5,7–28,2)	–	0
Futter-Quotient	0,380 (0,072–0,543)	0,454 (0,152–0,840)	0	0,001 (0–0,002)
Fetus-Quotient			–	0,002 (0–0,006)
Plazenta-Quotient				0,34 (0–0,64)
Gallenflüssigkeit				
DON (ng/g)	0 (0–5)	76* (49–156)	0	0
deepoxy-DON (ng/g)	0	24* (8–65)	0	0
deepoxy-DON (%)	0	24* (9,6–29,4)	–	–
Futtermittel-Quotient	0 (0–0,033)	0,023 (0,013–0,050)	0	0
Fetus-Quotient			–	0
Plazenta-Quotient			–	0
Serum				
DON (ng/g)	0	11* (4–13)	0	2* (0–4)
deepoxy-DON (ng/g)	0	0	0	0
deepoxy-DON (%)	–	0	–	0
Futtermittel-Quotient	0	0,002* (0,001–0,003)	0	0,001* (0–0,001)
Fetus-Quotient			–	0,23* (0–0,5)
Plazenta-Quotient			–	0,23* (0–0,5)

Legende zu Tab. 9.2:

DON: Deoxynivalenol; Fetus-Quotient: (Summe der DON- + deepoxy-DON-Konzentration der spezifischen Probe aus dem Fetus)/(Summe der DON- + deepoxy-DON-Konzentration der spezifischen Probe aus der Sau); Futter-Quotient: (Summe der DON- + deepoxy-DON-Konzentration der spezifischen Probe aus dem Fetus bzw, der Sau)/(DON-Konzentration des Futtermittels); Kontrollgr.: Kontrollgruppe; Plazenta-Quotient: (Summe der DON- + deepoxy-DON-Konzentration der spezifischen Probe aus dem Fetus)/(Summe der DON- + deepoxy-DON-Konzentration des Serums der Sau); Versuchsgr.: Versuchsgruppe

* Signifikante Abweichung von der entsprechenden Kontrolle (Mann-Whitney-Test, $p < 0.05$).

Tab. 9.3: Verteilung/Gehalte des Deoxynivalenols und seines konjugierten Derivates (deepoxy-DON) in Leber, Niere und Milz der Sauen und einiger Fetten der Kontroll- und der Versuchsgruppe (GOYARTS et al. 2007)

	Sauen Kontrollgr. (n = 5)	Sauen Versuchsgr. (n = 7)	Feten Kontrollgr. (n = 5)	Feten Versuchsgr. (n = 7)
Leber				
DON (ng/g)	0	6,7* (4,3–8,7)	0	4,9* (2,6–7,0)
deepoxy-DON (ng/g)	0	0	0	0
deepoxy-DON (%)	–	0	–	0
Futter-Quotient	0	0,002* (0,001–0,003)	0	0,001 (0,001–0,002)
Fetus-Quotient			–	0,75* (0,26–0,88)
Plazenta-Quotient			0	0,55 (0,35–0,70)
Niere				
DON (ng/g)	0 (0–1,5)	20,3* (16,2–27,7)	0	3,6* (3,0–5,4)
deepoxy-DON (ng/g)	0	1,8* (0–3,2)	0	0
deepoxy-DON (%)	–	7,8* (0–13,6)	–	0
Futtermittel-Quotient	0 (0–0,010)	0,005* (0,004–0,007)	0	0,001* (0,0007–0,0012)
Fetus-Quotient			–	0,18* (0,10–0,33)
Plazenta-Quotient			–	0,45* (0,31–0,52)
Milz				
DON (ng/g)	0	7,5* (4,7–8,7)	n.a.	n.a.
deepoxy-DON (ng/g)	0	0 (0–4,4)	n.a.	n.a.
deepoxy-DON (%)	–	0 (0–36,4)		
Futtermittel-Quotient	0	0,002* (0,001–0,003)		

Legende zu Tab. 9.3:

DON: Deoxynivalenol; Fetus-Quotient: (Summe der DON- + deepoxy-DON-Konzentration der spezifischen Probe aus dem Fetus)/(Summe der DON- + deepoxy-DON-Konzentration der spezifischen Probe aus der Sau); Futter-Quotient: (Summe der DON- + deepoxy-DON-Konzentration der spezifischen Probe aus dem Fetus bzw. der Sau)/(DON-Konzentration des Futtermittels); Kontrollgr.: Kontrollgruppe; n.a.: nicht analysiert; Plazenta-Quotient: (Summe der DON- + deepoxy-DON-Konzentration der spezifischen Probe aus dem Fetus)/(Summe der DON- + deepoxy-DON-Konzentration des Serums der Sau); Versuchsgr.: Versuchsgruppe

* Signifikante Abweichung von der entsprechenden Kontrolle (Mann-Whitney-Test, $p < 0.05$).

9.3 Charakterisierung der Kontrollschweine

Tab. 9.4: Charakterisierung der zwei Kontrollschweine unter Einbeziehung des Todeszeitpunktes und der Hauptsektionsbefunde

Schwein	Alter	Rasse	Todeszeitpunkt	Hauptbefund
A	2 Wochen	Landrasse	Mai 2007	Enteritis
B	2 Wochen	Landrasse	Juni 2007	Bronchopneumonie

9.4 Verfahrensschritte der immunhistologischen Untersuchungen

9.4.1 Vorbehandlung an Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten

1. Aufziehen von 3-4 µm dicken Schnitten auf SuperFrost[®] Plus Objektträger (041300, Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig)
30 min Trocknen bei Raumtemperatur vor einem Ventilator, anschließend Lagerung über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C
2. Entparaffinierung und Rehydrierung
10 min Xylol
3 min Xylol
2 x je 3 min Isopropanol
3 min 96% Alkohol
3. Inaktivierung der endogenen Peroxidase
30 min in Methanol mit frisch zugesetztem 0,5% H₂O₂ bei Raumtemperatur (Perhydrol 30% H₂O₂ p.a., 107210, Merck, Darmstadt)
4. Waschen in TBS

9.4.2 Besondere Verfahren

Vor dem Aufbringen der Objektträger auf die Coverplates[™] wurde zunächst zum Nachweis des CD79-Antigens, TNF- α und der Caspase 3 eine Zitrat-Behandlung mit einem pH-Wert von 6,0 durchgeführt, während die Objektträger zum Nachweis des CD3-Antigens, des Ki-67 Antigens und des Myeloid/Histiozyten-Antigens mit Protease vorbehandelt wurden. Für die Schnitte zum Nachweis der Caspase 9 und p-p38 MAP-Kinase wurde keine Vorbehandlung benötigt.

Zitrat-Behandlung (pH 6)

1. 10 mM Zitratpuffer pH 6,0 auf 96°C vorwärmen
2. 30 min Inkubation der Schnitte in Zitratpuffer bei 96°C
3. 30 min Abkühlen bei Zimmertemperatur
4. Spülen in TBS

Protease-Behandlung

1. 5 min Spülen der Schnitte in PBS bei 37°C
2. 5 min Inkubieren der Schnitte in 0,05% Protease in PBS bei 37°C (bakterielle Protease Typ XXIV, P8038, Sigma Chemie, Deisenhofen)
3. 3 x 5 min Spülen der Schnitte in eiskaltem TBS

9.4.3 Antigennachweis mittels monoklonaler AK nach der Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP)-Methode

1. Wechseln der Schnitte aus der Küvette in CoverplatesTM (721100013 Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main)
2. Einbringen von je 100 µl des in 1% BSA (3895 Boehringer, Mannheim) in TBS verdünnten Primärantikörpers bzw. des Kontrollserums in die CoverplatesTM
3. Inkubation über Nacht bei 4°C
4. Spülen durch Einbringen von 2 ml TBS je CoverplateTM
5. 30 min Inkubation bei Raumtemperatur mit 100 µl Ratte anti-Maus IgG (1:100 in 1% BSA) (Bovines Serum Albumin, 3895 Boehringer, Mannheim) in TBS je CoverplateTM
6. Spülen durch Einbringen von 2 ml TBS je CoverplateTM
7. 30 min Inkubation bei Raumtemperatur mit 100 µl Maus-PAP (1:500 in 1% BSA in TBS) je CoverplateTM
8. Spülen durch Einbringen von je 2 ml TBS je CoverplateTM
weiter mit Abschnitt 9.4.7

9.4.4 Antigennachweis mittels monoklonaler Antikörper in einem 2-Schritt-Detektionssystem (EnVisionTM)

1. Wechseln der Schnitte aus der Küvette in CoverplatesTM (721100013 Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main)
2. Einbringen von 100 µl des in 1%igen BSA (3895 Boehringer, Mannheim) in TBS verdünnten Primärantikörpers (bzw. das Kontrollserum) in die CoverplatesTM
3. Inkubation über Nacht bei 4°C
4. Spülen durch Einbringen von 2 ml TBS je CoverplateTM
5. Einbringen von 100 µl unverdünntem EnVisionTM (DAKO GmbH, Hamburg) 30 min. Inkubation bei Raumtemperatur
weiter mit Abschnitt 9.4.7

9.4.5 Antigennachweis mittels polyklonaler AK nach der Peroxidase anti-Peroxidase (PAP)-Methode

1. Wechseln der Schnitte aus der Küvette in CoverplatesTM (721100013, Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main)
2. Blocken der unspezifischen Bindungen mit 1:2 Schweineserum in TBS 10 min bei Raumtemperatur
3. Einbringen von je 100 µl des in 20% Schweineserum in TBS verdünnten Primärantikörpers in die CoverplatesTM
4. Inkubation über Nacht bei 4°C
5. Spülen durch Einbringen von 2 ml TBS je CoverplateTM
6. Einbringen von je 100 µl Schwein anti-Kaninchen IgG 1:100 in 20% Schweineserum in TBS je CoverplateTM
7. 30 min Inkubation bei Raumtemperatur
8. Spülen durch Einbringen von 2 ml TBS je CoverplateTM

9. Einbringen von je 100 µl Kaninchen-PAP 1:100 in 20% Schweineserum in TBS je Coverplate™
10. 30 min Inkubation bei Raumtemperatur
11. Spülen durch Einbringen von je 2 ml TBS je Coverplate™ weiter mit Abschnitt 9.4.7

9.4.6 Antigennachweis mittels indirekter Peroxidase

1. Wechseln der Schnitte aus der Küvette in Coverplates™ (721100013, Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main)
2. Blocken der unspezifischen Bindungen mit 1:2 Schweineserum in TBS 10 min bei Raumtemperatur
3. Einbringen von je 100 µl des in 1% BSA in TBS verdünnten Primärantikörpers in die Coverplates™
4. Inkubation über Nacht bei 4°C
5. Spülen durch Einbringen von 2 ml TBS je Coverplate™
6. Einbringen von je 100 µl Kaninchen-anti-Ziege 1:100 in 1% BSA in TBS je Coverplate™
7. 30 min Inkubation bei Raumtemperatur
8. Spülen durch Einbringen von je 2 ml TBS je Coverplate™ weiter mit Abschnitt 9.4.7

9.4.7 Standard zur Nachbehandlung

1. Wechseln der Schnitte aus den Coverplates® in eine Küvette
2. 10 min Inkubation der Schnitte unter ständigem Rühren (Magnetrührer) in 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB, Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm) mit 0,01% H₂O₂ (30%) 0,1 M Imidazolpuffer (pH 7,1) bei Raumtemperatur
3. 3 x 5 min Waschen in TBS bei Raumtemperatur
4. 5 min Waschen in Aqua dest. bei Raumtemperatur
5. 10 sec Gegenfärbung mit PAPANICOLAOUs Lösung und 5 min Bläuen in Leitungswasser
6. Je 3 min Entwässern in der aufsteigenden Alkoholreihe 5 min Roti®-Histol
5 min Roti®-Histol
10 min Xylol
7. Eindecken der Objektträger mittels Eindeckautomat Tissue Tek (Vogel GmbH & Co KG, Gießen)

9.5 Verwendete mono- und polyklonale Antikörper und Seren

Die Primärantikörper, ihre Bezugsquellen sowie die verwendeten Verdünnungen sind der folgenden Übersicht zu entnehmen:

<u>Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
<u>Polyklonale Antikörper</u>		
Kaninchen anti-human p-p38 MAP-Kinase	1 : 150	Sc-17852-R Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg
Kaninchen anti-human Caspase 3	1 : 150	12107 Dianova GmbH Hamburg
Kaninchen anti-human Caspase 9	1 : 200	12134 Dianova GmbH Hamburg
Ziege anti-human TNF α	1 : 25	Sc-1350 Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg
Kaninchen anti-human CD3	1 : 300	A 0452 Dako Deutschland GmbH Hamburg
<u>Monoklonale Antikörper</u>		
Maus anti-human MAC387	1 : 1000	M 0747 Dako Deutschland GmbH Hamburg
Maus anti-human Ki-67	1 : 20	M 7240 Dako Deutschland GmbH Hamburg
Maus anti-human CD79a	1 : 5	M 7051 Dako Deutschland GmbH Hamburg

Schweineserum

Das von Schlachtschweinen stammende Serum wurde sterilfiltriert, zur Konservierung mit 0,05% Merthiolat versetzt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Sekundäre Antikörper

Als Sekundärantikörper nach der PAP-Methode wurde 1:100 in 1% BSA in TBS verdünntes Ratte anti-Maus IgG (H&L, Code-Nr.: 415005100, Dianova GmbH, Hamburg) eingesetzt.

Peroxidase anti-Peroxidase (PAP)-Komplex

Als PAP-Komplex diente eine 1:500 in 1% BSA in TBS verdünnte Maus-PAP (Code-Nr.: 223005025, Dianova Diagnostika GmbH, Hamburg).

Kontrollseren

Als Kontrollserum (Negativkontrolle) wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das Oberflächenantigen von Hühner-Bursa-Lymphozyten (HIRSCHBERGER 1987) verwendet.

9.5.1 Lösungen und Puffer**Tris-buffered saline (TBS, pH 7,6)**Stammlösung:

60,57 g Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (93352, Fluka Feinchemikalien, Neu Ulm)
610 ml Aqua dest.
390 ml HCl 1 N (109970, Merck, Darmstadt)

Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung
900 ml 0,8% NaCl (106400, Merck, Darmstadt) in Aqua dest.

Phosphate-buffered saline (PBS, pH 7,2, 300 mOsm)Stammlösung:

42 g NaCl krist. (106400, Merck, Darmstadt)
9,26 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ p.a. (106580, Merck, Darmstadt)
2,15 g K_2HPO_4 (60218, Fluka Feinchemikalien, Neu Ulm)
ad 100 ml Aqua bidest.

Gebrauchslösung:

Verdünnung der Stammlösung 1:5 in Aqua bidest.

Zitratpuffer (10 mM, pH 6,0 und pH 4,0)Stammlösung A (0,1 M Zitronensäure):

21,01 g Zitronensäure ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$) (1002471000, Merck, Darmstadt)
1000 ml Aqua dest.

Stammlösung B (0,1 M Natriumzitrat):

29,41 g Natriumzitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \times \text{H}_2\text{O}$) (71406, Fluka Feinchemikalien, Neu Ulm)
1000 ml Aqua dest.

Gebrauchslösung:

9 ml Stammlösung A
41 ml Stammlösung B
450 ml Aqua dest.
Mischen auf Magnetprüher

Imidazol/HCl-Puffer 0,1 M (pH 7,1)

6,81 g Imidazol (104716, Merck, Darmstadt)
 ad 1000 ml Aqua dest.
 500 ml 0,1 M HCl

Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-Lösung (DAB)

100 mg DAB purum p.a. (32750, Fluka Feinchemikalien, Neu Ulm)
 200 ml 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,1)
 auf Magnetrührer mischen, filtrieren und unmittelbar vor Gebrauch 70 µl H₂O₂ (30%) (107210, Merck, Darmstadt) zugeben

PAPANICOLAOUs Gebrauchslösung

PAPANICOLAOUs Lösung (109254, Merck, Darmstadt) und Aqua dest. im Verhältnis 1:20 mischen und filtrieren

Merthiolat Gebrauchslösung

10 g Ethylenmercuri-thiosalicylsäure Na-Salz (Merthiolat) (6389, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe)
 100 ml NaCl (0,8%) (106400, Merck, Darmstadt)
 Lagerung bei 4°C

9.6 Bewertungsschema der Expression von MAC 387, Ki-67 Antigen, CD3 und CD79a

Das quantitative Expressionsverhalten (Anzahl positiver Zellen) der immunhistologischen Marker (MAC 387, Ki-67 Antigen, CD3 und CD79a) wurde semiquantitativ (auf Grundlage der in Tabelle 3.5 (S. 37) angegebenen Werte) abgeschätzt und nach dem in Tabelle 9.5 aufgeführten Schema numerisch dargestellt.

Tab 9.5: Numerischer Wert als Äquivalenz zum quantitativen Expressionsverhalten

Wert	quantitatives Expressionsverhalten	Wert	quantitatives Expressionsverhalten
1	keine	4	mehrere
2	vereinzelt	5	zahlreiche
3	einzelne	6	massenhaft

9.7 Tabellen der statistischen Auswertung

Tab. 9.6: Deskriptive Statistik und Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test), der immunhistologischen Befunde der Mesenteriallymphknoten

Gruppe	statistische Maßzahlen	MAC 387 Kortex Makrophagen	MAC387 Kortex lym. Gew.	MAC 387 Medulla Makrophagen	Ki-67 Antigen Kortex Lympho.
Kontrolle n = 7	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	3,0 (3,0-3,0) 2,0-4,0	2,0 (2,0-2,0) 2,0-2,0	4,0 (3,0-4,0) 3,0-4,0	4,0 (3,5-4,25) 2,0-5,0
DON n = 10	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	3,0 (2,0-3,0) 2,0-4,0	2,0 (2,0-2,0) 2,0-2,0	3,5 (3,0-4,0) 3,0-4,0	4,0 (3,5-5,0) 3,0-5,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,6	p = 1,0	p = 0,81	p = 0,53
Gruppe	statistische Maßzahlen	Ki-67 Antigen Kortex lym. Gew.	Ki-67 Antigen Medulla Gefäßendoth.	Ki-67 Antigen Medulla Fibroblasten	Ki-67 Antigen Medulla Lympho.
Kontrolle n = 7	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	3,0 (2,5-3,0) 1,0-3,0	3,0 (2,0-3,0) 1,0-4,0	4,0 (3,0-4,0) 2,0-4,0	4,0 (3,0-4,0) 2,0-4,0
DON n = 10	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	3,0 (2,0-3,0) 1,0-3,0	3,0 (2,5-4,0) 1,0-4,0	4,0 (2,0-4,0) 2,0-5,0	4,0 (3,5-5,0) 2,0-5,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,86	p = 0,48	p = 0,67	p = 0,36
Gruppe	statistische Maßzahlen	CD3 Kortex	CD3 Medulla	CD79a Kortex	CD79a Medulla
Kontrolle n = 7	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	5,0 (4,0-5,0) 4,0-5,0	3,0 (2,0-3,0) 2,0-3,0	4,0 (4,0-4,0) 4,0-4,0	2,0 (2,0-3,0) 2,0-3,0
DON n = 10	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	4,0 (4,0-5,0) 4,0-5,0	2,0 (2,0-3,0) 2,0-3,0	4,0 (3,0-4,0) 3,5-4,0	2,0 (2,0-3,0) 2,0-3,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,33	p = 0,6	p = 0,53	p = 0,96

Legende zu Tab 9.6: Kortex: "Cortex like tissue", DON: Deoxynivalenol, Gefäßendoth.: Gefäßendothelien, Interpretation der quantitativen Maßzahlen s. Anhang Tabelle 9.5 (S. 103), lym. Gew.: lymphoretikuläres Gewebe, Lympho.: Lymphoblasten/-zyten, Medulla: "Medulla like tissue"

Tab. 9.7: Deskriptive Statistik und Signifikanzprüfung, mittels Mann-Whitney-Test (U-Test), der immunhistologischen Befunde der Mesenteriallymphknoten

Gruppe	statistische Maßzahlen	Caspase3-IRS Kortex Lympho.	Caspase9-IRS Kortex Lympho.	Caspase9-IRS Kortex lym. Gew.	Caspase9-IRS Medulla Fibroblasten
Kontrolle n = 7	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,5 (0,0-0,5) 0,0-0,5	1,15 (0,75-1,6) 0,7-1,6	1,15 (0,75-1,6) 0,7-1,6	1,15 (0,75-1,6) 0,7-1,6
DON n = 10	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,0 (0,0-0,5) 0,0-0,5	1,15 (0,74-1,6) 0,6-1,6	0,95 (0,74-1,6) 0,6-1,6	0,95 (0,74-1,6) 0,6-1,6
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,44	p = 0,96	p = 0,81	p = 0,81
Gruppe	statistische Maßzahlen	Caspase9-IRS Medulla Lympho.	p-p38-IRS Kortex Lympho.	p-p38-IRS Medulla Fibroblasten	p-p38-IRS Medulla Lympho.
Kontrolle n = 7	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	1,15 (0,75-1,6) 0,7-2,05	0,5 (0,5-0,6) 0,5-0,6	0,5 (0,5-0,6) 0,5-0,6	0,5 (0,0-0,6) 0,5-0,6
DON n = 10	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	1,13 (0,75-1,6) 0,7-1,6	0,5 (0,5-0,53) 0,5-0,6	0,5 (0,5-0,6) 0,5-0,6	0,5 (0,0-0,6) 0,5-0,6
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 1,0	p = 0,81	p = 0,96	p = 0,81
Gruppe	statistische Maßzahlen	TNF-α-IRS Kortex mono. Zellen	TNF-α-IRS Medulla mono. Zellen		
Kontrolle n = 7	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	3,0 (1,8-3,0) 1,0-3,4	2,2 (0,0-3,0) 0,0-3,0		
DON n = 10	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,6 (2,2-2,8) 1,0-3,0	2,2 (0,0-2,8) 0,0-3,0		
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,61	p = 0,54		

Legende zu Tab 9.7: Koertex: "Cortex like tissue", DON: Deoxynivalenol, IRS: Immunreaktiver Score (Interpretation der IRS-Werte siehe Tabelle 3.4, S. 36), lym. Gew.: lymphoretikuläres Gewebe, Lympho.: Lymphoblasten/-zyten, Medulla: "Medulla like tissue", mono. Zellen: mononukleäre Zellen, p-p38: phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase, TNF- α : Tumor-Nekrose-Faktor- α

Tab. 9.8: Deskriptive Statistik und Signifikanzprüfung, mittels Mann-Whitney-Test (U-Test), der immunhistologischen Befunde der Mediastinallymphknoten

Gruppe	statistische Maßzahlen	MAC 387 Follikel Makrophagen	MAC 387 Follikel lym. Gew.	MAC 387 Parakortex Makrophagen	MAC 387 Parakortex Lym. Gew.
Kontrolle n = 4	Median	1,0	1,0	3,0	2,0
	(1.-3. Quartil) Min.-Max.	(1,0-1,0) 1,0-1,0	(1,0-1,0) 1,0-1,0	(3,0-3,0) 3,0-3,0	(2,0-2,0) 2,0-2,0
DON n = 2	Median	1,0	1,0	3,0	2,0
	(1.-3. Quartil) Min.-Max.	(1,0-1,0) 1,0-1,0	(1,0-1,0) 1,0-1,0	(3,0-3,0) 3,0-3,0	(2,0-2,0) 2,0-2,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 1,0	p = 1,0	p = 1,0	p = 1,0
Gruppe	statistische Maßzahlen	MAC 387 Medulla Makrophagen	Ki-67 Antigen Follikel Lympho.	Ki-67 Antigen Follikel lym. Gew.	Ki-67 Antigen Parakortex Lympho.
Kontrolle n = 4	Median	4,0	4,0	3,0	4,0
	(1.-3. Quartil) Min.-Max.	(3,25-4,0) 3,0-4,0	(4,0-4,75) 4,0-5,0	(3,0-3,0) 3,0-3,0	(4,0-4,75) 4,0-5,0
DON n = 2	Median	3,5	4,0	2,0	4,0
	(1.-3. Quartil) Min.-Max.	(3,0-4,0) 3,0-4,0	(3,0-5,0) 3,0-5,0	(1,0-3,0) 1,0-3,0	(3,0-5,0) 3,0-5,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,8	p = 0,8	p = 0,53	p = 0,8
Gruppe	statistische Maßzahlen	Ki-67 Antigen Parakortex lym. Gew.	Ki-67 Antigen Medulla Gefäßendoth.	Ki-67 Antigen Medulla Fibroblasten	Ki-67 Antigen Medulla Lympho.
Kontrolle n = 4	Median	3,0	3,0	4,0	4,0
	(1.-3. Quartil) Min.-Max.	(3,0-3,0) 3,0-3,0	(3,0-3,75) 3,0-4,0	(3,25-4,75) 3,0-5,0	(4,0-4,75) 4,0-5,0
DON n = 2	Median	2,0	2,5	3,5	3,5
	(1.-3. Quartil) Min.-Max.	(1,0-3,0) 1,0-3,0	(1,0-4,9) 1,0-4,0	(2,0-5,0) 2,0-5,0	(2,0-5,0) 2,0-5,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,53	p = 0,8	p = 0,8	p = 0,8

Legende zu Tab 9.8: DON: Deoxynivalenol, Gefäßendoth.: Gefäßendothelien, Interpretation der quantitativen Maßzahlen s. Anhang Tabelle 9.5 (S. 103), lym. Gew.: lymphoretikuläres Gewebe, Lympho.: Lymphoblasten/-zyten, Medulla: "Medulla like tissue"

Tab. 9.9: Deskriptive Statistik und Signifikanzprüfung, mittels Mann-Whitney-Test (U-Test), der immunhistologischen Befunde der Mediastinallymphknoten

Gruppe	statistische Maßzahlen	CD3 Follikel	CD3 Parakortex	CD3 Medulla	CD79a Follikel
Kontrolle n = 4	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,0 (2,0-2,0) 2,0-2,0	4,0 (4,0-4,75) 4,0-5,0	2,5 (2,0-3,0) 2,0-3,0	5,0 (5,0-5,0) 5,0-5,0
DON n = 2	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,5 (2,0-3,0) 2,0-3,0	4,5 (4,0-5,0) 4,0-5,0	2,5 (2,0-3,0) 2,0-3,0	5,0 (5,0-5,0) 5,0-5,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,53	p = 0,8	p = 1,0	p = 1,0
Gruppe	statistische Maßzahlen	CD79b Parakortex	CD79a Medulla	Caspase3-IRS Follikel Lympho.	Caspase9-IRS Follikel Lympho.
Kontrolle n = 4	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	3,0 (3,0-3,0) 3,0-3,0	2,5 (2,0-3,0) 2,0-3,0	0,5 (0,13-0,5) 0,0-0,5	0,75 (0,68-1,39) 0,65-1,6
DON n = 2	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	3,0 (3,0-3,0) 3,0-3,0	2,0 (2,0-2,75) 2,0-3,0	0,25 (0,0-0,5) 0,0-0,5	1,15 (1,15-1,15) 1,15-1,15
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 1,0	p = 0,8	p = 0,8	p = 0,53
Gruppe	statistische Maßzahlen	Caspase9-IRS Follikel lym. Gew.	Caspase9-IRS Parakortex Lympho.	Caspase9-IRS Parakortex lym. Gew.	Caspase9-IRS Medulla Gefäßendoth.
Kontrolle n = 4	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,73 (0,66-1,39) 0,7-1,6	0,75 (0,68-1,39) 0,65-1,6	0,73 (0,66-1,39) 0,7-1,6	0,0
DON n = 2	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	1,15 (1,2-1,2) 1,15-1,15	1,15 (1,15-1,15) 1,15-1,15	1,15 (1,2-1,2) 1,15-1,15	0,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,53	p = 0,53	p = 0,53	-

Legende zu Tab 9.9: DON: Deoxynivalenol, Gefäßendoth.: Gefäßendothelien, Interpretation der quantitativen Maßzahlen s. Anhang Tabelle 9.5 (S. 103), IRS: Immunreaktiver Score (Interpretation der IRS-Werte siehe Tabelle 3.4, S. 36), KON-Gruppe: Kontroll-Gruppe, lym. Gew.: lymphoretikuläres Gewebe, Lympho.: Lymphoblasten/-zyten, Medulla: "Medulla like tissue"

Tab. 9.10: Deskriptive Statistik und Signifikanzprüfung, mittels Mann-Whitney-Test (U-Test), der immunhistologischen Befunde der Mediastinallymphknoten

Gruppe	statistische Maßzahlen	Caspase9-IRS Medulla Fibroblasten	Caspase9-IRS Medulla Lympho.	p-p38-IRS Follikel Lympho.	p-p38-IRS Parakortex Lympho.
Kontrolle n = 4	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,73 (0,7-1,39) 0,7-1,6	0,73 (0,7-1,39) 0,7-1,6	0,5 (0,5-0,58) 0,5-0,6	0,5 (0,5-0,58) 0,5-0,6
DON n = 2	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	1,15 (1,2-1,2) 1,15-1,15	1,15 (1,2-1,2) 1,15-1,15	0,55 (0,5-0,6) 0,5-0,6	0,55 (0,5-0,6) 0,5-0,6
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,53	p = 0,53	p = 0,8	p = 0,8
Gruppe	statistische Maßzahlen	p-p38-IRS Medulla Gefäßendoth.	p-p38-IRS Medulla Fibroblasten	p-p38-IRS Medulla Lympho.	TNFα-IRS Follikel mono. Zellen
Kontrolle n = 4	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,0	0,5 (0,5-0,58) 0,5-0,6	0,5 (0,5-0,58) 0,5-0,6	3,0 (3,0-3,4) 3,0-3,0
DON n = 2	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,0	0,55 (0,5-0,6) 0,5-0,6	0,55 (0,5-0,6) 0,5-0,6	3,20 (3,0-3,4) 3,0-3,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		-	p = 0,8	p = 0,8	p = 0,8
Gruppe	statistische Maßzahlen	TNF-α-IRS Parakortex mono. Zellen	TNF-α-IRS Medulla mono. Zellen		
Kontrolle n = 4	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	3,0 (3,0-3,4) 3,0-3,0	3,0 (3,0-3,0) 3,0-3,0		
DON n = 2	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	3,20 (3,0-3,4) 3,0-3,0	3,0 (3,0-3,0) 3,0-3,0		
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,8	p = 1,0		

Legende zu Tab 9.10: DON: Deoxynivalenol, Gefäßendoth.: Gefäßendothelien, IRS: Immunreaktiver Score (Interpretation der IRS-Werte siehe Tabelle 3.4, S. 36), Lympho.: Lymphoblasten/-zyten, Medulla.: "Medulla like tissue", mono. Zellen: mononukleäre Zellen, p-p38: phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase, TNF- α : Tumor-Nekrose-Faktor- α

Tab. 9.11: Deskriptive Statistik und Signifikanzprüfung, mittels Mann-Whitney-Test (U-Test), der immunhistologischen Befunde am Thymus

Gruppe	statistische Maßzahlen	CD3 Kortex	CD3 Medulla	CD79a Kortex	CD79a Medulla
Kontrolle n = 8	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	4,0 (4,0-4,0) 4,0-4,0	5,0 (5,0-5,75) 5,0-6,0	2,0 (2,0-2,0) 2,0-2,0	3,0 (3,0-3,75) 2,0-4,0
DON n = 9	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	4,0 (4,0-4,0) 3,0-4,0	5,0 (5,0-5,5) 5,0-6,0	2,0 (2,0-2,0) 2,0-2,0	3,0 (2,0-3,0) 2,0-4,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,74	p = 0,96	p = 1,0	p = 0,37
Gruppe	statistische Maßzahlen	MAC 387 Kortex	MAC 387 Medulla	Ki-67 Antigen Kortex	Ki-67 Antigen Medulla
Kontrolle n = 8	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	3,0 (3,0-4,0) 2,0-4,0	3,0 (3,0-3,0) 3,0-4,0	4,0 (4,0-4,0) 4,0-5,0	5,0 (5,0-6,0) 4,0-6,0
DON n = 9	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	3,5 (3,0-4,0) 3,0-4,0	3,0 (3,0-3,0) 3,0-4,0	4,0 (4,0-5,0) 4,0-6,0	5,0 (4,0-6,0) 4,0-6,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,57	p = 1,0	p = 0,74	p = 0,61
Gruppe	statistische Maßzahlen	Caspase9-IRS Kortex Lympho.	Caspase9-IRS Medulla Lympho.		
Kontrolle n = 8	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,75 (0,7-0,8) 0,71-0,75	0,75 (0,71-0,75) 0,7-0,8		
DON n = 9	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,75 (0,7-0,8) 0,7-0,8	0,75 (0,7-0,8) 0,6-0,8		
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,6	p = 0,67		

Legende zu Tab 9.11: DON: Deoxynivalenol, Interpretation der quantitativen Maßzahlen s. Anhang Tabelle 9.5 (S. 103), IRS: Immunreaktiver Score (Interpretation der IRS-Werte siehe Tabelle 3.4, S. 36), Lympho.: Lymphoblasten/-zyten

Tab. 9.12: Deskriptive Statistik und Signifikanzprüfung, mittels Mann-Whitney-Test (U-Test), der immunhistologischen Befunde der Milz

Gruppe	Statistische Maßzahlen	CD3 Rote Pulpa T-Zellen	CD3 Rote Pulpa Megak.	CD3 Weiße Pulpa per. Lymp.	CD79a Rote Pulpa B-Zellen
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	5,0 (5,0-5,0) 4,0-5,0	5,0 (5,0-5,0) 4,0-5,0	5,0 (4,0-5,0) 4,0-5,0	3,0 (3,0-4,0) 3,0-4,0
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	5,0 (4,5-5,0) 4,0-5,0	5,0 (4,0-5,0) 4,0-6,0	5,0 (4,0-5,0) 4,0-5,0	3,0 (3,0-4,0) 3,0-4,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,85	p = 0,63	p = 0,75	p = 0,29
Gruppe	Statistische Maßzahlen	CD79a Weiße Pulpa per. Lymp.	MAC 387 T. serosa	MAC 387 T. subserosa	MAC 387 Rote Pulpa Makrophagen
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	3,0 (2,0-3,0) 2,0-3,0	2,0 (1,0-2,0) 1,0-3,0	1,0 (1,0-1,0) 1,0-2,0	3,0 (3,0-4,0) 3,0-4,0
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,0 (2,0-3,0) 2,0-5,0	1,0 (1,0-2,0) 1,0-3,0	1,0 (1,0-1,0) 1,0-3,0	3,0 (3,0-4,0) 3,0-4,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,53	p = 0,59	p = 0,70	p = 0,29
Gruppe	Statistische Maßzahlen	MAC 387 Rote Pulpa lym. Gew.	MAC 387 Weiße Pulpa per. Lymp.	Ki-67 Antigen T. serosa Serosadeck.	Ki-67 Antigen T. subserosa Fibroblasten
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,0 (2,0-3,0) 1,0-3,0	1,0 (1,0-1,0) 1,0	2,0 (2,0-3,0) 1,0-4,0	2,0 (2,0-3,0) 1,0-4,0
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	3,0 (2,0-3,0) 2,0-3,0	1,0 (1,0-1,0) 1,0-1,0	3,0 (2,0-3,0) 2,0-4,0	2,0 (2,0-2,0) 1,0-3,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,66	p = 1,0-1,0	p = 0,63	p = 0,48

Legende zu Tab 9.12: DON: Deoxynivalenol, Interpretation der quantitativen Maßzahlen s. Anhang Tabelle 9.5 (S. 103), lym. Gew.: lymphoretikuläres Gewebe, per. Lymp.: perifollikuläre Lymphozytenscheiden, Megak.: Megakaryoblasten/-zyten, Serosadeck.: Serosadeckzellen, T.: Tunica/Tela

Tab. 9.13: Deskriptive Statistik und Signifikanzprüfung, mittels Mann-Whitney-Test (U-Test), der immunhistologischen Befunde der Milz

Gruppe	Statistische Maßzahlen	Ki-67 Antigen Trabekel Fibroblasten	Ki-67 Antigen Rote Pulpa Lympho.	Ki-67 Antigen Rote Pulpa Myelo.	Ki-67 Antigen Rote Pulpa Erythro.
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	3,0 (2,0-3,0) 2,0-4,0	5,0 (4,0-5,0) 4,0-6,0	4,0 (3,0-4,0) 3,0-4,0	3,0 (2,0-3,0) 2,0-4,0
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	3,0 (2,0-3,0) 2,0-4,0	5,0 (4,0-5,0) 3,0-5,0	4,0 (4,0-4,0) 3,0-4,0	2,0 (2,0-3,0) 1,0-3,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,99	p = 0,96	p = 0,36	p = 0,5
Gruppe	Statistische Maßzahlen	Ki-67 Antigen Rote Pulpa Megakaryo.	Ki-67 Antigen Rote Pulpa lym. Gew	Ki-67 Antigen Weiße Pulpa per. Lymph.	Ki-67 Antigen Weiße Pulpa Gefäßendoth.
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	5,0 (4,0-5,0) 4,0-5,0	4,0 (4,0-4,0) 4,0-4,0	3,0 (3,0-4,0) 2,0-5,0	2,0 (2,0-3,0) 2,0-3,0
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	5,0 (4,0-5,0) 3,0-4,0	4,0 (4,0-4,0) 3,0-4,0	3,0 (3,0-4,0) 1,0-4,0	2,0 (2,0-2,0) 1,0-4,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,93	p = 0,33	p = 0,63	p = 0,33
Gruppe	Statistische Maßzahlen	Caspase3-IRS Rote Pulpa Lympho.	Caspase3-IRS Rote Pulpa Megakaryo.	Caspase3-IRS Rote Pulpa lym. Gew.	Caspase3-IRS Weiße Pulpa per. Lym.
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,75 (0,7-0,8) 0,6-2,2	0,25 (0,25-0,75) 0,1-0,75	0,75 (0,7-0,8) 0,6-2,6	0,0 (0,0-0,7) 0,0-1,0
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,75 (0,7-0,83) 0,6-2,2	0,25 (0,25-0,75) 0,1-0,8	0,75 (0,73-0,78) 0,6-2,6	0,0 (0,0-0,7) 0,0-1,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,63	p = 1,0	p = 0,61	p = 0,92

Legende zu Tab 9.13: DON: Deoxynivalenol, Erythro.: Erythroblasten/-zyten, Interpretation der quantitativen Maßzahlen s. Anhang Tabelle 9.5 (S. 103), Gefäßendoth.: Gefäßendothelien, IRS: Immunreaktiver Score (Interpretation der IRS-Werte siehe Tabelle 3.4, S. 36), lym. Gew.: lymphoretikuläres Gewebe, Lympho.: Lymphoblasten/-zyten, Megakaryo.: Megakaryoblasten/-zyten, Myelo.: Myeloblasten/-zyten, per. Lymph.: perifollikuläre Lymphozytenscheiden

Tab. 9.14: Deskriptive Statistik und Signifikanzprüfung, mittels Mann-Whitney-Test (U-Test), der immunhistologischen Befunde der Milz

Gruppe	Statistische Maßzahlen	Caspase9-IRS Rote Pulpa Lympho.	Caspase9-IRS Rote Pulpa Megakaryo.	Caspase9-IRS Weiße Pulpa per. Lym.	Caspase9-IRS Rote Pulpa lym. Gew.
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,75 (0,7-1,6) 0,6-2,1	0,6 (0,6-0,65) 0,6-0,8	0,0 (0,0-0,65) 0,0-0,8	0,7 (0,6-0,75) 0,6-0,8
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,75 (0,75-0,85) 0,6-2,1	0,6 (0,6-0,65) 0,6-0,8	0,0 (0,0-0,58) 0,0-0,8	0,7 (0,65-0,75) 0,6-0,8
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,9	p = 0,45	p = 0,36	p = 0,78
Gruppe	Statistische Maßzahlen	p-p38-IRS T. serosa Serosadeck.	p-p38-IRS Rote Pulpa Lympho.	p-p38-IRS Rote Pulpa Megakaryo.	
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,0 (0,0-0,0) 0,0-0,8	0,5 (0,0-0,75) 0,0-0,8	0,6 (0,5-0,75) 0,0-2,2	
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,0 (0,0-0,25) 0,0-0,8	0,5 (0,0-0,75) 0,0-0,8	0,75 (0,75-0,85) 0,6-2,1	
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,85	p = 0,78	p = 1,0	

Legende zu Tab 9.14: DON: Deoxynivalenol, IRS: Immunreaktiver Score (Interpretation der IRS-Werte siehe Tabelle 3.4, S. 36), lym. Gew.: lymphoretikuläres Gewebe, Lympho.: Lymphoblasten/-zyten, Megakaryo.: Megakaryoblasten/-zyten, per. Lymph.: perifollikuläre Lymphozytenscheiden, p-p38: phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase, Serosadeck.: Serosadeckzellen, T.: Tunica

Tab. 9.15: Deskriptive Statistik und Signifikanzprüfung, mittels Mann-Whitney-Test (U-Test), der immunhistologischen Befunde der Leber

Gruppe	statistische Maßzahlen	MAC 387 T. serosa Makrophagen	MAC 387 hämatopoetisch aktive Zellen Mono.	MAC 387 hämatopoetisch aktive Zellen Myelo.	MAC 387 periportales Bindegewebe
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	4,0 (3,0-4,0) 2,0-6,0	3,0 (3,0-4,0) 2,0-5,0	3,0 (2,0-3,0) 1,0-4,0	4,0 (4,0-4,0) 3,0-5,0
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	4,0 (4,0-4,75) 3,0-5,0	4,0 (3,0-4,0) 3,0-4,0	3,0 (2,0-3,0) 1,0-5,0	4,0 (3,0-4,0) 3,0-4,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,15	p = 0,28	p = 0,20	p = 0,37
Gruppe	statistische Maßzahlen	MAC 387 Endothel Zentralvenen	Ki-67 Antigen T. serosa Serosadeck.	Ki-67 Antigen Hepatozyten	Ki-67 Antigen Megakaryo.
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,0 (2,0-2,0) 2,0-2,0	2,5 (2,0-3,0) 2,0-4,0	6,0 (6,0-6,0) 6,0-6,0	6,0 (6,0-6,0) 5,0-6,0
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,0 (2,0-2,0) 2,0-2,0	2,0 (2,0-2,5) 1,0-4	6,0 (6,0-6,0) 6,0-6,0	6,0 (5,0-6,0) 5,0-6,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,77	p = 0,18	p = 1,0	p = 0,45
Gruppe	statistische Maßzahlen	Ki-67 Antigen Lympho.	Ki-67 Antigen Erythro.	Ki-67 Antigen Myelo.	Ki-67 Antigen periportales Bindegewebe
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	5,0 (4,0-5,0) 4,0-5,0	3,0 (3,0-3,0) 3,0-3,0	6,0 (6,0-6,0) 6,0-6,0	3,0 (2,0-4,0) 2,0-4,0
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	5,0 (5,0-5,0) 4,0-5,0	3,0 (3,0-3,0) 3,0-3,0	6,0 (6,0-6,0) 6,0-6,0	3,0 (2,0-3,0) 2,0-4,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,55	p = 1,0	p = 1,0	p = 0,65

Legende zu Tab 9.15: DON: Deoxynivalenol, Erythro.: Erythroblasten/-zyten, Interpretation der quantitativen Maßzahlen s. Anhang Tabelle 9.5 (S. 103), Lympho.: Lymphoblasten/-zyten, Megakaryo.: Megakaryoblasten/-zyten, Mono.: Monoblasten/-zyten, Myelo.: Myeloblasten/-zyten, Serosadeck.: Serosadeckzellen, T.: Tunica

Tab. 9.16: Deskriptive Statistik und Signifikanzprüfung, mittels Mann-Whitney-Test (U-Test), der immunhistologischen Befunde der Leber

Gruppe	statistische Maßzahlen	Ki-67 Antigen Gallengangsepithelzellen	Ki-67 Antigen Endothel Zentralvenen	Caspase3-IRS T. serosa Serosadeck.	Caspase3-IRS Hepatozyten
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	6,0 (6,0-6,0) 5,0-6,0	4,0 (4,0-4,0) 4,0-4,0	0,0 (0,0-0,0) 0,0-1,0	0,55 (0,55-0,6) 0,55-1,1
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	6,0 (5,0-6,0) 4,0-6,0	4,0 (4,0-4,0) 4,0-4,0	0,0 (0,0-0,6) 0,0-1,0	0,6 (0,55-0,83) 0,5-1,05
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,19	p = 1,0	p = 0,47	p = 0,23
Gruppe	statistische Maßzahlen	Caspase3-IRS Megakaryo.	Caspase3-IRS Lympho.	Caspase3-IRS periportales Bindegewebe Lympho.	Caspase3-IRS Gallengangsepithelzellen
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,49 (0,8-3,8) 1,0-5,0	0,6 (0,0-0,6) 0,0-0,8	0,0 (0,0-0,0) 0,0-3,0	0,0 (0,0-0,0) 0,0-1,0
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,95 (1,83-3,80) 1,0-4,0	0,5 (0,0-0,6) 0,0-0,8	0,0 (0,0-0,0) 0,0-3,0	0,0 (0,0-0,0) 0,0-1,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,90	p = 0,36	p = 0,83	p = 0,7
Gruppe	statistische Maßzahlen	Caspase9-IRS T. serosa Serosadeck.	Caspase9-IRS Hepatozyten	Caspase9-IRS Megakaryo.	Caspase9-IRS Lympho.
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,0 (0,0-0,75) 0,0-0,75	4,8 (3,4-4,8) 2,5-4,8	0,7 (0,65-0,75) 0,6-0,8	5,2 (3,85-5,2) 2,5-5,2
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,7 (0,0-0,75) 0,0-0,75	4,8 (3,9-4,8) 1,7-5,7	0,7 (0,63-0,78) 0,0-1,7	5,2 (4,3-5,2) 2,5-5,7
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,36	p = 0,63	p = 0,47	p = 0,73

Legende zu Tab 9.16: DON: Deoxynivalenol, Interpretation der quantitativen Maßzahlen s. Anhang Tabelle 9.5 (S. 103), IRS: Immunreaktiver Score (Interpretation der IRS-Werte siehe Tabelle 3.4, S. 36), Lympho.: Lymphoblasten/-zyten, Megakaryo.: Megakaryoblasten/-zyten, Serosadeck.: Serosadeckzellen, T.: Tunica

Tab. 9.17: Deskriptive Statistik und Signifikanzprüfung, mittels Mann-Whitney-Test (U-Test), der immunhistologischen Befunde der Leber

Gruppe	statistische Maßzahlen	Caspase9-IRS Erythro.	Caspase9-IRS periportales Bindegewebe Lympho.	Caspase9-IRS Gallengangs-epithelzellen	p-p38-IRS T. serosa
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,05 (2,05-2,05) 0,75-2,50	3,45 (2,95-3,45) 0,0-6,15	0,6 (0,0-0,75) 0,0-0,8	3,0 (2,04-3,13) 0,0-4,8
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,05 (1,83-2,05) 0,75-2,50	3,05 (2,28-3,45) 0,75-4,40	0,6 (0,0-0,75) 0,0-1,2	3,0 (1,48-3,2) 0,0-4,4
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,96	p = 0,63	p = 0,85	p = 0,78
Gruppe	statistische Maßzahlen	p-p38-IRS Hepatozyten	p-p38-IRS Megakaryo.	p-p38-IRS Lympho.	p-p38-IRS Erythro.
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,5 (1,86-3,19) 0,8-4,8	2,78 (2,5-4,83) 2,0-6,0	1,6 (1,6-2,05) 0,8-3,45	5,25 (3,78-5,9) 2,1-6,6
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,5 (2,05-3,0) 0,8-6,1	3,4 (2,25-5,05) 1,0-7,0	2,05 (1,6-2,05) 1,6-3,5	5,7 (4,8-5,7) 2,1-5,7
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,97	p = 0,63	p = 0,03*	p = 0,73
Gruppe	statistische Maßzahlen	p-p38-IRS periportales Bindegewebe Lympho.	p-p38-IRS Gallengangs-epithelzellen		
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	3,54 (2,5-3,45) 2,45-3,45	3,0 (3,0-4,1) 1,8-6,5		
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	3,45 (3,2-3,45) 1,6-4,35	3,0 (3,0-4,35) 1,0-5,6		
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,46	p = 0,81		

Legende zu Tab 9.17: *: statistisch signifikant, DON: Deoxynivalenol, Erythro.: Erythroblasten/-zyten, IRS: Immunreaktiver Score (Interpretation der IRS-Werte siehe Tabelle 3.4, S. 36), Lympho.: Lymphoblasten/-zyten, Megakaryo.: Megakaryoblasten/-zyten, p-p38: phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase, T.: Tunica

Tab. 9.18: Deskriptive Statistik und Signifikanzprüfung, mittels Mann-Whitney-Test (U-Test), der immunhistologischen Befunde des Knochenmarks

Gruppe	statistische Maßzahlen	MAC 387	Ki-67 Antigen Lympho.	Ki-67 Antigen Myelo.	Ki-67 Antigen Erythro.
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	5,0 (4,0-5,0) 4,0-6,0	5,0 (4,0-5,0) 4,0-5,0	3,0 (3,0-4,0) 3,0-4,0	2,0 (2,0-2,0) 2,0-4,0
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	5,0 (4,5-5,0) 4,0-6,0	5,0 (4,0-5,0) 4,0-5,0	4,0 (3,0-4,0) 3,0-5,0	2,0 (2,0-2,5) 2,0-3,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,7	p = 0,96	p = 0,43	p = 0,81
Gruppe	statistische Maßzahlen	Ki-67 Antigen Megakaryo.	CD3	CD79a	Caspase3-IRS Lympho.
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,0 (2,0-2,0) 2,0-3,0	5,0 (4,0-5,0) 4,0-5,0	5,0 (5,0-5,0) 4,0-5,0	0,7 (0,65-0,75) 0,65-0,85
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,0 (2,0-2,0) 2,0-2,0	5,0 (4,0-5,0) 4,0-5,0	5,0 (5,0-5,0) 4,0-5,0	0,7 (0,7-0,75) 0,65-0,8
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,72	p = 0,63	p = 0,53	p = 0,78
Gruppe	statistische Maßzahlen	Caspase3-IRS Myelo.	Caspase3-IRS Erythro.	Caspase3-IRS Megakaryo.	Caspase9-IRS Lympho.
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,7 (0,65-0,75) 0,65-0,75	0,0	3,4 (3,0-3,8) 0,8-4,2	0,75 (0,7-0,8) 0,7-0,9
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,7 (0,68-0,75) 0,0-0,75	0,0	3,4 (2,6-3,8) 0,8-3,8	0,75 (0,7-0,85) 0,7-0,9
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,92	-	p = 0,63	p = 0,9

Legende zu Tab 9.18: DON: Deoxynivalenol, Erythro.: Erythroblasten/-zyten, Interpretation der quantitativen Maßzahlen s. Anhang Tabelle 9.5 (S. 103), IRS: Immunreaktiver Score (Interpretation der IRS-Werte siehe Tabelle 3.4, S. 36), Lympho.: Lymphoblasten/-zyten, Megakaryo.: Megakaryoblasten/-zyten, Myelo.: Myeloblasten/-zyten

Tab. 9.19: Deskriptive Statistik und Signifikanzprüfung, mittels Mann-Whitney-Test (U-Test), der immunhistologischen Befunde des Knochenmarks

Gruppe	statistische Maßzahlen	Caspase9-IRS Myelo.	Caspase9-IRS Erythro.	Caspase9-IRS Megakaryo.	p-p38-IRS Lympho.
Kontrolle n = 15	Median	0,75	0,0	0,7	0,75
	(1.-3. Quartil)	(0,7-0,75)		(0,0-0,75)	(0,7-0,85)
DON n = 21	Median	0,75	0,0	0,65	0,75
	(1.-3. Quartil)	(0,7-0,75)		(0,0-0,75)	(0,75-0,8)
Min.-Max.		0,0-0,8		0,0-0,8	0,7-2,2
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,85	-	p = 0,53	p = 0,95
Gruppe	statistische Maßzahlen	p-p38-IRS Myelo.	p-p38-IRS Erythro.	p-p38-IRS Megakaryo.	TNF-α-IRS mono. Zellen
Kontrolle n = 15	Median	0,75	0,75	2,2	0,65
	(1.-3. Quartil)	(0,7-0,75)	(0,0-0,75)	(0,8-2,6)	(0,0-0,75)
DON n = 21	Median	0,7	0,7	0,9	0,75
	(1.-3. Quartil)	(0,7-0,75)	(0,35-0,75)	(0,8-2,6)	(0,0-0,8)
Min.-Max.		0,0-0,8	0,0-0,8	0,7-3,4	0,0-1,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,61	p = 0,34	p = 0,87	p = 0,56

Legende zu Tab 9.19: DON: Deoxynivalenol, Erythro.: Erythroblasten/-zyten, IRS: Immunreaktiver Score (Interpretation der IRS-Werte siehe Tabelle 3.4, S. 36), Lympho.: Lymphoblasten/-zyten, Megakaryo.: Megakaryoblasten/-zyten, Myelo.: Myeloblasten/-zyten, mono. Zellen: mononukleäre Zellen, p-p38: phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase, TNF- α : Tumor-Nekrose-Faktor- α

Tab. 9.20: Deskriptive Statistik und Signifikanzprüfung, mittels Mann-Whitney-Test (U-Test), der immunhistologischen Befunde des Duodenums

Gruppe	statistische Maßzahlen	MAC 387 L. propria m.	MAC 387 T. submucosa	Ki-67 Antigen E. m. Zottens. Enterozyten	Ki-67 Antigen E. m. Krypt. Enterozyten
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,0 (2,0-2,0) 2,0-2,0	2,0 (2,0-2,0) 2,0-4,0	4,0 (4,0-5,0) 3,0-5,0	4,0 (4,0-5,0) 4,0-6,0
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,0 (2,0-2,0) 2,0-2,0	2,0 (2,0-2,0) 2,0-4,0	4,0 (3,0-4,5) 3,-5,0	4,0 (4,0-5,0) 3,0-5,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 1,0	p = 0,85	p = 0,68	p = 0,43
Gruppe	statistische Maßzahlen	Ki-67 Antigen L. propria m. Fibroblasten	Ki-67 Antigen T. submucosa Fibroblasten	Ki-67 Antigen S. intermusc. Ganglienzellen	Ki-67 Antigen T. subserosa Fibroblasten
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,0 (2,0-2,0) 2,0-2,0	3,0 (2,0-3,0) 2,0-3,0	3,0 (3,0-4,0) 2,0-4,0	3,0 (2,0-3,0) 2,0-4,0
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,0 (2,0-2,0) 2,0-2,0	3,0 (2,5-3,0) 2,0-4,0	3,0 (3,0-4,0) 2,0-4,0	3,0 (2,0-3,0) 2,0-3,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 1,0	p = 0,43	p = 0,92	p = 0,83
Gruppe	statistische Maßzahlen	Caspase3-IRS E. m. Zottens. Enterozyten	Caspase3-IRS E. m. Krypt. Enterozyten	Caspase3-IRS L. propria m. Lymphozyten	Caspase3-IRS T. submucosa Lymphozyten
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,95 (1,75-3,9) 0,8-5,2	0,75 (0,65-1,55) 0,6-2,1	0,6 (0,5-0,75) 0,0-1,2	0,75 (0,6-1,2) 0,5-1,7
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,58 (2,05-4,78) 0,9-5,2	1,2 (0,75-1,6) 0,7-2,1	0,58 (0,5-0,75) 0,0-0,8	0,75 (0,75-1,19) 0,5-1,7
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,71	p = 0,11	p = 0,74	p = 0,61

Legende zu Tab 9.20: DON: Deoxynivalenol, Drü.: Drüsen, E. m.: Epithelium mucosae, Interpretation der quantitativen Maßzahlen s. Anhang Tabelle 9.5 (S. 103), IRS: Immunreaktiver Score (Interpretation der IRS-Werte siehe Tabelle 3.4, S. 36), Krypt: Kryptenbereich, L. propria m.: Lamina propria mucosae, S. intermusc.: Stratum intermusculare, T.: Tela/Tunica, Zottens.: Zottenspitzen

Tab. 9.21: Deskriptive Statistik und Signifikanzprüfung, mittels Mann-Whitney-Test (U-Test), der immunhistologischen Befunde des Duodenums

Gruppe	statistische Maßzahlen	Caspase3-IRS S. intermusc. Ganglienzellen	Caspase3-IRS T. subserosa Lymphozyten	Caspase3-IRS Brunner Drü. Epithelzellen	Caspase9-IRS E. m. Zottens. Enterozyten
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,45 (1,25-3,4) 0,0-4,4	0,7 (0,6-0,9) 0,5-2,6	0,65 (0,55-0,75) 0,0-1,65	0,65 (0,55-0,75) 0,5-1,6
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,73 (2,05-3,44) 0,0-4,4	0,6 (0,6-0,74) 0,6-1,7	0,75 (0,6-0,93) 0,0-1,7	0,65 (0,65-1,15) 0,5-1,6
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,73	p = 0,77	p = 0,49	p = 0,37
Gruppe	statistische Maßzahlen	Caspase9-IRS E. m. Krypt. Enterozyten	Caspase9-IRS L. propria m. Lymphozyten	Caspase9-IRS T. submucosa Lymphozyten	Caspase9-IRS S. intermusc. Ganglienzellen
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,65 (0,55-0,75) 0,0-1,2	0,6 (0,55-0,65) 0,0-1,1	0,65 (0,6-1,05) 0,6-1,6	1,15 (0,65-1,6) 0,5-2,5
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,65 (0,6-0,75) 0,5-1,6	0,6 (0,55-0,65) 0,0-1,1	0,65 (0,6-1,15) 0,5-2,1	1,15 (0,65-2,0) 0,6-2,95
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,6	p = 0,84	p = 0,78	p = 0,92
Gruppe	statistische Maßzahlen	Caspase9-IRS T. subserosa Lymphozyten	Caspase9-IRS Brunner Drü. Epithelzellen	p-p38-IRS E. m. Zottens. Enterozyten	p-p38-IRS E. m. Krypt. Enterozyten
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,6 (0,0-0,75) 0,0-1,6	0,6 (0,6-0,7) 0,0-1,2	1,4 (0,6-2,05) 0,5-2,5	1,13 (0,68-1,75) 0,5-2,05
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,58 (0,0-0,73) 0,0-1,2	0,65 (0,55-0,7) 0,0-1,2	1,17 (0,6-2,05) 0,5-2,1	0,75 (0,6-1,6) 0,5-2,05
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,42	p = 0,7	p = 0,96	p = 0,31

Legende zu Tab 9.21: DON: Deoxynivalenol, Drü.: Drüsen, E. m.: Epithelium mucosae, IRS: Immunreaktiver Score (Interpretation der IRS-Werte siehe Tabelle 3.4, S. 36), Krypt: Kryptenbereich, L. propria m.: Lamina propria mucosae, p-p38: phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase S. intermusc.: Stratum intermusculare, T.: Tela/Tunica, Zottens.: Zottenspitzen

Tab. 9.22: Deskriptive Statistik und Signifikanzprüfung, mittels Mann-Whitney-Test (U-Test), der immunhistologischen Befunde des Duodenums

Gruppe	statistische Maßzahlen	p-p38-IRS L. propria m. Lymphozyten	p-p38-IRS T. submucosa Lymphozyten	p-p38-IRS S. intermusc. Ganglienzellen	p-p38-IRS T. subserosa Lymphozyten
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,6 (0,55-1,6) 0,0-0,7	0,65 (0,55-0,65) 0,5-1,6	0,6 (0,55-0,66) 0,5-0,7	0,6 (0,6-1,15) 0,6-1,6
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,6 (0,55-0,6) 0,0-0,7	0,6 (0,6-1,15) 0,0-1,6	0,6 (0,5-0,6) 0,0-1,6	0,6 (0,6-0,67) 0,0-1,6
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,99	p = 0,8	p = 0,14	p = 0,38
Gruppe	statistische Maßzahlen	p-p38-IRS Brunner. Drü. Epithelzellen			
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	1,6 (0,6-2,05) 0,5-2,05			
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	1,38 (0,6-2,05) 0,5-2,05			
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,99			

Legende zu Tab 9.22: DON: Deoxynivalenol, Drü.: Drüsen, IRS: Immunreaktiver Score (Interpretation der IRS-Werte siehe Tabelle 3.4, S.36), L. propria m.: Lamina propria mucosae, p-p38: phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase, S. intermusc.: Stratum intermusculare, T.: Tela/Tunica

Tab. 9.23: Deskriptive Statistik und Signifikanzprüfung, mittels Mann-Whitney-Test (U-Test), der immunhistologischen Befunde des Jejunums

Gruppe	statistische Maßzahlen	MAC 387 L. propria m.	MAC 387 T. submucosa	Ki-67 Antigen E. m. Zottens. Enterozyten	Ki-67 Antigen E. m. Krypt. Enterozyten
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,0 (2,0-2,0) 2,0-2,0	2,0 (2,0-2,0) 2,0-2,0	4,0 (3,0-4,0) 3,0-5,0	4,0 (4,0-4,0) 3,0-5,0
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,0 (2,0-2,0) 1,0-2,0	2,0 (2,0-2,0) 1,0-2,0	4,0 (3,0-4,0) 2,0-5,0	4,0 (4,0-4,0) 3,0-5,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,81	p = 0,81	p = 0,47	p = 0,76
Gruppe	statistische Maßzahlen	Ki-67 Antigen L. propria m. Fibroblasten	Ki-67 Antigen T. submucosa Fibroblasten	Ki-67 Antigen S. intermusc. Ganglienzellen	Ki-67 Antigen T. subserosa Fibroblasten
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,0 (2,0-2,0) 2,0-2,0	2,0 (2,0-3,0) 1,0-3,0	3,0 (2,0-3,0) 2,0-4,0	2,0 (2,0-3,0) 1,0-3,0
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,0 (2,0-2,0) 2,0-2,0	2,0 (2,0-2,0) 2,0-3,0	3,0 (2,0-3,0) 2,0-4,0	2,0 (2,0-3,0) 1,0-3,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 1,0	p = 0,73	p = 0,92	p = 0,92
Gruppe	statistische Maßzahlen	Caspase3-IRS E. m. Zottens. Enterozyten	Caspase3-IRS E. m. Krypt. Enterozyten	Caspase3-IRS L. propria m. Lymphozyten	Caspase3-IRS T. submucosa Lymphozyten
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,86 (1,8-3,9) 0,8-5,3	1,15 (0,75-1,20) 0,7-2,1	0,6 (0,0-0,6) 0,0-1,0	0,7 (0,5-1,2) 0,5-1,9
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	3,23 (1,66-4,39) 1,0-5,2	1,25 (0,85-1,94) 0,0-2,2	0,5 (0,0-0,59) 0,0-1,0	0,6 (0,51-0,75) 0,5-1,7
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,71	p = 0,11	p = 0,12	p = 0,68

Legende zu Tab 9.23: DON: Deoxynivalenol, E. m.: Epithelium mucosae, Interpretation der quantitativen Maßzahlen s. Anhang Tabelle 9.5 (S. 103), IRS: Immunreaktiver Score (Interpretation der IRS-Werte siehe Tabelle 3.4, S. 36), Krypt: Kryptenbereich, L. propria m.: Lamina propria mucosae, S. intermusc.: Stratum intermusculare, T.: Tela/Tunica, Zottens.: Zottenspitzen

Tab. 9.24: Deskriptive Statistik und Signifikanzprüfung, mittels Mann-Whitney-Test (U-Test), der immunhistologischen Befunde des Jejunums

Gruppe	statistische Maßzahlen	Caspase3-IRS S. intermusc. Ganglienzellen	Caspase3-IRS T. subserosa Lymphozyten	Caspase9-IRS E. m. Zottens. Enterozyten	Caspase9-IRS E. m. Krypt. Enterozyten
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,05 (1,2-3,0) 0,6-4,4	0,5 (0,0-0,75) 0,0-1,02	0,65 (0,64-0,89) 0,6-1,7	0,65 (0,59-0,75) 0,5-1,7
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,05 (1,38-3,45) 0,5-4,8	0,5 (0,0-0,75) 0,0-1,0	1,1 (0,6-1,6) 0,5-1,8	0,75 (0,65-1,55) 0,5-1,7
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,71	p = 0,48	p = 0,42	p = 0,3
Gruppe	statistische Maßzahlen	Caspase9-IRS L. propria m. Lymphozyten	Caspase9-IRS T. submucosa Lymphozyten	Caspase9-IRS S. intermusc. Ganglienzellen	Caspase9-IRS T. subserosa Lymphozyten
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,6 (0,54-0,6) 0,0-0,7	0,63 (0,59-1,05) 0,55-1,15	0,9 (0,68-1,15) 0,55-3,4	0,25 (0,0-0,6) 0,0-1,0
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,6 (0,55-0,65) 0,0-0,7	0,65 (0,55-1,15) 0,55-1,6	1,15 (0,75-1,65) 0,55-3,45	0,55 (0,0-0,65) 0,0-0,65
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,65	p = 0,55	p = 0,19	p = 0,65
Gruppe	statistische Maßzahlen	p-p38-IRS E. m. Zottens. Enterozyten	p-p38-IRS E. m. Krypt. Enterozyten	p-p38-IRS L. propria m. Lymphozyten	p-p38-IRS T. submucosa Lymphozyten
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	1,6 (0,75-2,95) 0,0-3,0	0,75 (0,5-1,55) 0,0-2,1	0,6 (0,41-0,6) 0,0-0,7	0,6 (0,55-0,63) 0,0-0,7
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	1,35 (0,65-2,0) 0,0-5,0	0,6 (0,6-1,1) 0,0-1,7	0,6 (0,55-0,6) 0,0-0,7	0,6 (0,55-0,6) 0,5-0,7
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,41	p = 0,86	p = 0,99	p = 0,61

Legende zu Tab 9.24: DON: Deoxynivalenol, E. m.: Epithelium mucosae, IRS: Immunreaktiver Score (Interpretation der IRS-Werte siehe Tabelle 3.4, S. 36), Krypt: Kryptenbereich, L. propria m.: Lamina propria mucosae, p-p38: phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase, S. intermusc.: Stratum intermusculare, T.: Tela/Tunica, Zottens.: Zottenspitzen

Tab. 9.25: Deskriptive Statistik und Signifikanzprüfung, mittels Mann-Whitney-Test (U-Test), der immunhistologischen Befunde des Jejunums

Gruppe	statistische Maßzahlen	p-p38-IRS S. intermusc. Ganglienzellen	p-p38-IRS T. subserosa Lymphozyten
Kontrolle n = 15	Median	0,6	0,6
	(1.-3. Quartil)	(0,58-0,6)	(0,6-0,6)
	Min.-Max.	0,5-0,7	0,5-0,7
DON n = 21	Median	0,6	0,6
	(1.-3. Quartil)	(0,54-0,6)	(0,59-0,6)
	Min.-Max.	0,0-0,7	0,0-0,7
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,18	p = 0,69

Legende zu Tab. 9.25: DON: Deoxynivalenol, IRS: Immunreaktiver Score (Interpretation der IRS-Werte siehe Tabelle 3.4, S. 36), p-p38: phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase, S. intermusc.: Stratum intermusculare, T.: Tela

Tab. 9.26: Deskriptive Statistik und Signifikanzprüfung, mittels Mann-Whitney-Test (U-Test), der immunhistologischen Befunde des Ileums

Gruppe	statistische Maßzahlen	MAC 387 L. propria m.	MAC 387 T. submucosa	Ki-67 Antigen E. m. Zottens. Enterozyten	Ki-67 Antigen E. m. Krypt. Enterozyten
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,0 (2,0-2,0) 2,0-2,0	2,0 (2,0-2,0) 1,0-3,0	4,0 (3,0-5,0) 2,0-5,0	4,0 (4,0-5,0) 3,0-5,0
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,0 (2,0-2,0) 1,0-2,0	2,0 (2,0-2,0) 1,0-2,0	4,0 (3,0-4,0) 2,0-5,0	4,0 (4,0-5,0) 3,0-5,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,63	p = 0,83	p = 0,44	p = 0,59
Gruppe	statistische Maßzahlen	Ki-67 Antigen L. propria m. Fibroblasten	Ki-67 Antigen T. submucosa Fibroblasten	Ki-67 Antigen S. intermusc. Ganglienzellen	Ki-67 Antigen T. subserosa Fibroblasten
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,0 (2,0-2,0) 2,0-2,0	2,0 (2,0-3,0) 2,0-3,0	3,0 (3,0-3,0) 2,0-4,0	2,0 (2,0-3,0) 2,0-3,0
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,0 (2,0-2,0) 2,0-2,0	2,0 (2,0-3,0) 2,0-3,0	3,0 (2,25-3,0) 2,0-4,0	2,0 (2,0-3,0) 1,0-3,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 1,0	p = 0,56	p = 0,56	p = 0,81
Gruppe	statistische Maßzahlen	Caspase3-IRS E. m. Zottens. Enterozyten	Caspase3-IRS E. m. Krypt. Enterozyten	Caspase3-IRS L. propria m. Lymphozyten	Caspase3-IRS T. submucosa Lymphozyten
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	3,0 (1,25-4,3) 0,75-6,1	1,15 (0,75-1,6) 0,65-2,45	0,55 (0,0-0,8) 0,5-0,6	0,75 (0,55-1,2) 0,5-2,5
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	2,73 (1,65-4,48) 0,75-5,7	1,6 (0,79-1,73) 0,7-2,5	0,5 (0,5-0,58) 0,0-0,7	0,65 (0,54-0,96) 0,0-2,1
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,66	p = 0,15	p = 0,23	p = 0,53

Legende zu Tab 9.26: DON: Deoxynivalenol, E. m.: Epithelium mucosae, Interpretation der quantitativen Maßzahlen s. Anhang Tabelle 9.5 (S. 103), IRS: Immunreaktiver Score (Interpretation der IRS-Werte siehe Tabelle 3.4, S. 36), Krypt: Kryptenbereich, L. propria m.: Lamina propria mucosae, S. intermusc.: Stratum intermusculare, T.: Tela/Tunica, Zottens.: Zottenspitzen

Tab. 9.27: Deskriptive Statistik und Signifikanzprüfung, mittels Mann-Whitney-Test (U-Test), der immunhistologischen Befunde des Ileums

Gruppe	statistische Maßzahlen	Caspase3-IRS S. intermusc. Ganglienzellen	Caspase3-IRS T. subserosa Lymphozyten	Caspase9-IRS E. m. Zottens. Enterozyten	Caspase9-IRS E. m. Krypt. Enterozyten
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	1,65 (0,85-3,05) 0,0-4,8	0,75 (0,0-0,75) 0,0-0,1	0,68 (0,64-1,15) 0,5-1,6	0,65 (0,64-1,15) 0,5-1,6
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	1,75 (1,09-3,4) 0,0-4,8	0,75 (0,0-0,75) 0,0-0,3	0,85 (0,6-1,3) 0,5-1,6	0,75 (0,6-1,2) 0,5-1,6
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,71	p = 0,85	p = 0,63	p = 0,63
Gruppe	statistische Maßzahlen	Caspase9-IRS L. propria m. Lymphozyten	Caspase9-IRS T. submucosa Lymphozyten	Caspase9-IRS S. intermusc. Ganglienzellen	Caspase9-IRS T. subserosa Lymphozyten
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,6 (0,55-0,61) 0,5-0,65	0,65 (0,6-1,07) 0,6-1,07	0,75 (0,65-2,06) 0,55-2,45	0,6 (0,0-0,75) 0,0-0,1
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,6 (0,55-0,65) 0,0-0,7	1,15 (0,55-1,15) 0,6-2,1	1,55 (0,75-2,0) 0,6-2,95	0,0 (0,0-0,65) 0,0-2,0
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,82	p = 0,58	p = 0,36	p = 0,29
Gruppe	statistische Maßzahlen	p-p38-IRS E. m. Zottens. Enterozyten	p-p38-IRS E. m. Krypt. Enterozyten	p-p38-IRS L. propria m. Lymphozyten	p-p38-IRS T. submucosa Lymphozyten
Kontrolle n = 15	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,75 (0,55-2,05) 0,0-2,95	0,75 (0,5-1,05) 0,0-1,6	0,6 (0,55-0,6) 0,0-0,6	0,6 (0,55-0,61) 0,5-1,2
DON n = 21	Median (1.-3. Quartil) Min.-Max.	0,75 (0,6-1,15) 0,0-3,5	0,6 (0,6-1,1) 0,0-1,6	0,6 (0,55-0,6) 0,0-0,7	0,55 (0,55-0,6) 0,5-1,2
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,92	p = 0,97	p = 0,71	p = 0,29

Legende zu Tab 9.27: DON: Deoxynivalenol, E. m.: Epithelium mucosae, IRS: Immunreaktiver Score (Interpretation der IRS-Werte siehe Tabelle 3.4, S. 36), Krypt: Kryptenbereich, L. propria m.: Lamina propria mucosae, p-p38: phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase, S. intermusc.: Stratum intermusculare, T.: Tela/Tunica, Zottens.: Zottenspitzen

Tab. 9.28: Deskriptive Statistik und Signifikanzprüfung, mittels Mann-Whitney-Test (U-Test), der immunhistologischen Befunde des Ileums

Gruppe	statistische Maßzahlen	p-p38-IRS S. intermusc. Ganglienzellen	p-p38-IRS T. subserosa Lymphozyten
Kontrolle n = 15	Median	0,6	0,6
	(1.-3. Quartil)	(0,55-0,61)	(0,58-0,6)
	Min.-Max.	0,5-0,7	0,6-0,7
DON n = 21	Median	0,55	0,6
	(1.-3. Quartil)	(0,5-0,6)	(0,5-0,6)
	Min.-Max.	0,0-0,6	0,0-1,2
Signifikanzprüfung mittels Mann-Whitney-Test (U-Test)		p = 0,02*	p = 0,44

Legende zu Tab 9.28: *: statistisch signifikant, DON: Deoxynivalenol, IRS: Immunreaktiver Score (Interpretation der IRS-Werte siehe Tabelle 3.4, S. 36), p-p38: phosphorylierte p38 mitogenaktivierte Proteinkinase, S. intermusc.: Stratum intermusculare, T.: Tunica

10 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen, die zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben, herzlich danken:

Herrn Prof. Dr. H.-A. Schoon für die Überlassung dieses sehr interessanten Themas und die jederzeit gewährte, freundliche Unterstützung.

Frau Dr. Anne Reischauer für ihre unermüdliche, hervorragende fachliche Betreuung und freundliche Hilfsbereitschaft.

Frau Dr. Kathrin Jäger für die Entnahme und Aufbereitung der Proben meines Versuchsgutes.

Frau Wipplinger für Ihre unersetzliche Unterstützung und unermüdliche Hilfe unter anderem bei der Erstellung meiner immunhistologischen Untersuchung.

Den Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Pathologie für die herzliche Aufnahme und die hervorragende Zusammenarbeit. Frau Herzog, Frau Schleinitz und Frau Pleitz für die Unterstützung bei meinen histologischen Untersuchungen, Daniela Schilling und Gesine Kubaile-Jahn für die Hilfe bei organisatorischen Problemen sowie Ralf-Peter Dobroschke, Lars Riesche und Bernd Richter für die stets vorhandene Hilfsbereitschaft im Sektionssaal.

Meinen Patho-Team-Kollegen, mit denen das Arbeiten im Institut stets Spaß gemacht hat, für die stets freundschaftliche Unterstützung.

Herrn Andreas Richter für die rettende Unterstützung bei den statistischen Auswertungen.

Franziska für Ihre liebevolle und konstruktive Unterstützung sowie für Ihre Geduld, mit der sie mein häufiges Arbeiten zu später Stunde und am Wochenende ertragen hat.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Eveline und Peter sowie meiner Schwester Sandra für die liebevolle und stets ermunternde Unterstützung beim Erstellen der Dissertation.

