

Aus dem Institut für Anatomie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg



**Einfluss von Deoxynivalenol und *Escherichia coli*-Lipopolysaccharid
auf die Lebermorphologie und -funktion beim Schwein**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Cassandra Stanek

aus Magdeburg

Magdeburg, 2014

Bibliographische Beschreibung:

Stanek, Cassandra:

Einfluss von Deoxynivalenol und *Escherichia coli*-Lipopolysaccharid auf die Lebermorphologie und -funktion beim Schwein. - 2014 -
65 Blatt, 12 Abbildungen, 12 Tabellen, 5 Anlagen

Kurzreferat:

Deoxynivalenol (DON), ein sekundärer Metabolit der Getreideschimmelpilze *Fusarium graminearum* und *culmorum*, sowie Lipopolysaccharide (LPS), die Zellwandkomponenten gram-negativer Bakterien, zeigten beide in der Literatur schädigenden Einfluss auf die Leber. Ein potenzierender toxischer Effekt beider Substanzen wurde in einem Mausmodell und für Hepatozyten *in vitro* nachgewiesen, aber bisher nicht bei Schweinen, die als sensibelste Spezies für DON gelten. In der vorliegenden Arbeit haben 39 Hausschweine entweder Kontrollfutter (KON) oder DON-kontaminiertes Futter (3,1 mg DON/kg Futter) für 37 Tage erhalten. Anschließend wurden die Tiere entweder mit physiologischer Kochsalzlösung (KON_KON), 100 µg/kg KG DON (KON_DON), 7,5 µg/kg KG *E. coli*-LPS (KON_LPS) oder beiden Toxinen (KON_DON/LPS) infundiert. Vor, während und nach der Infusion wurden Blutproben für die Erhebung der klinischen Chemie entnommen. 195 Minuten nach Start der Infusion wurden alle Schweine geschlachtet, die Lebern entnommen und es erfolgte die histologische Untersuchung anhand eines entwickelten Indexes. LPS verursachte ein erhöhtes relatives Lebergewicht ($p < 0,05$), signifikante portale, periportale und azinäre Entzündungszeichen ($p < 0,05$) und verstärkte Hämorrhagien ($p < 0,01$) sowie pathologisch erhöhte Bilirubinwerte. Die DON-Infusion allein zeigte dagegen keinen Einfluss auf die Lebermorphologie und -funktion, wohingegen die Fütterung mit DON-kontaminiertem Getreide die Auswirkungen der LPS-Infusion auf die Leberhistologie zu mildern schien.

Schlüsselwörter:

Deoxynivalenol, Lipopolysaccharid, Schwein, Leber, Histopathologie, Klinische Chemie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Deoxynivalenol	1
1.1.1 Vorkommen und Bildung	2
1.1.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften	4
1.1.3 Verstoffwechslung von DON.....	5
1.1.4 Wirkung von DON auf zellulärer Ebene	6
1.1.5 Systemische Wirkung von DON.....	7
1.2 Lipopolysaccharide	10
1.2.1 Aufbau und Eigenschaften von LPS	10
1.2.2 Zelluläre Wirkung von LPS	12
1.2.3 Systemische Wirkung von LPS	16
1.3 Die Leber	18
1.3.1 Makroskopie der Leber	18
1.3.2 Mikroskopie der Leber.....	18
1.3.3 Funktion der Leber im Stoffwechsel	20
1.4 Effekt von DON und LPS auf die Leber.....	23
1.4.1 DON-Wirkung auf die Leber beim Schwein	23
1.4.2 LPS-Wirkung auf die Leber beim Schwein	24
1.4.3 Effekt der Kombination von DON und LPS beim Schwein	25
1.5 Hypothese	27
2 Material und Methoden.....	28
2.1 Ethische Grundlagen	28
2.2 Versuchstiere und -futter.....	28
2.2 Versuchsaufbau	29
2.3 Probenentnahme.....	30
2.3.1 Entnahme der Blutproben und -analyse	30
2.3.2 Makroskopische Untersuchung der Leber und Präparation.....	31
2.4 Histologischer Aktivitätsindex	31
2.5 Statistik	35

3 Ergebnisse.....	36
3.1 Zootechnische Parameter	36
3.2 Lebermakroskopie	37
3.3 Lebermikroskopie	38
3.3.1 Kumulativer Histologischer Aktivitätsindex	40
3.4 Klinische Chemie.....	41
3.4.1 Aspartat-Aminotransferase (ASAT)	41
3.4.2 γ -Glutamyl-Transferase (GGT)	42
3.4.3 Glutamat-Dehydrogenase (GLDH).....	43
3.4.4 Albumin	44
3.4.5 Gesamtprotein	45
3.4.6 Gesamtbilirubin	46
4 Diskussion	49
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	49
4.2 Einleitung der Diskussion	50
4.3 Einfluss von DON auf die Lebermorphologie und -funktion	51
4.4 Einfluss von LPS auf die Lebermorphologie und -funktion.....	55
4.5 Wirkung der Kombination von DON und LPS	59
4.6 Ausblick	64
5 Zusammenfassung	65
6 Literaturverzeichnis	66
7 Anlagen	78
7.1 Methoden zur Analyse der Futtermischung.....	78
7.2 Protokoll zur Herstellung der Stammlösungen	79
7.3 Protokoll der Katheteroperation.....	80
7.4 Protokoll Paraffineinbettung	81
7.5 Protokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung	81
8 Danksagung	82
9 Eidesstattliche Erklärung.....	83
10 Lebenslauf.....	84
11 Veröffentlichungen	86

Abkürzungsverzeichnis

ALAT	Alanin-Aminotransferase (auch GPT)
AP	Alkalische Phosphatase
ASAT	Aspartat-Aminotransferase (auch GOT)
ATA	Alimentäre toxische Aleukie (Faulfieber)
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
CD	<i>Cluster of differentiation</i> , ein Oberflächenprotein
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRP	C-reaktives Protein
DIC	<i>Disseminated Intravascular Coagulation</i>
DON	Deoxynivalenol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>F.</i>	<i>Fusarium</i>
GGT	γ -Glutamyl-Transferase
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (auch ASAT)
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase (auch ALAT)
HAI	Histologischer Aktivitätsindex
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
Hep	L-Glycero-D-manno-heptose
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IKK	<i>Inhibitory κB-Kinase Komplex</i>
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
<i>in vitro</i>	lat. „im Glas“, in der Kultur
<i>in vivo</i>	lat. „im Lebendigen“, im Organismus
i.p.	intraperitoneal
IRAK	Interleukin-Rezeptor-assoziiertes Komplex
i.v.	intravenös
Kdo	2-Keto-3-deoxyoctansäure
KG	Körpergewicht
KON	Kontrolle
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LG	Lebergewicht

LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MODS	<i>Multi Organ Dysfunction Syndrome</i>
NF	Nekrosefaktor
NFκB	<i>Nuclear factor “kappa-light-chain-enhancer” of activated B-cells</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NOAEL	<i>No Observed Adverse Effect Level</i> , höchste Stoffdosis, bei der kein Effekt beobachtet wird
OVLT	<i>Organum vasculosum laminae terminalis</i>
p	Signifikanzniveau
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PF	Portalfeld
PGE₂	Prostaglandin E ₂
p.i.	lat. <i>post infusionem</i> , nach dem Start der Infusion
p.o.	lat. <i>per os</i> , orale Gabe
PRR	<i>Pattern-Recognition Receptor</i>
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
TF	<i>Tissue Factor</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor
ZON	Zearalenon
ZV	Zentralvene

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Infektionszyklus von <i>F. graminearum</i>	3
Abb. 2 Chemische Struktur von DON	4
Abb. 3 Aufbau von LPS.....	11
Abb. 4 Modell der Zellaktivierung durch LPS	13
Abb. 5 Signaltransduktionsweg des LPS/LBP/CD14/MD-2/TLR4 - Komplexes.....	14
Abb. 6 Schema zur Leberhistologie.....	19
Abb. 7 Versuchsaufbau.....	30
Abb. 8 Skizze zum Bewertungsschema des histologischen Aktivitätsindexes	32
Abb. 9 Repräsentative makroskopische Fotodokumentation der Lebern	37
Abb. 10 Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der histologischen Parameter	39
Abb. 11 Kumulativer histologischer Aktivitätsindex der Schweinelebern.....	40
Abb. 12 Zeitlicher Verlauf von Gesamtbilirubin unter Einfluss von DON und LPS	47

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Übersicht der Untergruppen der Trichothecene	2
Tab. 2 Chemische Eigenschaften von DON	5
Tab. 3 Futterzusammensetzung	28
Tab. 4 Histologischer Aktivitätsindex (HAI)	33
Tab. 5 Einfluss von DON und LPS auf zootechnische Parameter.....	36
Tab. 6 Effekt von DON und LPS auf den Histologischen Aktivitätsindex	38
Tab. 7 Bestimmung der Enzymaktivität der ASAT.....	42
Tab. 8 Bestimmung der Enzymaktivität der GGT	43
Tab. 9 Bestimmung der Enzymaktivität der GLDH	44
Tab. 10 Bestimmung der Albuminkonzentration	45
Tab. 11 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration	46
Tab. 12 Bestimmung der Gesamtbilirubinkonzentration.....	48

1 Einleitung

1.1 Deoxynivalenol

Schimmelpilze der Gattung *Fusarium* (*F.*) befallen als sogenannte Feldpilze das Getreide schon vor der Ernte und bilden sekundäre Metaboliten, die Mykotoxine. Deoxynivalenol (DON) gehört der Gruppe der Typ B - Trichothecene an. Erstmals erwähnt wurde DON von Morooka et al. (1972) und erhielt bald aufgrund seiner emetischen Wirkung den Namen Vomitoxin (Versonder et al. 1973). Mykotoxine werden durch Getreideverarbeitung oder Nahrungsprozessierung nicht wesentlich reduziert oder abgebaut. Sie sind weiterhin vorhanden und können so in Nahrungskette gelangen. Die orale Aufnahme von kontaminierten Getreideprodukten stellt somit ein permanentes Gesundheitsrisiko für den Menschen und dessen Nutztiere dar. Schweine sind die empfindlichste Spezies unter diesen Nutztieren und reagieren auf das Trichothecen DON u.a. mit Futterverweigerung, erhöhter Salivation und Erbrechen (Bondy und Pestka 2000, Rotter et al. 1996, Young et al. 1983). Die reduzierte Futtermittelaufnahme und unzureichende Gewichtszunahme spielen eine große Rolle in der Tierproduktion, die dadurch ökonomische Verluste erleidet.

Die Hauptwirkung der Trichothecene erfolgt über die Inhibition der Proteinsynthese durch Bindung an die 60S-Untereinheit der Ribosomen auf zellulärer Ebene, wodurch die weitere Zellvermehrung gehemmt wird (Ehrlich und Daigle 1987). Wirkungsort der Mykotoxine sind deshalb schnell proliferierende Gewebe oder Organe mit hohem Proteinturnover (Eriksen 2003), wie z.B. der Magen-Darm-Trakt und die Leber. Des Weiteren besitzt DON immunmodulatorische Fähigkeiten durch die Aktivierung der *mitogen-activated protein kinases* (MAPK), die Freisetzung von Zytokinen und Induktion von Apoptose in Immunzellen (Pestka 2010a). Auf die Leber bezogen konnten Goyarts et al. (2007) und Tiemann et al. (2008) bisher keine schädigenden Wirkungen von DON allein am Schwein *in vivo* nachweisen, wobei hier das Hauptaugenmerk auf DON und dessen Einflüsse auf die Proteinbiosynthese lag. Doch Mikami et al. (2010) konnten eine starke Beeinträchtigung der Lebermorphologie durch akute hochdosierte DON-Infusion zeigen. Allerdings wurden keine Beobachtungen zur Auswirkung der chronischen Mykotoxinexposition über das Futter auf die Leberhistologie und die möglichen Einschränkungen der Leberfunktion beim Schwein angestellt. Hierzu gab es bisher keine weiteren Publikationen in der Literatur.

1.1.1 Vorkommen und Bildung

Die Trichothecene stellen eine Unterform der Mykotoxine dar, welche nach ihrer Struktur in Typ A, B, C und D eingeteilt werden (Tabelle 1). Am häufigsten kommen die Typ A - Trichothecene vor, zu denen das T-2 Toxin gehört. DON zählt zu den Typ B - Trichothecenen, welche von *F. graminearum* und *culmorum* gebildet werden.

Tab. 1 Übersicht der Untergruppen der Trichothecene

Untergruppe	Beispiel	Produzent
Typ A	T-2 Toxin	<i>F. tricinctum, culmorum u. solani</i>
	HT-2 Toxin	<i>F. culmorum, poae u. sporotrichioides</i>
	Diacetoxyscirpenol	<i>F. roseum, sambucinum u. tricinctum</i>
Typ B	Nivalenol	<i>F. nivale u. graminearum</i>
	Deoxynivalenol	<i>F. graminearum u. culmorum</i>
Typ C	Crotocin	<i>F. roseum und Cephalosporium crotocinigeum</i>
Typ D	Verrucarin A	<i>Myrothecium verrucaria u. roradum</i>
	Roridin A	<i>Myrothecium verrucaria u. roradum</i>

DON wird als sekundäres Stoffwechselprodukt von den Schlauchpilzen, vor allem von *F. graminearum* und *culmorum*, gebildet (Hussein und Brasel 2001). Fusarien befallen als Ährenparasiten neben Mais vor allem Getreidesorten wie Weizen, Triticale, Roggen und Gerste und bilden dann Mykotoxine (Dersjant-Li et al. 2003). Die verursachten Erkrankungen des Getreides sind hierbei die landwirtschaftlich gefürchtete partielle Weiß- oder Taubährigkeit (Richard 2007). Am empfindlichsten gegenüber einem Pilzbefall ist das Getreide bei seiner Vollblüte. Hauptinfektionsquelle stellen dabei die durch ungenügendes Pflügen auf der Bodenoberfläche übriggebliebenen Pflanzenreste der Vorkultur des Feldes dar (CAST 2003, Richard 2007). Es bilden sich auf den Stroh- und Stoppelresten Konidien*, welche durch Wind oder Regen die Ähre erreichen und diese während ihrer Blütezeit infizieren können. *F. graminearum* kann außerdem Perithezien* auf den Stoppelresten bilden, aus denen sich Fruchtkörper mit Askosporen* entwickeln, welche dann ebenfalls über Wind und Regen die Pflanze befallen können. Dieser Infektionszyklus ist in Abbildung 1 dargestellt.

* Pilzsporenformen

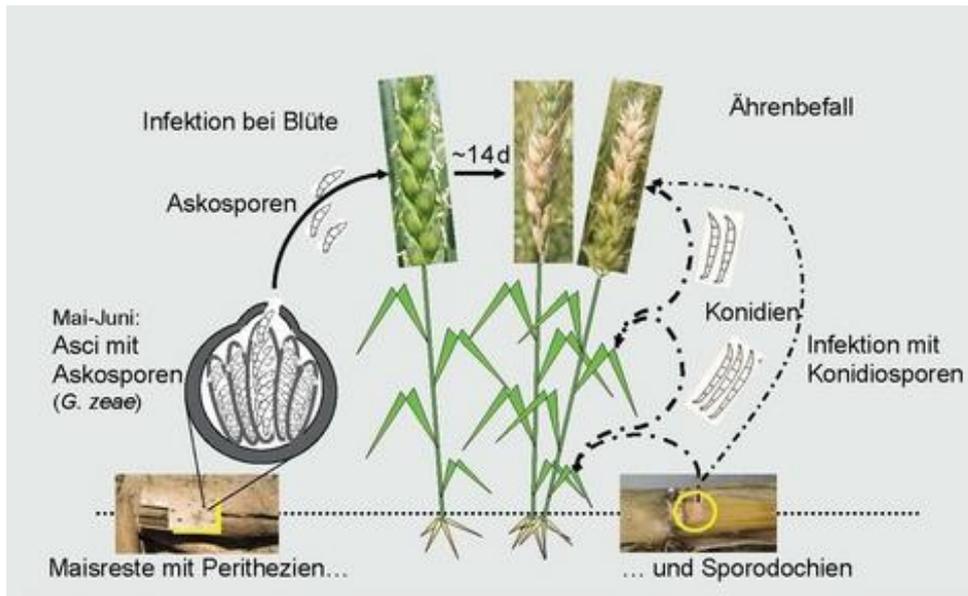


Abb. 1 Infektionszyklus von *F. graminearum*

Dargestellt ist der Ährenbefall mit *F. graminearum* durch Perithezien aus Maisresten, die als Askosporen durch Wind oder Regen auf die Ähre gelangen sowie durch Sporodochien aus Stoppelresten, die als Konidien die Pflanze infizieren können. Abbildung entnommen von URL <http://www.agroscope.admin.ch/phytopathologie/06073/06077/index.html?lang=de> (15.01.2013)

Bei gemäßigttem Klima und Wetterperioden mit hoher Feuchtigkeit keimen die Sporen schließlich aus und können dann in die Ähre vordringen. *F. graminearum* benötigt dafür optimaler Weise eine Temperatur von 25 °C, während *F. culmorum* weniger temperaturempfindlich ist und schon ab 13 °C keimt. Weitere prädisponierende Faktoren für den Getreidebefall sind Mais in der Vorfrucht, eine fehlende Bodenbearbeitung nach Mais und die Verwendung anfälliger Weizensorten (Obst und Gehring 2002). Auch nach Getreidelagerung in Silos kann die Produktion der Mykotoxine bei einem Luftfeuchtegrad über 15% fortschreiten. Durch die Verwendung dieses Getreides als Futtermittel können die gebildeten Schimmelpilzmetaboliten in den systemischen Kreislauf von Nagetieren, Wiederkäuern und Schweinen gelangen. Der NOAEL, also die Stoffkonzentration, bei der noch keine signifikanten Auswirkungen auf die Tiere zu beobachten ist, liegt für Nagetiere und Wiederkäuer bei 0,1 - 0,15 mg/kg KG/d und für Schweine bei 0,03 - 0,12 mg/kg KG/d (Pestka 2007). Bei Überschreitung dieses Levels können durch eine reduzierte Futteraufnahme ein gehemmtes Wachstum, sowie eine reduzierte Gewichtszunahme auftreten. Schweine als sensible Spezies würden gar bei sehr hohen Dosen (19,7 mg/kg KG p.o.) mit Erbrechen reagieren (Forsyth et al. 1977).

Durch Befall des Getreides mit Fusarien kommt es außerdem zur Minderung der Erntequalität und somit zu Ertragsverlust, was sich negativ auf die Backqualität und Braueigenschaften des Getreides auswirkt. Auch während des Prozesses des Backens kann aufgrund der Hitzestabilität keine wesentliche Reduktion des Mykotoxingehaltes erzielt werden. Deshalb kann DON auch nach allen Bearbeitungsprozessen immer wieder in Nahrungsmittelprodukten vorkommen. Eine Gefahr für den Menschen stellen hauptsächlich die mit DON kontaminierten Getreideprodukte dar. So kam es 2011 in Deutschland zum Rückruf von Hartweizen-Nudeln, welche durch DON belastet waren (Alnatura Produktions- und Handels GmbH 2011). Auch in Österreich wurden Produkte wegen der Überschreitung der zulässigen Grenzwerte von DON zurückgerufen, wie beispielsweise Käse- und Paprikataler (Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH 2011). Zur Vermeidung von Intoxikationen wurden von der Europäischen Union Grenzwerte für Nahrungsmittel festgelegt, wobei der Höchstwert für Getreideprodukte 750 µg/kg, für Brot und Gebäck 500 µg/kg und für Kindernahrung 200 µg/kg beträgt (EU-Kommission 2006b).

1.1.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften

DON ist ein Sesquiterpen mit einer Doppelbindung an C9-10 und einem 12,13-Epoxidring, welche essentiell für die Toxizität der Trichothecene sind (Ehrlich und Daigle 1987). Zusätzlich enthält die polare organische Verbindung eine Ketogruppe an C8 und drei freie Hydroxylgruppen (-OH). Die chemische Struktur von DON ist in Abbildung 2 dargestellt.

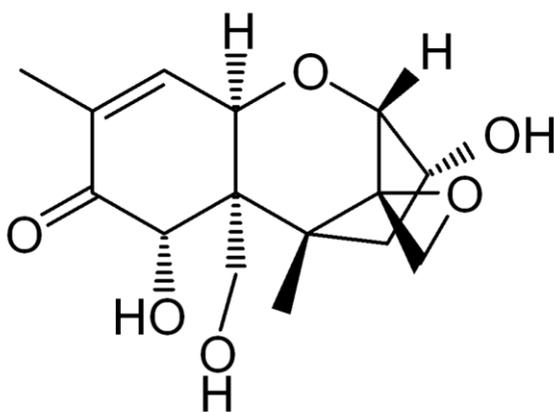


Abb. 2 Chemische Struktur von DON

Formel entnommen von URL

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/00303?lang=de®ion=DE> (11.01.2013)

Das Grundgerüst der Trichothecene ist chemisch und thermisch (bis zu 350 °C) stabil, weshalb auch in der Futter- und Nahrungsmittelverarbeitung kaum ein Abbau stattfindet und DON weiterhin toxisch aktiv bleibt (Hughes et al. 1999). Die Toxizität von Mykotoxinen richtet sich nach der Anzahl seiner Seitenkettenanhänge.

Je weniger Seitenketten vorhanden sind, desto geringer ist die Toxizität (Feinberg und McLaughlin 1989). Die Eigenschaften des Mykotoxins DON sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2 Chemische Eigenschaften von DON

Deoxynivalenol	
Synonyme	DON, Vomitoxin, emetischer Faktor, RD-Toxin, 3 α ,7 α ,15-Trihydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-one
Summenformel	C ₁₅ H ₂₀ O ₆
Produktnummer	D 0156 (Sigma-Aldrich, Deutschland)
CAS-Nummer	51481-10-8
Molekulargewicht	296,32 g/mol
Aggregatzustand	fest, farblose feine Nadeln
Lagerungstemp.	2 - 8 °C
Siedepunkt	543,9 ± 50,0 °C
Schmelzpunkt	151 - 153 °C
Löslichkeit	löslich in Ethanol, Methanol, Chloroform, Acetonitril, Wasser
LD ₅₀	78 mg/kg KG für Mäuse (Forsell et al. 1986) 140 mg/kg KG für Broiler (Huff et al. 1981)
NOAEL	0,1 - 0,15 mg/kg KG/d für Wiederkäuer, 0,03 - 0,12 mg/kg KG/d für Schweine (Pestka 2007)
EU-Grenzwerte	750 µg/kg für Getreideprodukte, 500 µg/kg für Brot und Gebäck, 200 µg/kg für Kindernahrung (EU-Kommission 2006b)

1.1.3 Verstoffwechslung von DON

Die Aufnahme von DON erfolgt oral. Es gelangt mit dem Futtermittel über die Speiseröhre in den Magen, wobei die Verweildauer dort weniger als zwei Stunden in der flüssigen Phase beträgt (Dänicke et al. 2004a). Im Magen findet keine Hydrolyse statt, da DON auch in saurem und neutralem pH-Milieu stabil bleibt (Ueno 1987). Schon im Magen kommt es zur Resorption von DON, welche sich im Duodenum und proximalen Jejunum fortsetzt, sodass das Mykotoxin zu 98% im oberen Gastrointestinaltrakt aufgenommen wird

(Dänicke et al. 2004a, Goyarts und Dänicke 2006, Prelusky et al. 1988). Die Absorption von DON erfolgt dabei linear zur Serumkonzentration (Dänicke et al. 2008, Oswald und Taranu 2008). Nach annähernd vollständiger intestinaler Aufnahme erfolgt die systemische Verteilung über den Blutweg. Dafür benötigt DON im Durchschnitt eine Zeit von 15 min im Tiermodell und zum Erreichen der Maximalkonzentration vor erneutem Abfall eine Zeit von 250 min (Dänicke et al. 2004a, Goyarts und Dänicke 2006). Zur weiteren Verstoffwechslung von DON kommt es dann in der Leber. Hier kann ein hepatischer *first-pass*-Effekt nicht ausgeschlossen werden (Dänicke et al. 2004a). Gouze et al. (2005) und Sobrova et al. (2010) erklärten die hepatische Detoxifikation durch eine Phase-I-Reaktion im Cytochrom-P450-Komplex und nachfolgender Konjugation der entstehenden DON-Radikale an Glutathion. Anschließend wird das Mykotoxin in der Leber an Glucuronsäure gebunden, sodass DON-Glucuronid entsteht, und so der Exkretion zugeführt werden kann (Eriksen 2003). Die Ausscheidung des Trichothecen erfolgt hauptsächlich nach renaler Metabolisierung als Deepoxy-Deoxynivalenol (DOM) über den Urin (Gareis et al. 1987, Prelusky et al. 1988). Es verbleiben allerdings nach Passage des Jejunums noch 2% der aufgenommenen DON-Konzentration im Darmlumen. Im Dickdarm konnten bis zu 10% der anfänglichen DON-Menge nachgewiesen werden, weshalb von einer längeren Verweildauer und einer folglich Akkumulation des Mykotoxins im Colon ausgegangen wird (Dänicke et al. 2004a). Dabei kann es durch Deepoxydierung zu einer Phase-II-Reaktion in der Darmwand kommen und es entsteht Deepoxy-DON (DOM), welches über den Fäzes ausgeschieden wird (Bauer 1995). Eine Akkumulation von DON in der Gallenflüssigkeit nach ist Döll et al. (2003) nicht möglich, da es kein Bestandteil des enterohepatischen Zyklus ist.

Bei Wiederkäuern spielt dagegen hauptsächlich die Mykotoxinverarbeitung durch Mikroorganismen eine Rolle. Die Verdauung wird durch die Flora im Vormagen, dem Pansen, gewährleistet. Durch Mikroorganismen kommt es zu einer Spaltung des Epoxidringes, der Deepoxydierung, und aus DON wird das unschädliche DOM (Schatzmayr et al. 2006, Pestka 2007). Daher sind in der Literatur nur wenige Daten zu einem schädigenden Einfluss von DON auf Wiederkäuer zu finden.

1.1.4 Wirkung von DON auf zellulärer Ebene

Seine Wirkung entfaltet das Mykotoxin auf zellulärer Ebene durch Hemmung der Proteinbiosynthese. Das Trichothecen bindet mit seiner Epoxidgruppe an der großen 60S-Untereinheit der Ribosomen und interferiert mit der Peptidyltransferase (Liao 1976, Ueno und Hsieh 1985). Die verursachte Konformationsänderung führt zu einer Blockade der

Translation im Stadium der Initiation und stört somit die Proteinsynthese des Organismus (Ehrlich und Daigle 1987). Das Fehlen von Proteinen wirkt sich weiterhin auf die DNA-Synthese aus, kann zum DNA-Bruch sowie auch zur Membranstabilität führen (Feinberg und McLaughlin 1989, WHO 1990). Von der inhibierten Proteinsynthese sind vor allem Zellen mit hohem Proteinumsatz betroffen (Cheng et al. 2006). So führt die Exposition mit Trichothecenen zur Apoptose *in vitro* (Pestka et al. 1994, Ueno et al. 1995, Sun et al. 2002) und auch *in vivo* u.a. im Lymphsystem (Shinozuka et al. 1997, Islam et al. 1998, Murshedul et al. 2000, Poapolathep et al. 2002), den intestinalen Krypten (Li et al. 1997), dem hämatopoetischen System (Shinozuka et al. 1998) und der Leber (Ihara et al. 1997).

Durch die Hemmung der Proteinsynthese wird eine Schwächung des Immunsystems mit nachfolgender Krankheitsanfälligkeit der Tiere vermutet. Thuvander et al. (1999) beobachteten bei Gabe höherer Dosen (2 - 4 µmol/l) von DON *in vitro* eine Immunglobulinabnahme bei humanen Lymphozyten. Dieser Effekt wurde durch die Induktion von MAP-Kinasen mit nachfolgend erhöhter mRNA-Expression und somit der Produktion von Zytokinen durch Bondy und Pestka (2000) sowie Zhou et al. (2003) erklärt. Der Haupteffekt des Versuches bestand in einer effektiven Hemmung des Lymphozytenwachstums im Sinne einer Immunsuppression. Allerdings trat als Antwort auf eine niedrig dosierte Gabe von Trichothecenen (0,2 - 0,4 µmol/l DON) eine erhöhte Produktion von Immunglobulinen bei humanen Lymphozyten *in vitro* auf. Eine erhöhte IgA- und IgG-Produktion nach zweijähriger Fütterung weiblicher B6C3F1-Mäuse mit 10 mg DON/kg KG konnte von Iverson et al. (1995-1996) ebenfalls beschrieben werden. Diese Beobachtungen würden wiederum für eine Aktivierung des Immunsystems durch DON sprechen. In der Literatur gibt es daher für DON Hinweise für ein immunsuppressives und immunstimulierendes Verhalten.

1.1.5 Systemische Wirkung von DON

Das Hausschwein (*Sus scrofa*) zeigt sich sehr sensibel gegenüber der Fütterung mit DON (Trenholm et al. 1989, Rotter et al. 1996) und reagiert generell empfindlicher mit Hemmung von Wachstum und Gewichtszunahme auf sub- und chronische DON-Exposition, während Wiederkäuer und Geflügel sich eher resistent zeigen (Pestka 2007). Die Sensitivität von Tieren gegenüber DON stellt sich wie folgt dar (Rotter et al. 1996):

Schwein > Maus > Ratte > Geflügel ≈ Nagetier > Rind.

Der NOAEL für Nagetiere liegt bei 0,1 - 0,15 mg/kg KG/d und für Schweine dagegen schon bei 0,03 - 0,12 mg/kg KG/d (Pestka 2007), was die Sensibilität bei Schweinen

verdeutlicht. Die EU-Kommission legte bereits Richtwerte für DON in Futtermitteln fest. So können Getreideerzeugnisse 2 mg DON/kg, Maisnebenprodukte 3 mg DON/kg und Ergänzungs- sowie Alleinfuttermittel für Schweine noch 0,9 mg DON/kg Futter enthalten (EU-Kommission 2006a). In hohen Dosen (12 mg DON/kg KG p.o.) verursacht DON bei Schweinen totale Futtermittelverweigerung, aber auch in niedrigen Dosen (3 - 4 mg DON/kg KG p.o.) kommt es neben der verminderten Futteraufnahme auch zur Verringerung von Wachstum und Gewichtszunahme (Forsyth et al. 1977, Friend et al. 1982, Young et al. 1983). In sehr hohen Dosen (19,7 mg/kg KG p.o.) führt DON als gastrointestinaler Reizstoff bei Schweinen zu Erbrechen (Forsyth et al. 1977). Die induzierte Emesis wird vermutlich durch Konzentrationsänderungen der Transmitter Dopamin, Tryptophan, Serotonin und Serotoninmetaboliten im Gehirn ausgelöst, wie Untersuchungen bei Nagetieren (MacDonald et al. 1988) und Schweinen (Prelusky und Trenholm 1993, Prelusky 1993, Rotter et al. 1996) zeigten. Eine Erhöhung des Serotoninspiegels wurde bei Schweinen nach Fütterung mit DON (Prelusky et al. 1992) oder mit einem Mykotoxin-Gemisch, welches DON enthielt, nachgewiesen (Swamy et al. 2004). Auch ein durch DON verursachter erhöhter Tryptophanspiegel im Blut kann zum Übertritt in das Gehirn via Blut-Hirn-Schranke führen und dort die Serotoninsynthese erhöhen, woraufhin es zu Appetitverlust und Lethargie kommen kann (Leathwood 1987). Swamy et al. (2002) und Cheng et al. (2006) fanden einen Anstieg von Serotonin im Gehirn, sowie eine vermehrte intracerebrale Aufnahme von Tryptophan, wobei ein Zusammenhang mit der verminderten Futteraufnahme und Gewichtszunahme vermutet wird. Des Weiteren wurden bei Schweinen vermehrtes Speicheln, Zähneknirschen und Kauen nach DON-Injektion (0,25 mg/kg i.v.) beobachtet (Prelusky et al. 1992). Der Effekt von DON auf die Futteraufnahme bei Schweinen sei laut Lauber und Kollegen abhängig von deren Alter, Gewicht und Geschlecht und der jeweiligen Anzahl in der untersuchten Gruppe. Des Weiteren würden das Fütterungsregime, die Zusammensetzung der Diät und die Fütterungsperiode eine Rolle spielen (Lauber et al. 2001). So konnte während eines Experiments im Sommer eine größere Gewichtsabnahme nach DON-Fütterung beobachtet werden im Vergleich zu einem Experiment im Winter. Allerdings unterschieden sich hierbei die verwendeten DON-Konzentrationen auch erheblich. Deshalb forderten Lauber et al. eine Vereinheitlichung der Standards bei Tierexperimenten, um externe Einflüsse so gering wie möglich zu halten und vergleichbarer zu machen. Auch das Geschlecht der Tiere zeigte einen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber DON. So reagieren männliche Mäuse empfindlicher auf DON als ihre weiblichen Artgenossen (Greene et al. 1994) und auch bei Schweinen war dieser geschlechtsspezifische Effekt nachweisbar (Cote et al.

1985). Außerdem verursacht das Mykotoxin Haut- und Schleimhautreizungen beim Schwein (Gutzwiller und Gafner 2012, Zaki et al. 2012). Seit Schweine als Modell für die Darmfunktion des Menschen genutzt werden (Nejdfors et al. 2000) und auch zum Nachweis der Medikamenten-induzierten Emesis (Szelenyi et al. 1994), wird postuliert, dass der Mensch genauso sensibel auf DON reagiert wie das Schwein (Pestka 2010a). Aufgrund der Persistenz von Mykotoxinen kann neben den exponierten Tieren auch der Mensch durch die befallenen Getreideprodukte gefährdet werden. DON gelangt ausschließlich über kontaminierte Pflanzenprodukte in die Nahrungskette des Menschen (Zaki et al. 2012), nicht durch den Genuss tierischer Produkte, wie etwa Fleisch, Milch und Eier. Des Weiteren findet keine Akkumulation von DON in organischem Gewebe statt (Pestka 2007). Das Toxin kann aber unbewusst über Nahrungsprodukte, die kontaminiertes Getreide enthalten, wie Brot, Bier und Cornflakes aufgenommen werden (Wolf-Hall und Schwarz 2002, Schollenberger et al. 1999). Eine Studie in Großbritannien zeigte, dass 98,7% der 300 untersuchten Personen, welche Getreideprodukte konsumierten, schon in Kontakt mit DON gekommen waren (Turner et al. 2008). Da Fusarien häufig in den nördlichen Breitengraden auftreten (Ueno 1983), wie zum Beispiel in Polen, Deutschland, Japan, Neuseeland und Amerika (Peraica et al. 1999), sind auch europäische Produkte oft von einer Kontamination erfasst. Mindestens 25% allen Getreides weltweit ist von Mykotoxinen befallen (Fink-Gremmels 1999).

Die häufigsten Reaktionen auf DON sind neben Bauchschmerzen ebenfalls Übelkeit und Erbrechen. In Indien kam es 1987 nach Genuss von Brot aus verschimmeltem Getreide zusätzlich zu Durchfall, Blut im Stuhl, Flatulenz und allergischen Reaktionen (Bhat et al. 1989). Bei den Kindern, die das verdorbene Brot über mehrere Wochen konsumiert hatten, kam es außerdem zu sekundären Infektionen der Atemwege. Ähnliche Symptome traten ebenfalls nach Aufnahme von kontaminiertem Getreidekorn in 18 Provinzen von Polen auf (Perkowski et al. 1990). Des Weiteren wurden 1961-85 in China die „Scabby Grain Toxicosis“ (Luo 1988) und 1998-99 die „Red Mould Intoxication“ (Li et al. 2002) unter Beteiligung von DON beschrieben. In der früheren Sowjetunion forderte 1942 - 1947 die Mykotoxikose „alimentäre toxische Aleukie“ (ATA) viele Todesopfer (Joffe 1986a). Neben der unbewussten Aufnahme von DON wurden Mykotoxine ebenfalls als biologische und chemische Waffen in den späten 70ern und frühen 80ern in Südostasien in Form des „yellow rain“ (gelber Regen) eingesetzt (Mirocha et al. 1983, Watson et al. 1984). Joffe (1986b) beschrieb eine große Anzahl an Symptomen in diesem Zusammenhang: Blutungen, Übelkeit, Fieber, Atemnot, Benommenheit und Schwindelgefühl.

1.2 Lipopolysaccharide

Die erste Erwähnung fanden Lipopolysaccharide (LPS) durch Richard Pfeiffer, der Untersuchungen über das Cholera Gift anstellte (Pfeiffer 1892). Zwar ist das eigentliche Endotoxin das Lipid A, welches in der Bakterienmembran verankert ist, doch werden die Begriffe Endotoxin und LPS im Sprachgebrauch und auch in dieser Arbeit synonym verwendet. Erst wenn die Zelle lysiert, kann das innen liegende toxische Lipid A frei werden. Als Mediator in der Pathophysiologie der lokalen und systemischen Inflammation vermittelt LPS seine Wirkung über Signaltransduktionswege. Es kann direkt den membranständigen Rezeptor mCD14 aktivieren. Im Komplex mit dem Akute-Phase-Protein LPS-bindendes Protein (LBP) ist diese Rezeptorbindung aber noch viel stärker. Zusammen mit LBP und der löslichen CD14-Form (sCD14) kann LPS auch Zellen ohne mCD14-Rezeptor stimulieren, und zwar über den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4). Es folgt die Signalkaskade MyD88 → TRAF6 → IκB, welche am Ende NF-κB aktiviert und zu einer Immunantwort führt (van Amersfoort et al. 2003). Das Endotoxin verursacht Vasodilatation, Hämostase und intravasale Gerinnung (Dauphinee und Karsan 2006) sowie eine durch Apoptose der Endothelzellen vermittelte erhöhte Membranpermeabilität mit nachfolgender Blutungsneigung (Frey und Finlay 1998, Cybulsky et al. 1988) als Zeichen der verursachten Entzündungsreaktion. Weitere Sepsiszeichen, wie Blutungen, Nekrosen, Abszesse und Anstieg der leberspezifischen Laborparameter, ausgelöst durch LPS, wurden von Martens et al. (2007), Leifsson et al. (2010) und Saetre et al. (2001) am Schwein belegt.

1.2.1 Aufbau und Eigenschaften von LPS

LPS ist Zellbestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien. Die innere Membran ist ein symmetrischer Phospholipid-Bilayer und die äußere Membran ein asymmetrischer Lipid-Bilayer, wobei die Außenseite von LPS geformt wird (Sperandeo et al. 2009). LPS ist ein komplexes Glykolipid, welches von innen nach außen aus drei Anteilen besteht: dem Lipid A, der Kernregion und dem O-Antigen. Seine Toxizität erhält LPS durch das hydrophobe Lipid A (Galanos et al. 1985), welches eine konstante Struktur aus zwei verbundenen D-Glukosaminen zeigt. Diese sind an Position 1 und 4' phosphoryliert, enthalten freie Hydroxylgruppen an den Positionen 4 und 6' und weisen sechs Fettsäuren auf, welche den Anker in der äußeren Bakterienmembran bilden. Das Molekül ist in Abbildung 3 dargestellt. LPS kann nur bei Zellyse oder Teilung der Bakterien freigesetzt werden, weshalb es auch Endotoxin genannt wird.

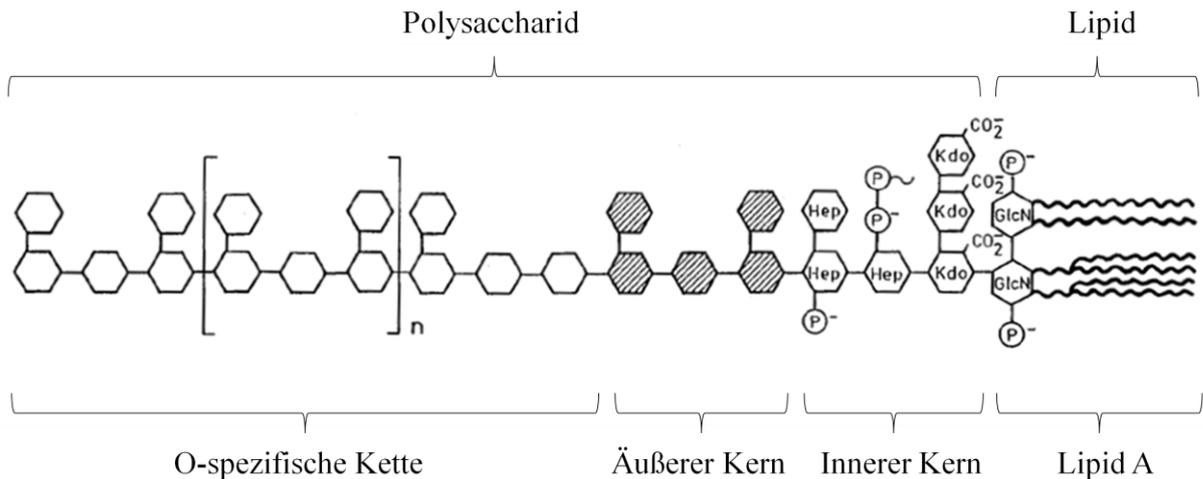


Abb. 3 Aufbau von LPS

Schematischer Aufbau eines enterobakteriellen Lipopolysaccharides. Abbildung modifiziert nach Schletter et al. (1995). Abkürzungen: Hep - Heptose, Kdo - 2-Keto-3-deoxyoctansäure, GlcN - N-Acetylglukosamin, P - Phosphat.

Über die primäre Hydroxylgruppe der Position 6' ist das Lipid A mit dem ersten Zucker der folgenden Kernregion von LPS verbunden (Rietschel und Brade 1987). Diese wird wiederum in eine innere und eine äußere Region unterteilt. Die innere Kernregion besteht hauptsächlich aus 2-Keto-3-deoxyoctansäure (Kdo) und L-Glycero-D-manno-heptose (Hep), einem seltenen Zucker (van Amersfoort et al. 2003), während die äußere Kernregion eine größere Variabilität hat. Sie weist vor allem Hexosen, wie Glukose, Galaktose oder N-Acetylglukosamin auf und hat eine Verbindung zum O-Antigen. Dieses ist aus einer sich wiederholenden hydrophilen Oligosaccharidkette aufgebaut und variiert stark (Hahn 2009). Je länger die Polysaccharidkette ist, desto länger und komplizierter ist auch die Hydrolyse derselben. Wenn die Polysaccharidkette lang ist, so ist der Anteil an Lipid A gering. Ist die Kette jedoch nur kurz, z.B. bei LPS von Bakterien-Mutanten, so gibt es viele Lipid A-Produkte. In wässrigem Milieu bilden Lipopolysaccharide Mizellen. Allerdings ist LPS nur als Monomer immunogen wirksam (Takayama et al. 1994). Um als *Pathogen Associated Molecular Pattern* (PAMP) vom Immunsystem erkannt zu werden, wird LPS durch LBP aus den Mizellen herausgelöst und so einer Erkennung durch Rezeptoren zugänglich gemacht. Ist LPS noch an die äußere Bakterienmembran gebunden, so scheint es die gram-negativen Bakterien vor der Phagozytose und Lyse zu schützen. Des Weiteren trägt es zur Membranintegrität bei und schützt die Zelle so vor dem Einfluss von Gallensalzen und lipophilen Antibiotika (Mayer et al. 1985). Detoxifiziertes LPS entsteht

durch Veränderung der Molekülarchitektur und Entfernung von Fettsäuren des Lipid A oder anderen Teilstrukturen (Rietschel et al. 1994).

1.2.2 Zelluläre Wirkung von LPS

Niedrigdosiert ist LPS dem Organismus durchaus nützlich, so verursacht es zum Beispiel Immunstimulation und fördert die Resistenz gegenüber Infektionen und malignen Erkrankungen (Vogel und Hogan 1990). Das Endotoxin kommt auch in fakultativ pathogenen gramnegativen Bakterien vor, welche als Kommensalen die Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes und Respirationstraktes natürlich besiedeln (Munford 2008). Ein möglicher Übertritt des LPS der Bakterien durch die Zerstörung dieser Schleimhautbarriere mit nachfolgender Endotoxinämie ohne eigentliche Bakteriämie wird in der Literatur diskutiert (Behre und Hiddemann 1996). Die physiologische Detoxifizierung von LPS findet nach Drainage des digestiven Systems über die Pfortader in der Leber statt. Hierbei spielen die Kupffer-Zellen, welche als fixe hepatische Makrophagen in den Sinusoiden aktiv sind, eine entscheidende Rolle (Nolan 1981). Sie nehmen das Endotoxin über Pinozytose oder absorptive Endozytose auf (Wisse et al. 1996) und reagieren mit Bildung von Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Interleukin 1 (IL-1) und 6 (IL-6) sowie einer Rekrutierung von Monozyten (Pilaro und Laskin 1986). Durch die Aktivierung und Produktion dieser Zytokine wirkt LPS indirekt zytotoxisch und verursacht eine Inflammationsantwort. Wird dabei das Leberparenchym durch Apoptosen und Nekrosen geschädigt, so kann die hepatische Fähigkeit zur Detoxifikation und Metabolisierung beeinträchtigt werden (Nolan 1975). Daraufhin kann es zur Akkumulation von LPS kommen, wobei der Stoffwechsel übersättigt wird und es zum Übertritt der Endotoxine in den Blutkreislauf und somit zu einer Sepsis kommt.

Nicht nur die Kupffer-Zellen, sondern auch Monozyten setzen nach Stimulation Zytokine, wie TNF- α , IL-1 und IL-6 frei. Diese Zellaktivierung erfolgt über Bindung von LPS an den membrangebundenen CD14-Rezeptor. In Endothelzellen und glatten Muskelzellen funktioniert dieser Vorgang mit Hilfe des löslichen CD14-Rezeptors (Frey et al. 1992). Allerdings ist in beiden Fällen die Anwesenheit von LBP, dem Lipopolysaccharid-bindendem Protein (auch Septin genannt), notwendig, welches an das Lipid A bindet (Schumann et al. 1990, Tobias et al. 1995). Zusammen mit LPS bildet LBP einen hochaffinen Komplex, welcher von den CD14-Rezeptoren erkannt werden kann. Die Zellaktivierung durch LPS ist in Abbildung 4 dargestellt.

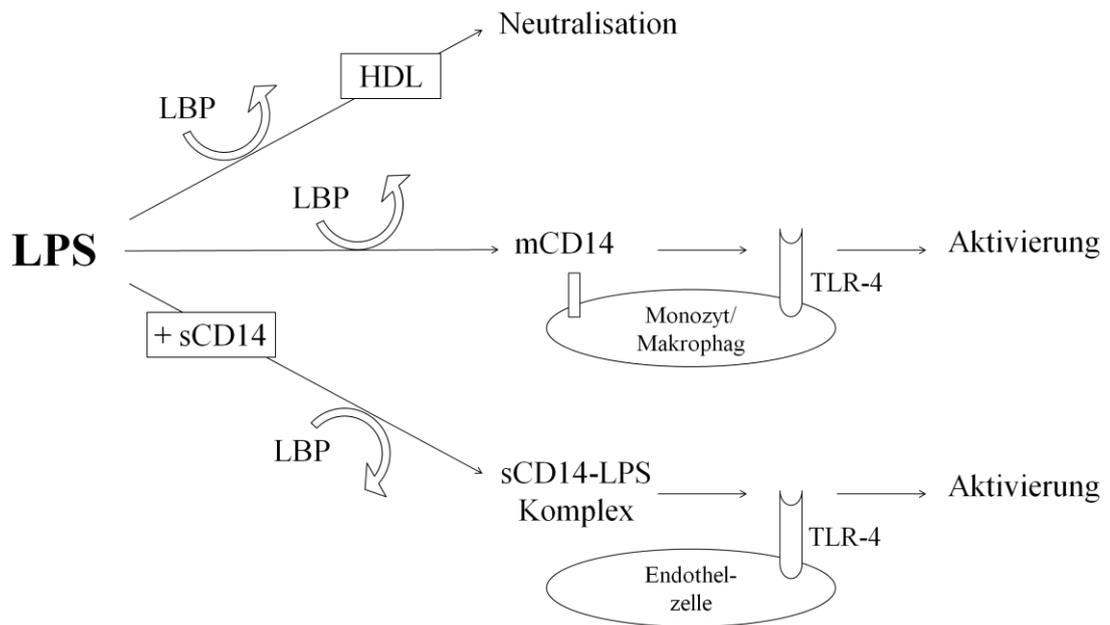


Abb. 4 Modell der Zellaktivierung durch LPS

Mögliche Wege der Zellaktivierung durch Lipopolysaccharide. Darstellung modifiziert nach Schletter et al. (1995). Abkürzungen: HDL - *high-density lipoprotein*, LBP - LPS-binding protein, mCD14 - membrangebundener CD14-Rezeptor, sCD14 - löslicher (soluble) CD14-Rezeptor, TLR-4 - Toll-like-Rezeptor.

Die zur Zellaktivierung nötige Bindung an TLR-4 erfolgt nur mit Hilfe des löslichen Proteins MD-2, welches an die extrazelluläre Domäne von TLR-4 bindet. Toll-like-Rezeptoren gehören zu den *Pattern-Recognition Receptors* (PRR) des angeborenen Immunsystems und sind spezialisiert auf die Erkennung von PAMPs, zu denen LPS gehört. Der CD14/TLR-4/MD-2 - Komplex vermittelt dann über die Aktivierung des Adapterproteins MyD88 die nachfolgende Signalkaskade Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase 4 (IRAK4) → IRAK1 → TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor 6 (TRAF6) → Inhibitory- κ B-Kinase-Komplex (IKK) und letzten Endes die Aktivierung von NF- κ B (van Amersfoort et al. 2003). Der Signaltransduktionsweg von LPS ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt.

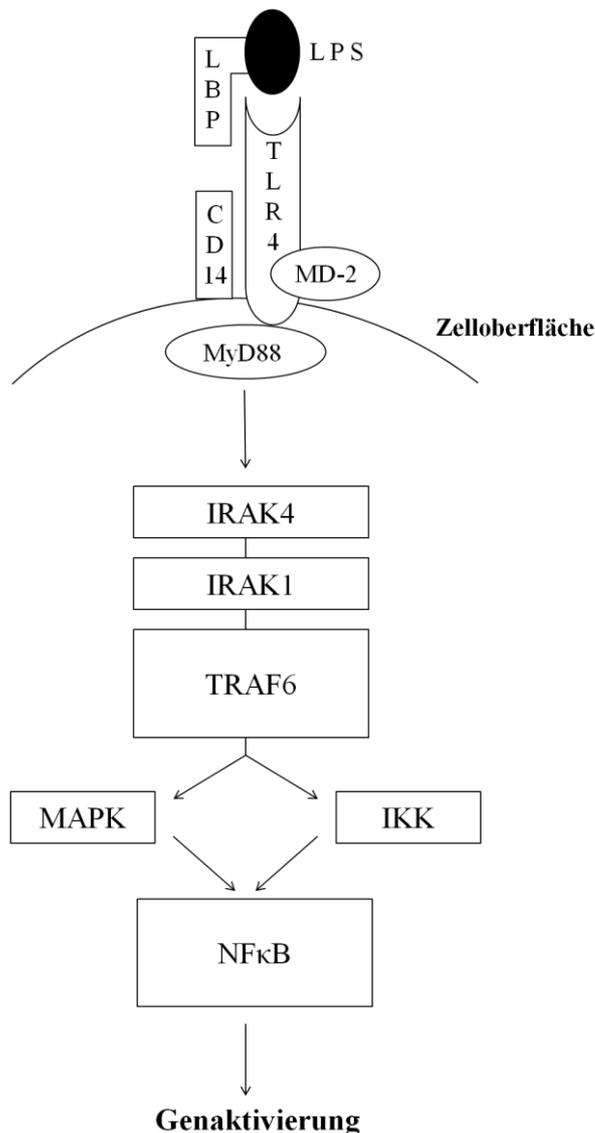


Abb. 5 Signaltransduktionsweg des LPS/LBP/CD14/MD-2/TLR4 - Komplexes
 Dargestellt ist die Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionswege in Endothelzellen, Makrophagen oder Monozyten durch LPS. Abbildung modifiziert nach Büttner (2005).
 Abkürzungen: LBP - LPS-binding protein, TLR-4 - Toll-like-Rezeptor, IRAK - Interleukin-Rezeptor-assoziierte Kinase, TRAF - TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor, MAPK - Mitogenaktivierte Proteinkinase, IKK - Inhibitory- κ B-Kinase-Komplex, NF κ B - *Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells*.

Der Transkriptionsfaktor wandert für die Genexpression von IL-1, IL-12 und TNF- α in den Zellkern und spielt eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des septischen Schocks (Liu und Malik 2006). Kommt LPS systemisch vor, so können schwere Krankheiten, wie der septische Schock ausgelöst werden.

Allerdings kommt es nicht in jedem Fall zu einer Zellaktivierung, da LBP auch die Bindung von LPS an HDL, das high-density Lipoprotein katalysiert (Wurfel et al. 1994). In diesem Fall wird LPS inaktiviert, da HDL, wie auch LDL, eine Neutralisation bewirkt (Flegel et al. 1993). Eine andere Möglichkeit der Inaktivierung des Endotoxins stellt die Reinigung des Blutes durch die Leber und Milz dar (Munford 2005, Shao et al. 2007). Hierbei sind Kupffer-Zellen der Leber und Makrophagen der Milz involviert (Vazquez-Torres et al. 2004, Cross et al. 1995).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass LPS als Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien eine Antwort des angeborenen Immunsystems auslöst (Medzhitov und Janeway 1997). Nach Erkennung der PAMPs durch PRRs kommt es zu einer Signalkaskade, infolge welcher es zu Phagozytose, Ausschüttung von Zytokinen, Opsonierung und auch Aktivierung der Gerinnungskaskade kommt (Janeway und Medzhitov 2002). Dazu werden Proteine gebildet, zu denen Zytokine, Adhäsionsproteine und Enzyme zählen, welche wiederum proinflammatorische Mediatoren bilden (Ulevitch und Tobias 1995). Zu den Mechanismen, welche zur Entstehung der Entzündungsreaktion beitragen, zählen die Aktivierung von Abwehrzellen, wie Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Endothelzellen durch den oben erklärten CD14/MD-2/TLR-4 - Komplex sowie die daraus folgenden Reaktionen (Aderem und Ulevitch 2000). Makrophagen und Endothelzellen setzen nach Triggerung Entzündungsmediatoren, wie TNF- α und IL-1, systemisch frei (Beutler und Cerami 1988, Dinarello 1991, Pugin et al. 1995). Diese Pyrogene verursachen wiederum durch Bindung an die Zytokinrezeptoren oder Toll-like-Rezeptoren der Endothelzellen der Blut-Hirnschranke die Aktivierung der Cyclooxygenase-2 (COX-2, auch Prostaglandinsynthase-2). Daraufhin wird Prostaglandin E₂ (PGE₂) synthetisiert, welches in die Region des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) im Hypothalamus gelangt und dort EP3-Rezeptoren aktiviert (Dinarello 2004). Durch eine Änderung der cAMP-Konzentration kommt es schließlich zu einer Sollwerterhöhung im Temperaturregulationszentrum der thermosensiblen Neuronen des Hypothalamus (Boulant 1998) und es kommt zur Ausbildung von Fieber. Eine Temperaturerhöhung über 40,5°C beim Schwein wird als Fieber und somit als deutliches Anzeichen einer Sepsis gewertet. Zu einer Sepsis kommt es aufgrund von übermäßiger Immunantwort auf den auslösenden Reiz. Sie ist gekennzeichnet durch das gemeinsame Auftreten des systemischen inflammatorischen Response-Syndroms (SIRS) mit der Diagnose einer Bakteriämie. Diese wird entweder klinisch oder mikrobiologisch durch den Nachweis der verursachenden Erreger in einer Blutkultur gestellt. Ein SIRS besteht, wenn zwei der folgenden Kriterien auftreten: Hyper- oder Hypothermie, Tachykardie, Tachypnoe und Leukozytose oder Leukopenie (Stehr et al. 2013).

1.2.3 Systemische Wirkung von LPS

Das Hausschwein ähnelt in seiner Organphysiologie und Stoffwechsel stark dem Menschen. Es wird daher häufig aufgrund seiner Anatomie und Eigenschaften als Tiermodell für Untersuchungen zur Sepsis genutzt (Miller und Ullrey 1987, Tumbleson und Schook 1996). Da LPS als Bestandteil der Bakterienmembran erst bei Lyse oder Zellteilung freigesetzt wird, wurde ein Zusammenhang der Endotoxämie mit dem Einsatz von zellwandaktiven Antibiotika vermutet. Diese Hypothese bestätigte sich im Versuch mit Schweinen, welche nach Induktion einer Sepsis durch *E. coli* Bakterien mit Gentamicin, einem Aminoglykosid, behandelt wurden (Rokke et al. 1988). Der Anteil an Endotoxin im Blut nahm signifikant zwei und vier Stunden nach antibiotischer Behandlung im Vergleich zu den Tieren ohne Antibiose zu. Die unterschiedliche Wirkung von *E. coli* Bakterien und deren Endotoxin ist durch Infusion derselben in einem Tierversuch mit 23 Schweinen untersucht worden (Schrauwen et al. 1988). Die Mortalität war in der Hochdosis-Endotoxingruppe sowie in der Gruppe, welcher *E. coli* Bakterien infundiert worden war, stark erhöht. Dagegen überlebten alle Tiere der niedrigdosierten LPS-Gruppe den Versuch. Auffällige Veränderungen der Hochdosis-Endotoxingruppe waren arterielle Hypotension, pulmonale Hypertension, abnehmende kardiale Auswurfraction und erhöhte Herzfrequenz nach Infusion von 2,5 mg LPS/kg KG i.v. im Sinne eines Endotoxinschocks. Bei der Autopsie wurden Blutungen, Lungenödeme und Aszites vorwiegend nach Infusion mit Hochdosis-LPS und *E. coli* gefunden. Die Autoren konnten daraus auf Schädigungen der Gefäße und den Integritätsverlust des Endothels durch LPS schließen. In einem anderen Schweineversuch wurden nach 24 Stunden Infusion mit 3 µg LPS/kg KG/h ebenfalls Anzeichen einer Sepsis deutlich (Bruins et al. 2002). Die Tiere zeigten eine erhöhte Herzfrequenz, Körpertemperatur und kardiale Auswurfraction sowie Hypotension und Laktatazidose im Sinne eines hyperdynamischen Sepsisstadiums. Des Weiteren zeigte sich eine erhöhte Produktion von Stickstoffmonoxid (NO), einem vasodilatativem Radikal, in den von der Leber drainierten Organen und auch der Leber selbst. Die Induktion der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) durch LPS konnte in humanen Hepatozyten *in vitro* durch Geller et al. (1993) gezeigt werden. Auch Pastor et al. (2000) berichteten nach Endotoxininfusion (160 ng/kg KG/h) über erhöhte Stickstoffwerte durch induzierte Expression von NOS in der Leber sowie in der *V. porta* und *V. cava inf.* bei Schweinen. Ebenfalls durch Matejovic und Kollegen (2001) konnte die Induktion der NOS nachgewiesen werden. Die Produktion von NO führt zu hämodynamischen Effekten wie erhöhte Gefäßpermeabilität, Vasodilatation und nachfolgender Hypotension, welche eine

Entstehung der Sepsis begünstigen (Kirkeboen und Strand 1999). Die Sepsis wurde definiert als eine Invasion von Mikroorganismen oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion (Bone 1989). Ein weiteres Merkmal der Sepsis ist die Produktion von Akute-Phase-Proteinen, wie Fibrinogen, Procalcitonin, C-reaktivem Protein (CRP), Pyrogenen und weiteren in der Leber. Unter Einfluss von LPS konnte bei Schweinen ein signifikanter Anstieg des Akute-Phase-Proteins CRP ($p < 0,01$), jedoch nicht von Haptoglobin und Amyloid A nachgewiesen werden (Williams et al. 2009). Außerdem konnte in diesem Versuch eine Reaktion der Leukozyten auf LPS mit einem Anstieg gezeigt werden, wobei hier anteilig die Neutrophilenzahl am stärksten stieg. Zudem zeigte sich für die Pyrogene TNF- α , IL-1 und IL-6 eine signifikante Erhöhung als Reaktion auf das Endotoxin. Nakajima et al. (1995) konnten die Produktion von TNF- α in Phagozyten der Leber, Lunge und Milz von Schweinen durch LPS-Infusion (200 $\mu\text{g/kg KG}$) nachweisen. Die Tiere zeigten nach der Schlachtung Blutungen, Ödeme und hämorrhagische Nekrosen mit Thrombosen in Nieren, Lunge, Leber und Milz. Die beschriebenen Veränderungen korrelierten mit dem Auftreten der disseminierten intravasalen Koagulation (DIC). Nach wiederholter LPS-Applikation konnte weiterhin eine Organinfiltration mit Leukozyten nachgewiesen werden.

Neben der Produktion von Zytokinen stimuliert Lipid A ebenfalls die Bildung von Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) (Doebber et al. 1985) und die Produktion von Thromboplastin (TF, tissue factor) in Monozyten und Endothelzellen (Drake et al. 1993, Li et al. 1996). Die produzierten Gerinnungsfaktoren und Mediatoren können kleine Blutgefäße schädigen, zur überschießenden Gerinnung und disseminierten intravasalen Koagulation führen (Dauphinee und Karsan 2006). Des Weiteren kommt es zu einer durch Apoptose der Endothelzellen entstehenden erhöhten Membranpermeabilität mit nachfolgender Blutungsneigung (Frey und Finlay 1998, Cybulsky et al. 1988). Diese Faktoren können Multiorganversagen verursachen und tragen zur Entstehung einer Sepsis bei (Esmon 2000). Weitere Sepsiszeichen, wie Blutungen, Nekrosen, Abszesse und Anstieg der leberspezifischen Laborparameter, ausgelöst durch LPS, wurden von Martens et al. (2007), Leifsson et al. (2010) und Saetre et al. (2001) am Schwein beschrieben.

1.3 Die Leber

1.3.1 Makroskopie der Leber

Die Leber ist die größte Drüse des Organismus. Sie liegt rechtsseitig im oberen Abdomen und wird kranial durch das Diaphragma begrenzt. Frontal wird die Leber durch die Rippen geschützt. Dorsal liegen ihr die Gallenblase, rechte Niere und Nebenniere sowie der Magen an.

Ihre Aufgaben reichen vom Metabolismus der Kohlenhydrate, Lipide und Proteine über Galleproduktion und Entgiftung bis hin zur Speicherung von Glykogen, Vitaminen und Spurenelementen. Diese Funktionen werden von den Hepatozyten wahrgenommen.

Sie sind mikroskopisch in Leberläppchen (*Lobuli hepatici*) organisiert, welche wiederum die makroskopisch sichtbaren Leberlappen (*Lobi hepatici*) bilden. Die Leberanatomie des Menschen ähnelt der des Schweines stark. Die Unterteilung der Leberlappen erfolgt durch Bindegewebsstränge in *Lobus dexter lateralis* und *medialis*, *Lobus sinister lateralis* und *medialis*, *Lobus quadratus* und *Lobus caudatus*, welcher beim Schwein als *Processus caudatus* vorkommt. Die Bindegewebsstränge setzen sich bis ins Leberinnere fort, wo sie als interlobuläres Bindegewebe das Parenchym in Leberläppchen unterteilen und Äste der *Vena porta*, *Arteria hepatica* und des *Ductus biliferus* enthalten. Diese unterteilen sich wiederum in die *Vasa lobares*, *Vasa interlobares* und schließlich die *Vasa interlobulares*, welche jeweils von Bindegewebssträngen begleitet werden. Diese bindegewebige Unterteilung ist charakteristischer Weise beim Schwein viel stärker ausgeprägt als in der menschlichen Leber und ermöglicht daher eine leichtere mikroskopische Unterteilung der Leberläppchen. Neben den erwähnten Strukturen sind als ausführende Strukturen der Leber die *Venae hepaticae*, welche in die *Vena cava inferior* münden, zu nennen.

1.3.2 Mikroskopie der Leber

Die kleinste anatomische Einheit der Leber ist das sogenannte klassische Leberläppchen. Es ist mikroskopisch an seiner hexagonalen Form zu erkennen und beinhaltet neben den Hepatozyten die Zentralvene. Bevor das Blut über die Zentralvene drainiert wird, fließt es durch die Sinusoide, welche von den Hepatozytenleisten begrenzt werden. Die Sinusoide wiederum führen Blut aus der *Vena* und *Arteria interlobularis*. Der gemeinsame Abschnitt von *Vena interlobularis*, *Arteria interlobularis* und des *Ductus biliferus interlobularis* wird als *Trias hepatica* oder auch Portalfeld bezeichnet und bildet zusammen mit dem umgebenden Bindegewebe ein Periportalfeld. Das Parenchym um ein Periportalfeld, begrenzt durch die drei nächstgelegenen Zentralvenen, bildet ein Dreieck - das

Portalläppchen. Eine weitere mikroskopische Einteilung ist die des Azinus. Der Azinus wird begrenzt durch die *Venae centrales* zweier angrenzender Leberläppchen sowie der beiden dazwischenliegenden Portalfelder. Der Aufbau des Leberläppchens ist schematisch in Abbildung 6 dargestellt.

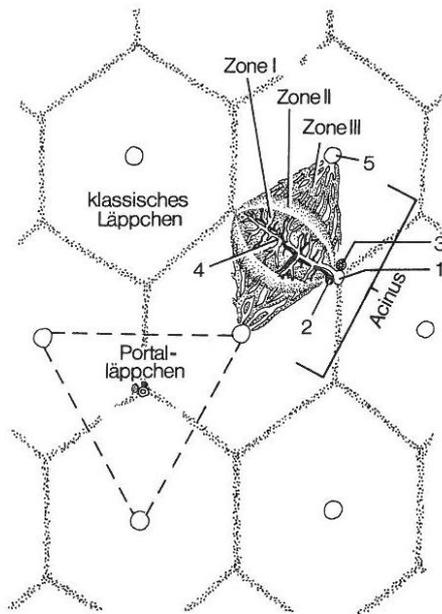


Abb. 6 Schema zur Leberhistologie

Abbildung entnommen aus Mosimann et al. (1990).

- 1 - Vena interlobularis,
- 2 - Arteria interlobularis,
- 3 - Ductus interlobularis bilifer,
- 4 - terminale Blutgefäße,
- 5 - Vena centralis

Diese Einteilung ermöglicht eine Unterscheidung des Parenchyms in Abhängigkeit von der Entfernung zur Intermediärzone zwischen den Periportalfeldern. Die Zonen werden in Richtung des abnehmenden Sauerstoffdruckes nummeriert. So enthält die Azinuszone I als *Zona peripherica* des Leberläppchens den höchsten Sauerstoffgehalt. Dieser nimmt über Azinuszone II, auch *Zona intermedia*, bis hin zur Azinuszone III, *Zona centralis*, weiter ab. Je näher die Hepatozyten zur *Vena centralis* liegen, desto weniger Sauerstoff ist im Blut gelöst. Die Zellen der Zone I stellen gleichzeitig die Wachstumszone der Hepatozyten dar. Die neu entstandenen Zellen aus der Proliferationszone verdrängen die älteren Hepatozyten in Richtung Zone III. Es herrscht ein dauernder Wachstumsschub mit einem Gradienten zur Zentralvene. Kommt es zu einem akuten Schadensereignis, so werden zuerst die Hepatozyten geschädigt, welche als nächstes am Blutstrom sitzen. Im Falle der Sepsis oder einer akuten Alkoholintoxikation wären dies die Hepatozyten der Zone I.

1.3.3 Funktion der Leber im Stoffwechsel

Neben dem eigenen Energiehaushalt stellt die Leber einen großen Anteil an Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden für den gesamten Organismus her. Es findet neben der Neubildung von Glucose durch die Gluconeogenese ebenfalls die Speicherung in Form von Glykogen in der Leber statt. Einen Speicher stellt die Leber auch für Aminosäuren, Lipide und die Vitamine A, B₁₂, D, E und K dar. Die Synthese von Proteinen kann dann aus den Aminosäuren erfolgen. Mit der Bestimmung des Gesamtproteins im Serum kann man die Syntheseleistung der Leber abschätzen. Als Gesamtprotein werden alle im Plasma enthaltenen Proteine bezeichnet. Diese werden wiederum in fünf Fraktionen unterteilt. So gehören neben dem Albumin, den α 1- und α 2-Globulinen auch die β - und γ -Globuline zum Gesamtprotein des Plasmas. Mithilfe einer Elektrophorese können diese Fraktionen genauer bestimmt werden. Weiterhin zählen auch die Blutgerinnungsfaktoren und die Komponenten des Komplementsystems zum Gesamtprotein. Eine Erhöhung der Gesamtproteinkonzentration liegt häufig nach Dehydratation oder übermäßiger Produktion vor. Zu einer Verminderung der Gesamtproteinkonzentration kommt es durch Einschränkung der Synthese beispielsweise bei chronischer Lebererkrankung oder Antikörpermangelsyndrom. Weiterhin kann der erhöhte Verlust von Plasmaproteinen ursächlich für eine reduzierte Gesamtproteinkonzentration sein, wie er zum Beispiel beim nephrotischen Syndrom, nach Verbrennungen oder bei Tumoren auftritt.

Die Leber bildet aus den Proteinen unter anderem Enzyme, Gerinnungsfaktoren, Antikörper und Albumin. Das Plasmaprotein Albumin wird ausschließlich in der Leber produziert und stellt aus diesem Grund einen Maßstab für die hepatische Syntheseleistung dar. Albumin ist zwar mit 66 kDa das kleinste Plasma-Eiweiß, macht aber mit 60% den größten Anteil der Proteinmenge im Plasma aus. Seine Funktion besteht vor allem mit seiner kolloidosmotischen Aktivität in der Aufrechterhaltung des intra- und extravasalen Gleichgewichtes. Denn würde das Blutplasma kein Albumin enthalten, so käme es zum Flüssigkeitsverlust nach extravasal aufgrund der Gefäßpermeabilität und so zur Entwicklung von interstitiellen Ödemen. Eine weitere Funktion stellt der Transport von Aminosäuren, unkonjugiertem Bilirubin, Thyroxin und Kalzium dar. Zu einer Hyperalbuminämie kommt es hauptsächlich bei Dehydratation. Eine Hypoalbuminämie kommt neben einer Leberschädigung auch beim nephrotischen Syndrom und Malabsorption vor.

Ein weiteres im Blut vorkommendes Produkt der Leber ist das Cholesterin. Es ist unter anderem zur Bildung der Gallenflüssigkeit erforderlich. Hierfür wird zusätzlich die

Gallensäure als ein weiteres hepatisches Produkt benötigt. Nach Speicherung in der Gallenblase trägt die Galle anschließend zur intestinalen Verdauung bei. Auch Bilirubin ist in dieser Gallenflüssigkeit enthalten. Es entsteht nach Lyse der Erythrozyten durch Abbau von Hämoglobin in der Leber, der Milz und im Knochenmark. Zunächst wird dieses indirekte (Syn.: unkonjugierte) und lipophile Bilirubin zum Transport an Albumin gebunden. In der Leber wird es dann durch die Konjugation an Glucuronsäure in das hydrophile, direkte (Syn.: konjugierte) Bilirubin umgewandelt. Hierzu ist die Anwesenheit des Enzyms UDP-Glucuronosyltransferase notwendig. Anschließend kann die Ausscheidung über die Gallenflüssigkeit in den Darm erfolgen. Ist dieser Abfluss aber beispielsweise durch Entzündung, Tumor oder ein Gallengangskonkrement gestört, so kommt es zum Rückstau der Gallenflüssigkeit und schließlich zum Übertritt in das Blut mit messbarer Bilirubinerhöhung. Die Bestimmung des Gesamtbilirubins beinhaltet sowohl das unkonjugierte, als auch das konjugierte Bilirubin. Neben der Cholestase, welche eine Ursache des posthepatischen Ikterus darstellt, können auch prä- oder intrahepatische Prozesse eine Erhöhung des Bilirubinspiegels verursachen. Kommt es zur Hämolyse ist hauptsächlich der Anteil an direktem Bilirubin im Blut erhöht und es resultiert ein prähepatischer Ikterus. Als Ursachen für einen intrahepatischen Bilirubinanstieg sind neben Stoffwechseldefekten auch chronische Leberschädigung und Leberzirrhose durch Medikamente oder Alkoholintoxikation zu nennen. Hierbei ist häufig eine gleichzeitige Erhöhung von direktem und indirektem Bilirubin zu beobachten. Es werden neben dem Ab- und Umbau von Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden mit Hilfe von Cytochrom P 450 viele Medikamente verstoffwechselt. Die Verstoffwechslung eines weiteren Toxins, des Alkohols, findet ebenfalls in der Leber statt, wird aber durch das Enzym Alkoholdehydrogenase gewährleistet. Die Funktion der Entgiftung erfüllt die Leber auch für den Umbau von Ammoniak zu Harnstoff. Ammoniak selbst wirkt schädlich und kann das hepatozerebrale Syndrom mit Erbrechen, Somnolenz und Koma bis hin zum Tod auslösen. Die Leber verhindert dies in der Regel durch Neutralisation, also die Umwandlung in unschädlichen Harnstoff. Ist die Leberfunktion eingeschränkt, kann es zu einem Überschuss von Ammoniak im Blut kommen. Weiterhin wären eine Hypoalbuminämie und fehlende Produktion von Gerinnungsfaktoren die Folge. Laborchemisch fallen ein Abfall der Cholinesterase, als ein typischer Marker für die Lebersyntheseleistung, als auch ein Anstieg weiterer leberspezifischer Enzyme auf. Zu diesen gehören neben der Aspartat-Aminotransferase (ASAT, Syn.: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase [GOT]) und der Alanin-Aminotransferase (ALAT, Syn.: Glutamat-Pyruvat-Transaminase [GPT]) auch die Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) und

die γ -Glutamyl-Transferase (GGT). Eine Erhöhung derselben kann Folge einer Cholestase sein. Hierbei wird durch einen Rückstau der Galle das Leberparenchym geschädigt. Allerdings treten bei der Cholestase ebenfalls eine Erhöhung von Bilirubin und der Alkalischen Phosphatase (AP) im Serum auf. Die AP ist jedoch nicht leberspezifisch, da sie auch in Geweben, wie dem Knochen, der Niere und dem Dünndarm vorkommt. Deshalb kann sie auch bei Tumoren ohne jegliche Leberbeteiligung erhöht sein. Auch eine Erhöhung der ASAT ist nicht leberspezifisch, da das Enzym auch in Skelettmuskeln und der Herzmuskulatur vorkommt. Die ASAT katalysiert die Reaktion von Aspartat mit α -Ketoglutarat zu Oxalacetat und Glutamat. Sie ist zu 20% im Zytoplasma und zu 80% in den Mitochondrien der Hepatozyten lokalisiert. Eine Erhöhung tritt daher vor allem bei starker Leberzellschädigung auf. Die unregelmäßige Verteilung der Transaminasen, welche hauptsächlich in periportalen Hepatozyten lokalisiert sind, und auch die lange Halbwertszeit (circa 48h) der Enzyme erschweren allerdings die Interpretation eines akuten Leberzellschadens (Rappaport 1980). Mit einem Enzymanstieg ist aber eher bei der ASAT zu rechnen, da die ALAT nur zu einem geringen Anteil im Leberparenchym des Schweins vorkommt (Cornelius 1989). Die GLDH kommt hauptsächlich mitochondrial vor und wird daher erst bei schwerer Leberschädigung in das Blut freigesetzt. Das Enzym wird als Oxidoreduktase für die Reaktion von Glutamat mit Wasser und NADP^+ zu α -Ketoglutarat und Ammonium sowie NADPH benötigt. Es trägt somit zur Fixierung von Stickstoff und später Neutralisierung von Ammoniak zu Harnstoff bei. Das Enzym ist zwar leberspezifisch, kommt aber auch im Gehirn vor. Eine Erhöhung der GLDH tritt vor allem bei Lebernekrosen, Hepatitiden und im Rahmen einer Stauungsleber auf. Ein sehr sensibler Parameter für Erkrankungen der Gallengänge ist die GGT. Sie katalysiert die Abspaltung von Glutamat von Glutathion und die Übertragung des γ -Glutamyl-Restes auf andere Aminosäuren. Das Enzym kommt in Zellen des Gehirns, der Nieren und in Leberzellen sowie Gallengangszellen vor. Weil die GGT membrangebunden ist, wird sie schon früh und bei leichter Schädigung freigesetzt. Die Freisetzung und somit auch Messbarkeit im Blut erfolgt proportional zur Gewebsschädigung. Eine Erhöhung der GGT kommt vor allem bei Cholestase und nach toxischer Alkoholeinwirkung vor.

1.4 Effekt von DON und LPS auf die Leber

1.4.1 DON-Wirkung auf die Leber beim Schwein

Histologische Schäden verursacht durch DON an der Schweineleber wurden nach sechswöchiger Fütterung mit 1 mg/kg DON und 250 µg/kg Zearalenon (ZON) in Form von Verdickung und Dilatation der hepatischen Blutgefäße beschrieben (Cheng et al. 2006, Chen et al. 2008). Es wurde vermutet, dass solche Veränderungen aufgrund der Regenerationsfähigkeit der Leber zuvor noch nicht beobachtet werden konnten. In beiden Tierversuchen konnte eine signifikante Abnahme von Gesamtprotein, Albumin und Serumglobulin beobachtet werden. Dieser Effekt beruhte wahrscheinlich auf einer durch die Toxine ausgelösten Synthesehemmung. Rotter et al. (1994) vermuteten einen direkten Einfluss von DON auf die Globulinsynthese in der Leber und somit eine Beeinträchtigung der Immunantwort. Eine andere Hypothese ist die durch Induktion einer Aminoazidämie ausgelöste Hemmung der hepatischen Proteinsynthese durch Trichothecene (Meloche und Smith 1995). Allerdings wird diese Laborwertveränderung auch in Folge von verminderter Futteraufnahme durch DON diskutiert (Bergsjö et al. 1993).

Eine hepatotoxische Wirkung ausgehend von DON und ZON wurde aus beiden Fütterungsstudien aufgrund des Anstiegs der Enzymaktivität von ASAT, ALAT und GGT im Vergleich zur Kontrollgruppe geschlossen (Cheng et al. 2006, Chen et al. 2008).

Eine alleinige schädigende Wirkung von DON bezogen auf die Leber konnten Goyarts et al. (2007) und Tiemann et al. (2008) allerdings *in vivo* für das Schwein nicht nachweisen. Es konnte nur ein geringer Einfluss von DON auf Leberenzyme gezeigt werden, obwohl eine Induktion von Akute-Phase-Proteinen und proinflammatorischen Zytokinen zu beobachten war (Dänicke et al. 2004b, 2006).

Für die vermutete durch DON verursachte porcine Hepatozytenapoptose konnte *in vitro* die Aktivierung von Caspase-3 als Ursache benannt werden (Mikami et al. 2004). In dem Versuch zeigte sich in der primären Hepatozytenzellkultur nach 24-stündiger Zugabe von 100, 10 oder 1 µg DON/ml an einzelnen Zellen Zeichen des Zelltodes. Weiterhin war eine signifikante Abnahme der Albuminsekretion in diesen Kulturen verglichen mit der Kontrolle zu beobachten. Der Nachweis von apoptotischen Läsionen in der Schweineleber durch DON gelang später auch *in vivo* (Mikami et al. 2010). Im entsprechenden Versuch wurden einen Monat alte Schweine mit 1 mg DON/kg KG infundiert und drei bzw. 24 Stunden später geschlachtet. In der histologischen Untersuchung zeigten sich dilatierte Sinusoide, apoptotische Hepatozyten und periazinäre Degenerationen bis hin zu Nekrosen.

Bereits bei geringeren Dosen scheint DON Leberschäden hervorzurufen. Bei 0,2 mg DON/kg KG wurden schon parenchymatöse Degenerationen der Hepatozyten im Leberläppchenzentrum beschrieben (Zielonka et al. 2009). Stärkere Veränderungen wurden in der gleichen Studie bei Fütterung mit 0,4 mg DON/kg KG in Form von Einzelzellnekrosen und Hyperämie in den intertrabekulären Blutgefäßen beobachtet. Hierbei wird eine Zunahme der Läsionen proportional zur Toxindosis postuliert.

Eine Akkumulation von DON in der Gallenflüssigkeit nach ist Döll et al. (2003) nicht möglich, da es kein Bestandteil des enterohepatischen Zyklus ist.

Eine Abnahme der Serumaktivität von GLDH nach Fütterung mit DON (4,42 mg/kg Futter) und ZON (0,048 mg/kg Futter) wurde von Goyarts et al. (2007) bei Sauen beschrieben. Schon Döll et al. (2003) konnten die geringere Enzymaktivität in einem Fütterungsversuch mit kontaminiertem Mais (8,6 mg DON und 1,2 mg ZON/kg Mais) nachweisen. Dieser Effekt wurde auf eine verstärkte Diffusionsbarriere, beispielsweise durch Leberfibrose aufgrund von chronischer Toxinexposition, zurückgeführt. Im gleichen Versuch zeigte sich keine veränderte Enzymaktivität der GGT, jedoch nahm die Serumproteinkonzentration in der Gruppe mit dem höchsten Toxinanteil (50%) signifikant ab. Diese Ergebnisse wurden auf eine Veränderung in der Synthese und Verteilung der Parameter oder des Blutvolumens zurückgeführt.

1.4.2 LPS-Wirkung auf die Leber beim Schwein

Die durch Endotoxinämie ausgelöste Sepsis umfasst Symptome wie Hypotension, Oligurie, Hypoxämie, erhöhte Laktatproduktion und Encephalopathie. Die freigesetzten Entzündungsmediatoren, wie TNF- α , IL-1 und IL-6, lösen durch Vasodilatation, Endothelschädigung und erhöhter Durchlässigkeit in den Kapillaren das *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) aus. In der Folge kommt es zur intestitiellen Flüssigkeitsansammlung, was zu relativer Hypovolämie, Umverteilung des Blutflusses und Unterversorgung von Organen führt, woraus wiederum das *Multi Organ Dysfunction Syndrome* (MODS) resultieren kann.

Zwar gibt es in der Literatur viele Untersuchungen zur Wirkung einer Endotoxinämie und somit auch zur Wirkung von LPS allgemein auf das Schwein, aber auf die Leber und ihre Histologie bezogen wird der Datenumfang und somit der Kenntnisstand geringer. Bisher wurde in septischen Organen das Vorkommen von interzellulären Ödemen, Störung der Mitochondrienfunktion und Zellnekrosen beschrieben (Hersch et al. 1990). Im gleichen Tierversuch zeigte sich in der Leber eine Akkumulation von Neutrophilen in den Mikrogefäßen sowie eine Bilirubinerhöhung und Serumgesamtproteinabnahme. Als

Ursache für die Schädigung des Leberparenchyms wird ein Blutstau durch Fibrinogenvermehrung in den Sinusoiden angenommen (Martens et al. 2007). Fibrinogen ist für die Bildung von Fibrin notwendig, welches wiederum als Netzwerk die Grundlage für die Kollagenbildung darstellt. Die Kollagenvermehrung resultiert dann in einer funktionellen Obstruktion der Lebergefäße und Minderperfusion. Eine Reduktion des arteriellen und venösen Blutflusses konnte am Schweinmodell bereits nach einer sechsstündigen Infusion mit 1,7 µg LPS/kg/h nachgewiesen werden (Saetre et al. 2001). Histologisch wurden nach einstündiger Infusion bereits eine Dilatation der Sinusoide sowie Ödem und Infiltration von Leukozyten und Erythrozyten beschrieben. Nach drei Stunden zeigten sich schwere Hepatozyten- und Endothelschäden sowie mit Fibrin durchzogene Thrombi. Großflächigere Veränderungen und nekrotische Areale traten zusätzlich nach sechsstündiger Infusion auf. Die Untersuchung der Leberenzyme erbrachte keine Signifikanzen für ALAT, GGT oder Bilirubin. Allerdings konnte eine signifikante Erhöhung der Enzymaktivität von ASAT nach vier und sechs Stunden im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Alle beobachteten Leberschäden wurden auf die direkte LPS-Wirkung und die verursachte Hypoxie zurückgeführt. In einer anderen Studie konnten neben einer ASAT-Erhöhung auch ein Anstieg der Bilirubinkonzentration im Blut aufgezeigt werden (Leifsson et al. 2010). Diese traten jeweils 24 und 36 Stunden nach Infusion mit Bakterienlösung (10^8 *Staphylococcus aureus*/kg KG) auf. Allerdings konnte keine Veränderung für ALAT, Albumin und Gesamtprotein beobachtet werden. Histologisch waren bei zwei Tieren Mikroabszesse in der Leber zu sehen und bei einem Schwein ein Areal mit zentrilobulären Nekrosen und venöser Thrombose. Nach 48 Stunden konnten weiterhin verschieden stark ausgeprägte Fibrinexsudationen im Leberparenchym beobachtet werden. Diese Leberschäden wurden durch die induzierte Sepsis und die ausgelöste Hyperkoagulabilität begründet. Dabei spiegelte die Laborwertveränderung die Hepatozytenschädigung wider.

1.4.3 Effekt der Kombination von DON und LPS beim Schwein

In der Literatur wird eine Potenzierung der Wirkung durch gleichzeitige Gabe zweier Toxine diskutiert. Islam und Pestka (2006) konnten eine verstärkte Zytokinproduktion in der Leber von Mäusen durch Gabe von LPS und DON induzieren. Sie injizierten LPS (1 mg/kg KG i.p.) intraperitoneal an Mäusen und fütterten diese anschließend mit DON (12,5 mg/kg KG p.o.). Es konnte eine erhöhte DON-Empfindlichkeit durch vorherige Sensibilisierung mit LPS *in vivo* nachgewiesen werden und es kam dadurch zu einer erhöhten Zytokin-Expression (Islam und Pestka 2006). Eine weitere Untersuchung der

Inflammationsantwort in Hepatozyten *in vitro* ergab eine erhöhte Zytokinausschüttung nach Sensibilisierung durch DON (500 oder 2000 nmol/l) und LPS (Döll et al. 2009a, 2009b). Die beiden Toxine zeigten eine synergistische Wirkung auf die mRNA-Expression in den primären porcinen hepatischen Zellkulturen und bewirkten eine erhöhte Produktion von TNF- α .

Auch wenn es sonst kaum spezielle Literatur zum gemeinsamen Verhalten von DON und LPS gibt, so wurde doch bereits ein potenzierender Effekt von Mykotoxinen nachgewiesen. Es konnten Synergien zwischen DON und Fumonisin B1 gefunden werden (Harvey et al. 1996) sowie von Interaktionen zwischen DON und Fusarinsäure (Smith et al. 1997). Aber auch von einer verstärkten toxischen DON-Wirkung durch LPS auf das Immunsystem von Mäusen wurde berichtet (Zhou et al. 1999). Weitere synergistische Wirkungen wurden für das Trichothecen T-2 Toxin und LPS durch Taylor et al. (1991) sowie durch Tai und Pestka (1988) in Mäusen beschrieben. Taylor et al. (1991) beobachteten dabei eine erhöhte Mortalität, verstärkte Hypothermie und erhöhte Konzentrationen von TNF- α (bis zu 380%) in den Versuchstieren. Außerdem kam es zu einer Erhöhung der Spitzenwerte des Endotoxins bei kombinierter Gabe von T-2 Toxin, worauf die resultierenden Veränderungen zurückzuführen waren. Ein synergistischer Effekt wurde ebenfalls von Tai und Pestka (1988) in Endotoxin-empfindlichen C3H/HeN-Mäusen beobachtet, wobei es auch hier zu einer erhöhten Mortalität und Schäden an Leber und Milz der Mäuse bei gleichzeitiger Exposition von DON und dem T-2 Toxin kam.

Generell können verstärkende Effekte durch andere Toxine wie konjugierte Mykotoxine, unbekannte oder gebundene Toxine anderen Ursprungs gleichzeitig auftreten und eine synergistische Wirkung verursachen (Lauber et al. 2001).

1.5 Hypothese

Da es in der bisherigen Literatur kaum Untersuchungen zum Verhalten des porcinen hepatischen Gewebes unter Einfluss von DON *in vivo* gab, wurde ein Modell entworfen, um die vermuteten Interaktionen zwischen dem Mykotoxin und dem Endotoxin LPS weiter zu untersuchen. Aufgrund der Ergebnisse von Diesing et al. (2011a, b), welche herausfanden, dass die Dauer und auch die Applikationsrichtung der DON-Exposition eine entscheidende Rolle in der Pathogenese *in vitro* spielt, wurde das Toxin oral und auch intravenös verabreicht. Weiterhin wird eine Störung der Integrität der Darmschleimhaut durch DON vermutet (Pestka 2010a) sowie eine daraus resultierende systemische Wirkung des Mykotoxins. Daher könnte auch eine Translokation von *E. coli* LPS aus Kommensalen nach der gastrointestinalen Epithelschädigung auftreten, woraufhin die Leber als erste Station von der Bakteriämie betroffen wäre. Die Leber spielt eine entscheidende Rolle in der Metabolisierung von DON und LPS, weshalb eine morphologische und funktionelle Untersuchung derselben nahe lag. Ein potenzierender Effekt bei kombinierter Gabe von DON und LPS wurde bereits *in vitro* in porcinen Hepatozyten vermutet (Döll et al. 2009a, 2009b).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen interaktiven Effekt von DON und LPS auf die Leberhistologie und -funktion *in vivo* zu prüfen. Zur genaueren Untersuchung dieses Zusammenhangs wurde das Schwein als Tiermodell und DON-sensibelste Spezies sowie verschiedene Applikationsrouten der Toxine genutzt. Ein weiteres Ziel war die Entwicklung eines Index zur Vergleichbarkeit der histologischen Beobachtungen.

2 Material und Methoden

2.1 Ethische Grundlagen

Grundlage für alle durchgeführten Tierversuche in Deutschland stellt das deutsche Tierschutzgesetz vom 18. Mai 2006 (BGBl. I, S. 1206-1313) dar. Die Genehmigung erfolgte durch das Regierungspräsidium Braunschweig (Genehmigungsnummer: 33.14-42502-04-037/08) und basiert auf der Europäischen Richtlinie für Tierversuche von 1986 (EU Directive 86/609/EEC).

2.2 Versuchstiere und -futter

Für den vorliegenden Versuch wurden 48 männliche, kastrierte Hybridschweine einer Zweirassenkreuzung (Deutsche Landrasse x Piétrain) mit einem durchschnittlichen Körpergewicht (KG) von $26,4 \pm 4,0$ kg verwendet. Alle Tiere entstammten der Zuchtanlage des Instituts für Nutztiergenetik Mariensee des Friedrich-Loeffler-Instituts (Hölystraße 10, 31535 Neustadt). Die Haltung und Durchführung des Experiments erfolgte am Institut für Tierernährung des Bundesforschungsinstituts für Tiergesundheit des Friedrich-Loeffler-Instituts (FLI) Braunschweig (Prof. Dr. med. vet. Dr. agr. habil. Sven Dänicke).

Tab. 3 Futterzusammensetzung

Futterkomponenten [g/kg]	Kontrollfutter	DON-Futter
Gerste	569	569
Weizen (unkontaminiert)	190	0
Weizen (kontaminiert)	0	190
Sojaextraktionsschrot	180	180
Sojaöl	30	30
Dicalciumphosphat	3,5	3,5
L-Lysin-HCl	2,5	2,5
Premix ¹	25	25

¹Enthält pro kg Premix: Ca 245g, P 60g, Na 55g, Mg 10g, Fe 4.000mg, Cu 1.000mg, Mn 2.000mg, Zn 4.000mg, I 50mg, Se 15mg, Co 20mg, Vitamin A 400.000IU, Vitamin D₃ 40.000IU, Vitamin E 1.200mg, Vitamin B₁ 100mg, Vitamin B₆ 100mg, Vitamin B₁₂ 750mg, Vitamin K₃ 52,5mg, Nikotinsäure 500mg, Pantothensäure 5.000mg, Cholinchlorid 5.000mg.

Die Tiere wurden restriktiv mit 500 g Futter zweimal täglich gefüttert und hatten *ad libitum* Zugang zu Wasser über den gesamten Versuchszeitraum. Das Futter wurde gemäß den Empfehlungen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE 2006) zusammengestellt. Um das Versuchsfutter herzustellen, wurde der Weizen durch eine Charge, welche natürlicherweise mit DON kontaminiert war, ersetzt, so dass eine Konzentration von 3,1 mg DON/kg Futter im Versuchsfutter erreicht wurde. Die Zusammensetzung des Kontrollfutters sowie des DON-kontaminierten Futters ist aus Tabelle 2 ersichtlich. Zur Analyse der Futtermischung wurden verschiedene Verfahren angewandt (siehe Anlage 7.1).

2.2 Versuchsaufbau

Das Experiment wurde über 37 Tage durchgeführt und beinhaltete ein Futter-Regime und ein Infusions-Regime. Innerhalb des Futter-Regimes erhielten 25 Schweine Kontrollfutter (KON) und 14 Tiere das DON-kontaminierte Futter (DON) über den gesamten Versuchszeitraum. Das Körpergewicht wurde am Tag 1, Tag 27 und nochmalig am Tag 37 bestimmt. Die Haltung der Tiere erfolgte für 27 Tage in Laufställen in der Gruppenhaltung und anschließend kam es zur Verteilung auf einzelne Stoffwechsellkäfige. Am 35. Tag wurden allen Schweinen in einer Operation (siehe Anlage 7.3) beidseits Jugularvenenkatheter angelegt. Dadurch konnte in lokaler Trennung die Applikation der Versuchssubstanzen und Entnahme der Blutproben erfolgen. Nach zwei Tagen Rekonvaleszenz erhielten die Tiere, welche mit Kontrollfutter gefüttert worden waren, eine 60-minütige Infusion mit entweder 0,9% NaCl, 100 µg DON/kg KG (D 0156, Sigma-Aldrich), 7,5 µg LPS/kg KG (*Escherichia coli* O111:B4, Sigma-Aldrich) oder einer Kombination von DON und LPS in gleicher Konzentration. Schweine, die mit dem DON-kontaminierten Futter gefüttert worden waren, erhielten eine 60-minütige Infusion mit 0,9% NaCl oder 7,5 µg LPS/kg KG. Die verwendeten Lösungen wurden anhand der Protokolle im Anhang (siehe Anlage 7.2) hergestellt. Durch das am 37. Tag gestartete Infusions-Regime konnten die Tiere in sechs Versuchsgruppen eingeteilt werden: KON_KON, KON_DON, KON_LPS, KON_DON/LPS, DON_KON, DON_LPS, wobei die erste Abkürzung für das Futter-Regime und die zweite für das Infusions-Regime steht. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 7 dargestellt. Die Blutentnahme fand zu den Zeitpunkten -30, 30, 60, 90 und 180 min statt. 15 min nach der letzten Blutentnahme wurden alle Tiere geschlachtet. Die Schlachtung erfolgte nach vorheriger Betäubung durch ein Elektroschockgerät im Versuchsschlachthaus des Friedrich-Loeffler-Instituts in Braunschweig.

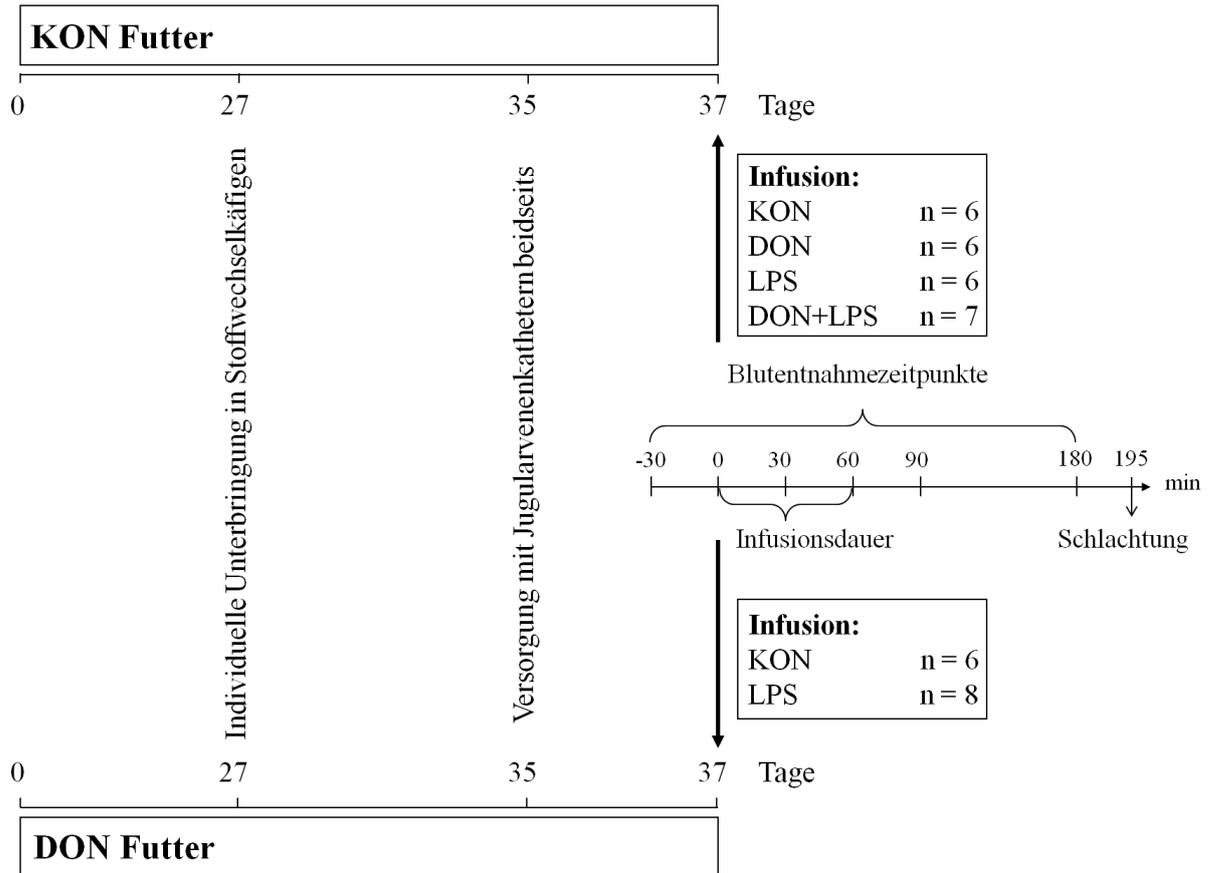


Abb. 7 Versuchsaufbau

Abgebildet ist der Versuchsablauf mit Aufteilung in chronische Fütterungsphase über 37 Tage (erste Abkürzung) und akute intravenösen Infusion über eine Stunde (zweite Abkürzung). Daraus ergaben sich sechs Versuchsgruppen: KON_KON, KON_DON, KON_LPS, KON_DON/LPS, DON_KON, DON_LPS. Die Blutentnahme fand zu den Zeitpunkten -30, 30, 60, 90 und 180 min statt. 15 min später wurden alle Tiere geschlachtet.

2.3 Probenentnahme

2.3.1 Entnahme der Blutproben und -analyse

Nach Anlage der beidseitigen Jugularvenenkatheter konnten die Substanzapplikation und die Entnahme der Blutproben getrennt erfolgen. Jeweils 30 min vor Applikation der jeweiligen Substanz sowie 30 min, 60 min, 120 min und 180 min nach Start der Infusion (die Bezeichnung *post infusionem* (p.i.) bezieht sich auf den Startzeitpunkt $t = 0$ min) wurden Blutproben in heparinisierte Röhrchen (S-Monovette®, Sarstedt) entnommen und bei $2016 \times g$ für 10 min zentrifugiert. Die Lagerung des Serums für weitere Analysen erfolgte bei -20 °C. Die Aktivitäten der Aspartat-Aminotransferase (ASAT), Glutamat-

Dehydrogenase (GLDH) und γ -Glutamyl-Transferase (GGT) wurden durch einen enzymatischen UV-Test bestimmt. Die Bestimmung des totalen Bilirubins erfolgte mit Hilfe eines Photometers und Koffein als Reagenz. Die Albuminkonzentration wurde in einem photometrischen Test mit Bromkresolgrün ermittelt und der Gesamtproteingehalt mit der kolorimetrischen Biuret-Methode bestimmt. Alle Untersuchungen erfolgten in der Klinik für Schweine und kleine Klautiere der Tierärztlichen Hochschule in Hannover anhand des Standardprozederes (Kraft und Dürr 2005).

2.3.2 Makroskopische Untersuchung der Leber und Präparation

Am Tag der Schlachtung wurden alle Tiere gewogen. Direkt nach dem Schlachten erfolgte die Organentnahme aus der Bauchhöhle. Anschließend wurden die Lebern zur Bestimmung des absoluten Lebergewichts (LG) gewogen. Anhand des Körpergewichts (KG) und der Lebergewichte konnten die relativen Lebergewichte (g LG/kg KG) errechnet werden. Eine makroskopische Fotodokumentation der Lebern wurde vor der histologischen Probenentnahme durchgeführt. Die Proben wurden immer vom *Margo inferior* des rechten Leberlappens entnommen und direkt in 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert. Nach der Inkubation in Aqua dest. folgten die Entwässerung der Präparate mittels aufsteigender Ethanolreihe und die Einbettung in Paraffin (siehe Anlage 7.4). Die Proben wurden mit dem HM 355S Rotationsmikrotom (Microm International GmbH, Walldorf) in 5 μ m Anschnitte geschnitten und je zwei Anschnitte auf einen Objektträger (Super Frost® Plus, Menzel, Braunschweig) aufgezogen. Die Entparaffinierung erfolgte durch eine absteigende Alkoholreihe mit Xylol. Anschließend erfolgte die Anfärbung der Präparate in HE (siehe Anlage 7.5) und Eindeckelung. Aus 39 Organpräparaten wurden je zwei Anschnitte ausgewertet, was eine Untersuchung von insgesamt 78 Geweben ergab. Beurteilt wurden alle Schnitte manuell an einem Axioplan 2 Mikroskop (Zeiss, Deutschland) ausgestattet mit einer Farbkamera (Diagnostic Instruments Inc., USA). Mit dieser Kamera wurden jedoch nur repräsentative Ausschnitte der Präparate dokumentiert. Die Erhebung der histologischen Daten erfolgte für alle Präparate blind und die Zuordnung zur entsprechenden Behandlungsgruppe erfolgte erst nach der Datenerhebung.

2.4 Histologischer Aktivitätsindex

Der Bewertungsindex, welchem die histologischen Beobachtungen zugrunde liegen, wurde zusammen mit dem Pathologischen Institut der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg in Anlehnung an den histologischen Aktivitätsindex (HAI) nach Ishak et al. (1995) entwickelt. Dieser Index ist in Tabelle 4 dargestellt. Es wurde eine Gesamtpunktzahl für

alle erhobenen Werte mit einem Höchstwert von 40 Punkten bei maximal möglicher Schädigung gebildet. Die jeweilige Punktzahl setzte sich aus der Bewertung für Entzündung, Nekrosen und Blutungen der Leberläppchen zusammen. Die Entzündung wurde getrennt nach Portalfeldern (A), Periportalfeldern (B) und Azini (C) betrachtet und beurteilt. Das Bewertungsschema ist in Abbildung 8 dargestellt. Eine weitere Einteilung in neutrophile (A1, B1 und C1) und eosinophile Granulozytenreaktion (A2, B2 und C2) wurde aufgrund des häufigen Auftretens nach der Durchmusterung hinzugefügt. Des Weiteren wurden die beobachteten Nekrosen in Einzel- und Brückennekrosen unterteilt sowie nach der Lokalisation ihres Auftretens in portozentrale (a) und portoportale (b) Nekrosen. Das Kriterium der intrahepatischen Blutungen wurde aufgrund des häufigen Vorkommens zum Index ergänzt, wobei auch hier zwischen portozentralen (a) und portoportalen (b) Blutungen unterschieden wurde.

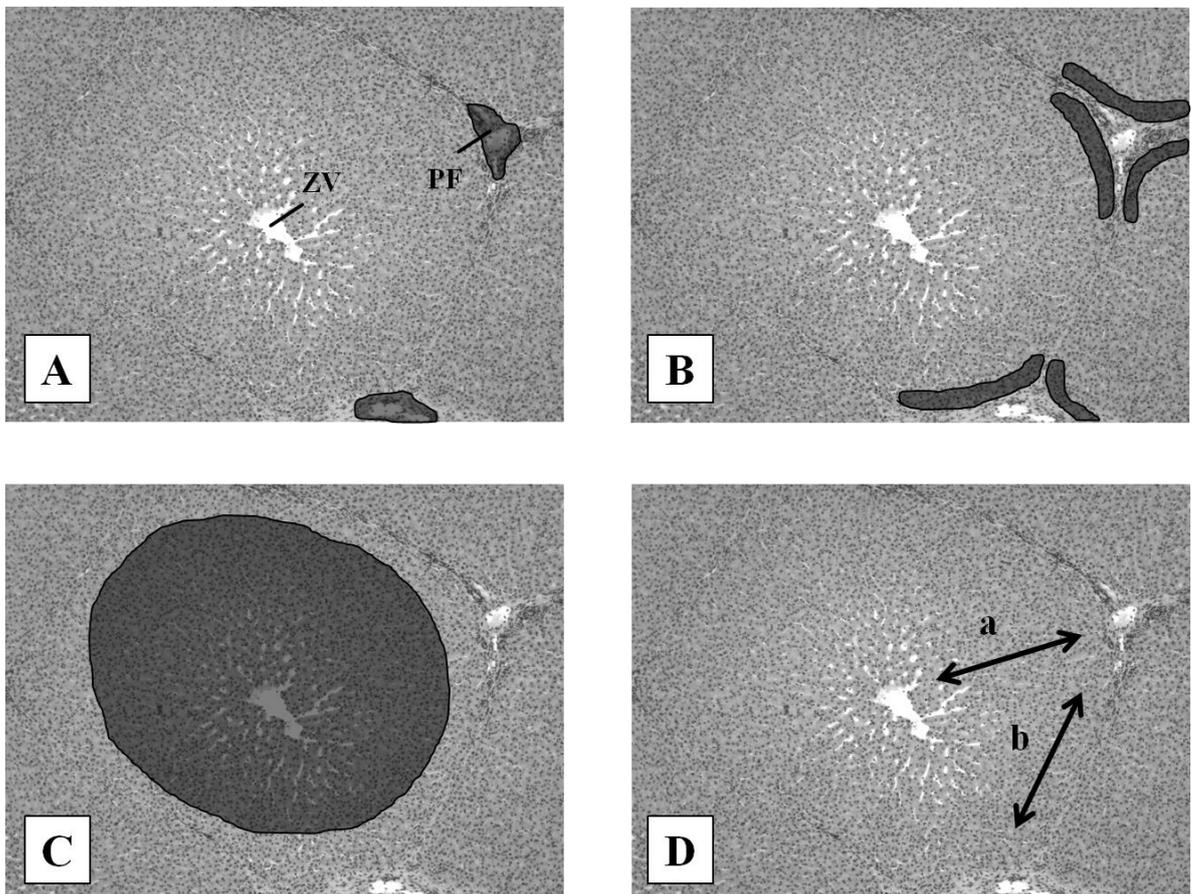


Abb. 8 Skizze zum Bewertungsschema des histologischen Aktivitätsindex

Dargestellt ist die mikroskopische Ansicht eines porcinen Leberazinus aus dem vorliegenden Versuch. Es erfolgte die getrennte Bewertung der pathohistologischen Ereignisse innerhalb verschiedener Räume: A - Portalfeld, B - Periportalfeld, C - Azinus. Eine weitere Unterteilung in portozentral (a) und portoportal (b) wurde in Abbildung D dargestellt.

ZV - Zentralvene, PF - Portalfeld.

Tab. 4 Histologischer Aktivitätsindex (HAI)

HAI-Kriterien	Index		
A - Portale Entzündung	A1 - neutrophile Granulozyten	A2 - eosinophile Granulozyten	
	Keine	0	0
	Gering, wenige oder alle Portalfelder	1	1
	Mäßig, wenige oder alle Portalfelder	2	2
	Mäßig bis ausgeprägt, alle Portalfelder	3	3
	Ausgeprägt, alle Portalfelder	4	4
	maximal 8 Punkte		
B - Periportale Entzündung	B1 - neutrophile Granulozyten	B2 - eosinophile Granulozyten	
	Keine	0	0
	Fokal, wenige Portalfelder	1	1
	Fokal, Mehrzahl der Portalfelder	2	2
	Kontinuierlich (um < 50% der Portalfelder)	3	3
	Kontinuierlich (um > 50% der Portalfelder)	4	4
	maximal 8 Punkte		
C - Azinäre Entzündung	C1 - neutrophile Granulozyten	C2 - eosinophile Granulozyten	
	Keine	0	0
	Gering, wenige oder alle Azini	1	1
	Mäßig, wenige oder alle Azini	2	2
	Mäßig bis ausgeprägt, alle Azini	3	3
	Ausgeprägt, alle Azini	4	4
	maximal 8 Punkte		
D - Fokale Nekrosen¹			
	Keine	0	
	Ein Herd ² pro Gesichtsfeld (10 x Objektiv)	1	
	Zwei bis vier Herde pro Gesichtsfeld (10 x Objektiv)	2	
	Fünf bis zehn Herde pro Gesichtsfeld (10 x Objektiv)	3	
	Mehr als zehn Herde pro Gesichtsfeld (10 x Objektiv)	4	

E - Konfluente Nekrosen³	
Keine	0
Fokal	1
Zone-1-Nekrosen, wenige	2
Zone-1-Nekrosen, zahlreiche	3
Zone-1 + einzelne portozentrale ⁴ Brückennekrosen	4
Zone-1 + multiple portozentrale Brückennekrosen	5
Panazinäre ⁵ oder multiazinäre Nekrosen	6
F - Hämorrhagien	
Keine	0
Fokal	1
Zone-1-Hämorrhagien, wenige	2
Zone-1-Hämorrhagien, zahlreiche	3
Zone-1 + einzelne portozentrale Hämorrhagien	4
Zone-1 + multiple portozentrale Hämorrhagien	5
Panazinäre oder multiazinäre Hämorrhagien	6
Maximaler kumulativer HAI	40

Tabelle 4 wurde entnommen und modifiziert nach Ishak et al. (1995).

¹ Fokale Nekrose - Zelltod einzelner Hepatozyten

² Herd - Gruppe bestehend aus drei bis fünf Hepatozyten

³ Konfluente Nekrose - Zelltod einer Hepatozytengruppe ohne klare zonale Abgrenzung

⁴ Portozentral - Leberparenchym zwischen Portalfeld und Zentralvene

⁵ Panazinär - Parenchym innerhalb des Leberazinus

2.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit SAS (Version 9.1, SAS Institute, USA) für alle erhobenen Daten. Die technischen Parameter Körpergewicht, absolutes und relatives Lebergewicht wurden mit einer einfaktoriellen ANOVA mit anschließendem Tukey Post-Hoc-Test analysiert. Der histologische Aktivitätsindex (n=39) wurde mit Hilfe des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-Hoc-Test analysiert. Die Parameter der klinischen Chemie (n=37, aufgrund von undurchlässigen Kathetern bei zwei Schweinen) wurden mit dem Modell „Mixed“ mit „Versuchsgruppe“, „Zeit“ und ihrer Interaktion als feste Faktoren berechnet. Die im zeitlichen Verlauf entnommenen Blutproben eines Tieres wurden als Messwiederholung behandelt und durch das Modell „Repeated“ in der statistischen Verarbeitung berücksichtigt. Mit Hilfe des adjusted Tukey-Kramer Post-Hoc-Tests wurden die Unterschiede zwischen den festen Faktoren kalkuliert (Methode der kleinsten Quadrate). Als Alphaniveau wurde für alle Analysen $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Zootechnische Parameter

Die Erfassung der technischen Parameter erfolgte nur bei 39 der anfänglichen 48 Tiere. Im Verlauf des Versuches kam es nach der Katheterimplantation bei neun Schweinen zu einer systemischen Infektion. Deshalb mussten diese Tiere medikamentös behandelt werden und wurden folglich aus dem Versuch ausgegliedert.

Bei der Erhebung des Körpergewichts und des absoluten Lebergewichts der 39 Tiere konnten keine Signifikanzen gefunden werden. Allerdings zeigte das relative Lebergewicht, welches sich aus dem Quotienten von absolutem Lebergewicht und Körpergewicht berechnet (g LG/kg KG), einen signifikanten Gruppeneffekt ($p \leq 0,05$). Das Lebergewicht war in den drei LPS-Gruppen am größten und im Vergleich zu den Gruppen KON_KON, KON_DON und DON_KON um circa 20% erhöht. Die dazugehörigen Daten sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tab. 5 Einfluss von DON und LPS auf zootechnische Parameter

	KON_KON	KON_DON	KON_LPS	KON_DON/LPS	DON_KON	DON_LPS	PSEM	p-Wert
KG [kg]	42,2	42,3	40,5	40,1	44,3	43,1	0,9	$p = 0,935$
LG [g]	878,2	849,0	1007,0	1074,0	920,8	11062,1	31,6	$p = 0,183$
rel. LG [g/kg]	21,0	20,1	25,4	25,6	20,9	24,6	0,7	$p < 0,05$

Die Erhebung der zootechnischen Parameter erfolgte am Versuchstag 37 und ist hier sortiert nach Gruppen aufgetragen. Abkürzungen: KG - Körpergewicht, LG - absolutes Lebergewicht, rel. LG - relatives Lebergewicht (g LG/kg KG), PSEM - pooled standard error of the mean, Analyse mittels ANOVA und Tukey Post-Hoc-Test ($p < 0,05$), $n=39$.

3.2 Lebermakroskopie

Die Untersuchung der Schweinelebern auf sichtbare pathologische Läsionen mit Hilfe der Fotodokumentation ist exemplarisch in Abbildung 9 dargestellt. Die Kontrollgruppe zeigte keinerlei makroskopische Auffälligkeiten. Ebenso waren auch die Lebern der mit DON behandelten Tiere unauffällig. Auffällige Veränderungen zeigten sich dagegen in den LPS-Gruppen. Unregelmäßig dunkelrot gefärbte Leberoberflächen, nach dem Anschnitt blutiges Parenchym sowie stumpfe Ränder waren bei diesen Tieren sichtbar. Diese intrahepatischen Blutungen zeigten sich auch an der Leberoberfläche in Formen von Petechien, Ekchymosen und Sugillationen. Zeichen der Cholestase konnten nicht beobachtet werden. Zu diesen können ein Ikterus der Haut oder Skleren mit Gelbfärbung derselben oder das Auftreten von braunem Urin oder entfärbtem Stuhl gehören. Weiterhin hätten in der Lebermakroskopie bei Cholestase eventuell eine Größen- und Gewichtszunahme der Leber sowie eine Grünfärbung und bei Anschnitt eine Dilatation der Gallengänge beobachtet werden können.

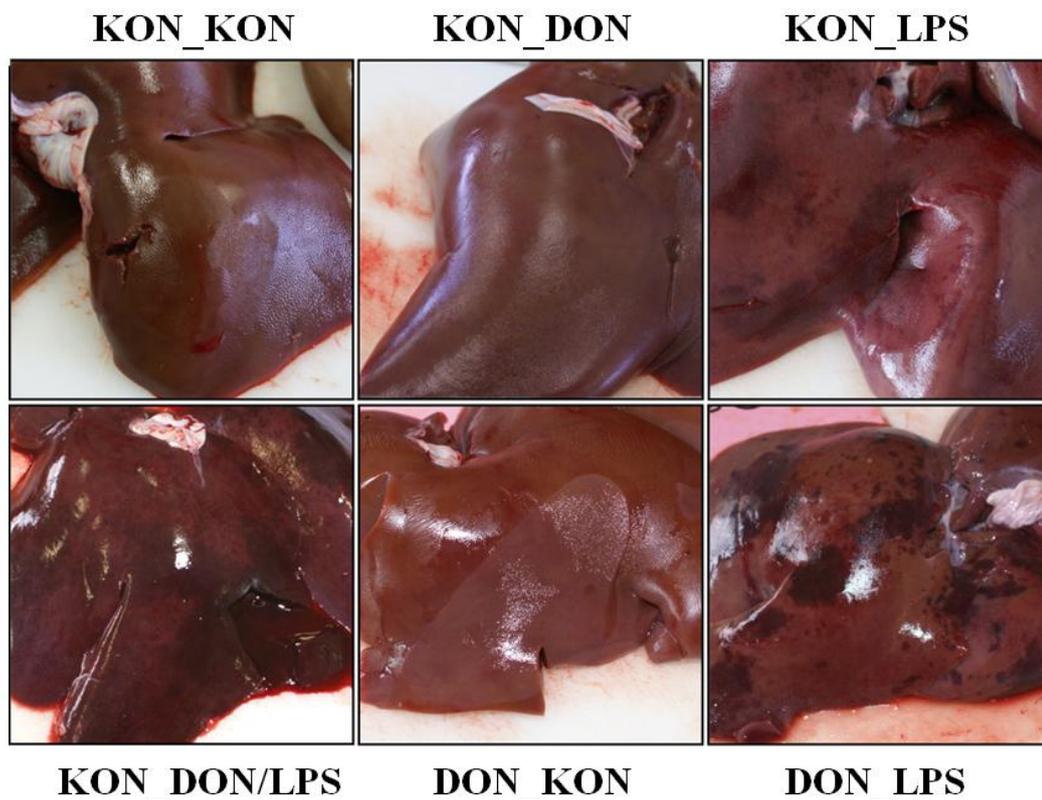


Abb. 9 Repräsentative makroskopische Fotodokumentation der Lebern

Die Fotodokumentation stellt jede der sechs Versuchsgruppen exemplarisch dar. Die Kontrollgruppe zeigte keine makroskopischen Auffälligkeiten. Ebenso waren auch die Lebern der mit DON behandelten Tiere unauffällig. Dagegen zeigten sich in den LPS-Gruppen deutliche intrahepatische Blutungen.

3.3 Lebermikroskopie

In Abbildung 10 sind beispielhafte Fotos der histologischen Präparate zu den sechs Bewertungskriterien des modifizierten HAI (siehe Tabelle 4) zu sehen. Jeder der 78 Anschnitte wurde einzeln auf die dargestellten Kriterien Entzündung, Nekrosen und Blutungen untersucht und bewertet. Im Anschluss wurde der kumulative HAI gebildet. Der ausgewertete Index der Schweinelebern mit seine einzelnen Komponenten und Signifikanzen ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tab. 6 Effekt von DON und LPS auf den Histologischen Aktivitätsindex

	KON_KON	KON_DON	KON_LPS	KON_DON/LPS	DON_KON	DON_LPS	PSEM	p-Wert
HAI	16,3 ^{abc}	12,8 ^a	22,5 ^{bc}	24,6 ^b	14,1 ^{ac}	18,9 ^{abc}	0,9	$p \leq 0,001$
A1	2,4	2,5	3,4	3,4	2,0	3,1	0,2	$p = 0,08$
A2	2,0 ^{ab}	2,5 ^{ab}	2,8 ^{ab}	3,2 ^b	1,8 ^a	2,6 ^{ab}	0,1	$p \leq 0,05$
B1	2,0	2,8	3,3	2,8	1,3	2,4	0,2	$p = 0,08$
B2	1,3 ^{ab}	0,8 ^a	1,9 ^{ab}	2,1 ^b	1,0 ^{ab}	1,4 ^{ab}	0,1	$p \leq 0,05$
C1	1,1 ^a	1,4 ^{ab}	2,3 ^b	2,6 ^b	1,7 ^{ab}	1,9 ^{ab}	0,1	$p \leq 0,001$
C2	1,6 ^a	1,3 ^a	3,3 ^b	3,5 ^b	2,0 ^{ab}	2,4 ^{ab}	0,2	$p \leq 0,001$
D	2,3	0,8	1,0	1,5	1,5	1,5	0,2	$p = 0,27$
E	3,4	0,8	1,7	1,6	2,4	1,3	0,3	$p = 0,15$
F	0,1 ^{ab}	0,0 ^a	2,8 ^{ab}	3,8 ^b	0,3 ^{ab}	2,3 ^{ab}	0,3	$p \leq 0,01$

Aufgetragen sind der Gesamtindex (HAI) sowie die einzelnen Kriterien des histologischen Aktivitätsindex sortiert nach den Versuchsgruppen. Abkürzungen: A1 - Neutrophile portale Entzündung, A2 - Eosinophile portale Entzündung, B1 - Neutrophile periportale Entzündung, B2 - Eosinophile periportale Entzündung, C1 - Neutrophile azinäre Entzündung, C2 - Eosinophile azinäre Entzündung, D - Fokale Nekrosen, E - Konfluente Nekrosen, F - Hämorrhagien, PSEM - pooled standard error of the mean, ^{abc} unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben in einer Reihe sind signifikant ($p < 0,05$; nicht-parametrischer Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-Hoc-Test), n=39.

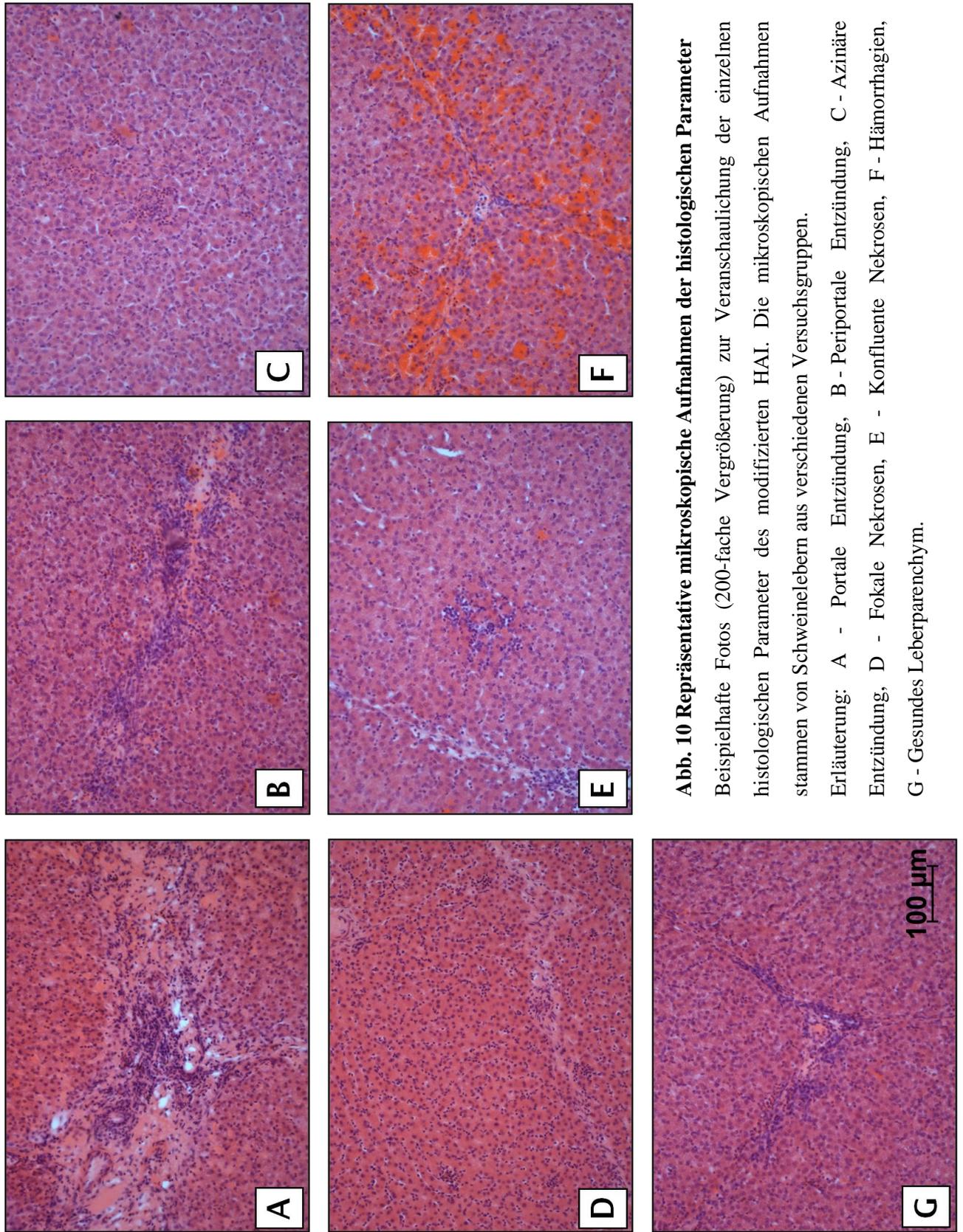


Abb. 10 Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der histologischen Parameter

Beispielhafte Fotos (200-fache Vergrößerung) zur Veranschaulichung der einzelnen histologischen Parameter des modifizierten HAI. Die mikroskopischen Aufnahmen stammen von Schweinelebern aus verschiedenen Versuchsgruppen.

Erläuterung: A - Portale Entzündung, B - Periportale Entzündung, C - Azinäre Entzündung, D - Fokale Nekrosen, E - Konfluente Nekrosen, F - Hämorrhagien, G - Gesundes Leberparenchym.

3.3.1 Kumulativer Histologischer Aktivitätsindex

Der höchste Index und somit auch die größten pathologischen Veränderungen waren in den Gruppen KON_LPS und KON_DON/LPS, wie in Abbildung 11 dargestellt, zu sehen. Dieser Effekt resultierte genauer betrachtet hauptsächlich aus den intrahepatischen Einblutungen und der evaluierten Entzündungsreaktion. Betrachtet man die einzelnen Kriterien, wird ersichtlich, dass die eosinophilen Granulozyten in allen beobachteten Leberregionen der Gruppe KON_DON/LPS zur Erhöhung des Aktivitätsindexes beitrugen. Dagegen trug die Entzündungsreaktion der neutrophilen Granulozyten zwar in ähnlichem Umfang auch zum Aktivitätsindex bei, zeigte dagegen aber weder portal noch periportal eine Signifikanz. In den beiden LPS-Gruppen KON_LPS und KON_DON/LPS konnte eine signifikante stärkere Entzündungszellmigration in den Azini gegenüber der Kontrollgruppe KON_KON beobachtet werden.

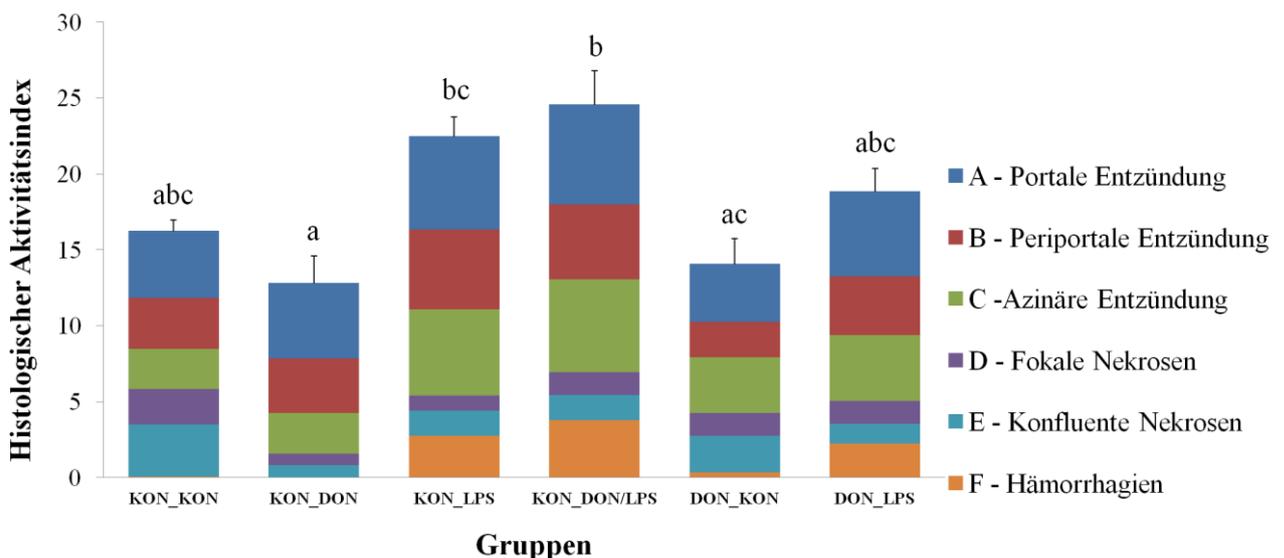


Abb. 11 Kumulativer histologischer Aktivitätsindex der Schweinelebern

Dargestellt ist der Gesamtindex (HAI) aufgetragen nach Versuchsgruppe. Der Index setzt sich aus sechs Parametern zusammen (A - F), welche durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet sind. Jede Säule stellt den Mittelwert mit zugehörigem Standardfehler dar. Erläuterung: ^{abc} unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben indizieren Signifikanz ($p < 0,05$; nicht-parametrischer Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-Hoc-Test), $n=39$.

Einen eher geringen Einfluss auf den HAI hatten die Einzelzellnekrosen und konfluenten Nekrosen, was sich ebenfalls in den fehlenden Signifikanzen widerspiegelt. Interessanter Weise stellte sich die Versuchsgruppe DON_LPS als völlig unabhängig gegenüber den anderen Gruppen heraus. Bezogen auf den Gesamtindex und auch auf die einzelnen Kriterien ergab sich für den drittstärksten pathologischen Kumulativindex von DON_LPS aber keine Signifikanz verglichen mit anderen Gruppen. Obwohl in dieser Gruppe beide Toxine enthalten waren, fiel die histologische Schädigung geringer aus, was einen protektiven Effekt durch DON-Fütterung vermuten ließe.

3.4 Klinische Chemie

Alle erhobenen Laborparameter wurden unter Berücksichtigung ihrer Leberspezifität ausgewählt. Insgesamt konnten von 37 Tieren über den gesamten Versuchszeitraum Blutproben entnommen werden. Zwei Tiere schieden aufgrund von undurchlässigen Jugularvenenkathetern aus. Neben Albumin, dem Gesamtprotein und Bilirubin wurden auch die Aspartat-Aminotransferase (ASAT), die γ -Glutamyl-Transferase (GGT) und die Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) in die Untersuchung einbezogen. Alle Blutparameter (siehe Tabelle 7 bis 12) waren zu dem Zeitpunkt $t = -30$ min (bezogen auf den Infusionsstartzeitpunkt $t = 0$ min) innerhalb des physiologischen Bereichs und es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Es ergab sich also kein Effekt durch das über 37 Tage durchgeführte Futter-Regime in der klinischen Chemie.

3.4.1 Aspartat-Aminotransferase (ASAT)

Die ermittelten Konzentrationen der Aspartat-Aminotransferase aus dem Schweineblut sind in Tabelle 7 dargestellt. Bei der Auswertung der Enzymaktivität der ASAT im vorliegenden Versuch konnte ein signifikanter Zeiteffekt ($p < 0,001$) und eine Interaktion zwischen Gruppe und Zeit ($p < 0,001$) gefunden werden, allerdings kein Gruppeneffekt ($p = 0,90$). Bei der Betrachtung der einzelnen Zeitpunkte fiel ein signifikanter ASAT-Aktivitätsanstieg in den Gruppen KON_DON/LPS ($p < 0,001$) und DON_LPS ($p < 0,05$) zum Zeitpunkt $t = 180$ min verglichen mit dem Startzeitpunkt der Messung $t = -30$ min und dem Zeitpunkt $t = 60$ min auf. Interessanter Weise gab es aber keine Signifikanzen in der dritten LPS-Gruppe KON_LPS. Alle gefundenen Veränderungen spielten sich innerhalb der physiologischen Grenze (8,0 - 35,0 U/L; Kraft und Dürr 2005) ab.

Tab. 7 Bestimmung der Enzymaktivität der ASAT (in U/L) im Schweineblut

Zeit	KON_KON	KON_DON	KON_LPS	KON_DON/LPS	DON_KON	DON_LPS	PSEM
-30 min	10,7	12,5	11,8	11,7 ^A	14,2	12,3 ^A	0,7
30 min	12,2	13,2	12,8	13,7 ^{AB}	13,0	13,2 ^{AB}	0,8
60 min	10,3	14,3	12,8	13,1 ^A	13,3	12,3 ^A	0,8
120 min	9,7	12,7	11,6	13,4 ^{AB}	12,3	12,7 ^{AB}	0,7
180 min	10,6	12,8	14,3	15,7 ^B	12,3	15,2 ^B	0,8
ANOVA							
group	p = 0,90						
time	p ≤ 0,001						
group*time	p ≤ 0,001						

Erläuterung: PSEM - pooled standard error of means, die angegebenen Werte zum jeweiligen Zeitpunkt stellen Mittelwerte dar, ^{abc} unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben in einer Reihe (Gruppeneffekt) und ^{ABC} unterschiedliche hochgestellt Großbuchstaben in einer Spalte (Zeiteffekt) sind signifikant ($p < 0,05$; adjusted Tukey-Kramer Post-Hoc Test), n = 37.

3.4.2 γ -Glutamyl-Transferase (GGT)

Die Analyse der Enzymaktivität der GGT zeigte im vorliegenden Versuch weder einen Zeiteffekt noch einen Gruppeneffekt oder eine Interaktion beider Faktoren. Die ermittelten GGT-Konzentrationen aus dem Schweineblut wurden in Tabelle 8 zusammengefasst. Weiterhin befanden sich alle Veränderungen innerhalb der physiologischen Grenze ($< 10,0 - 40,0$ U/L; Kraft und Dürr 2005). Es konnte lediglich ein Trend zur erhöhten Enzymaktivität in den drei LPS-Gruppen beobachtet werden. Die verbliebenen Versuchsgruppen zeigten dagegen eher eine Tendenz zur Abnahme der GGT-Aktivität über die Zeit.

Tab. 8 Bestimmung der Enzymaktivität der GGT (in U/L) im Schweineblut

Zeit	KON_KON	KON_DON	KON_LPS	KON_DON/LPS	DON_KON	DON_LPS	PSEM
-30 min	15,0	16,8	14,8	17,7	20,7	16,5	0,8
30 min	13,7	16,2	14,3	16,7	20,2	15,0	1,0
60 min	13,3	16,3	14,8	17,0	16,8	16,7	0,8
120 min	13,5	16,7	15,8	18,7	21,5	17,0	1,3
180 min	13,7	14,2	16,7	19,1	15,8	17,5	0,8
ANOVA							
group	p = 0,64						
time	p = 0,18						
group*time	p = 0,17						

Erläuterung: PSEM - pooled standard error of means, die angegebenen Werte zum jeweiligen Zeitpunkt stellen Mittelwerte dar, ^{abc} unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben in einer Reihe (Gruppeneffekt) und ^{ABC} unterschiedliche hochgestellt Großbuchstaben in einer Spalte (Zeiteffekt) sind signifikant ($p < 0,05$; adjusted Tukey-Kramer Post-Hoc Test), $n = 37$.

3.4.3 Glutamat-Dehydrogenase (GLDH)

Für die Enzymaktivität der GLDH konnte im vorliegenden Versuch eine Tendenz im Zeiteffekt ($p = 0,09$) und eine signifikante Interaktion zwischen Gruppe und Zeit ($p < 0,001$) gefunden werden, allerdings kein Gruppeneffekt ($p = 0,24$) selbst. Die Mittelwerte der GLDH-Konzentrationen aus dem Schweineblut und ihre Signifikanzen sind in Tabelle 9 abgebildet. Zum Zeitpunkt $t = 180$ min zeigte sich für die Gruppe KON_DON/LPS ein signifikanter Aktivitätsanstieg der GLDH im Vergleich zu KON_DON ($p < 0,01$) und DON_KON ($p < 0,05$). Des Weiteren kam es zu einer Erhöhung der GLDH-Konzentration über die Zeit in der Gruppe KON_DON/LPS. So erreichte hier die Enzymaktivität zum Zeitpunkt $t = 180$ min einen signifikanten Anstieg verglichen mit den Zeitpunkten $t = -30$ min, 30 min und 60 min. Generell tendierten auch

hier die LPS-Gruppen zum GLDH-Aktivitätsanstieg, während die verbliebenen Gruppen KON_KON, KON_DON und DON_KON einen Trend zur Abnahme der GLDH-Aktivität zeigten. Alle beobachteten Veränderungen fanden allerdings innerhalb der physiologischen Grenze (0,0 - 5,0 U/L; Kraft und Dürr 2005) statt.

Tab. 9 Bestimmung der Enzymaktivität der GLDH (in U/L) im Schweineblut

Zeit	KON_KON	KON_DON	KON_LPS	KON_DON/LPS	DON_KON	DON_LPS	PSEM
-30 min	2,4	2,4	2,4	1,2 ^A	2,1	1,6	0,2
30 min	2,4	1,4	1,6	2,2 ^A	2,4	2,0	0,2
60 min	1,8	1,7	1,3	2,4 ^A	1,7	2,9	0,2
120 min	1,6	1,5	2,4	3,1 ^{AB}	1,7	3,2	0,2
180 min	1,8 ^{ab}	1,4 ^a	2,2 ^{ab}	4,5 ^{bB}	1,6 ^a	3,8 ^{ab}	0,3
ANOVA group	p = 0,24						
time	p = 0,09						
group*time	p ≤ 0,001						

Erläuterung: PSEM - pooled standard error of means, die angegebenen Werte zum jeweiligen Zeitpunkt stellen Mittelwerte dar, ^{abc} unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben in einer Reihe (Gruppeneffekt) und ^{ABC} unterschiedliche hochgestellt Großbuchstaben in einer Spalte (Zeiteffekt) sind signifikant ($p < 0,05$; adjusted Tukey-Kramer Post-Hoc Test), $n = 37$.

3.4.4 Albumin

In Tabelle 10 wurden die erhobenen Albumin-Werte samt ihren Signifikanzen dargestellt. Eine signifikante Interaktion zwischen Gruppe und Zeit ($p < 0,05$) sowie ein signifikanter Zeiteffekt ($p < 0,001$) konnte für Albumin im vorliegenden Versuch eruiert werden. Bei der Analyse über die Zeit fand sich eine signifikante Abnahme der Albuminkonzentration zu den Zeitpunkten $t = 120$ min ($p < 0,05$) und $t = 180$ min ($p < 0,001$) verglichen mit den vorherigen Zeitpunkten in der Gruppe KON_DON/LPS, obwohl auch diese Veränderungen innerhalb der physiologischen Grenze (18,0 - 31,0 g/L; Kraft und

Dürr 2005) waren. Diese Tendenz zur Albuminabnahme über die Zeit zeigte sich ebenfalls für die beiden anderen Versuchsgruppen, welche LPS erhielten. Allerdings erreichte dieser zeitliche Trend in den Gruppen KON_LPS und DON_LPS keine Signifikanz.

Tab. 10 Bestimmung der Albuminkonzentration (in g/L) im Schweineblut

Zeit	KON_KON	KON_DON	KON_LPS	KON_DON/LPS	DON_KON	DON_LPS	PSEM
-30 min	30,1	29,9	28,7	31,6 ^A	30,3	30,3	0,5
30 min	27,5	29,6	27,7	30,9 ^A	26,4	26,2	0,9
60 min	27,4	30,5	25,5	29,1 ^{AB}	27,4	27,9	0,5
120 min	26,2	28,4	24,1	25,9 ^B	26,1	26,4	0,4
180 min	28,5	28,7	24,7	24,6 ^B	26,7	26,3	0,5
ANOVA							
group	p = 0,53						
time	p ≤ 0,001						
group*time	p = 0,04						

Erläuterung: PSEM - pooled standard error of means, die angegebenen Werte zum jeweiligen Zeitpunkt stellen Mittelwerte dar, ^{abc} unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben in einer Reihe (Gruppeneffekt) und ^{ABC} unterschiedliche hochgestellt Großbuchstaben in einer Spalte (Zeiteffekt) sind signifikant ($p < 0,05$; adjusted Tukey-Kramer Post-Hoc Test), $n = 37$.

3.4.5 Gesamtprotein

Im vorliegenden Versuch gab es zwar keinen signifikanten Gruppeneffekt, jedoch einen Zeiteffekt ($p < 0,001$) und eine signifikante Interaktion ($p < 0,001$) beider Faktoren. Die Analyse der Gesamtproteinkonzentration über die Zeit zeigte einen signifikanten Abfall zum Zeitpunkt $t = 180$ min in allen LPS-Gruppen bezogen auf die Zeitpunkte $t = -30$ min und $t = 30$ min. Dieser Konzentrationsabfall lag jeweils unterhalb der physiologischen Grenze (55,0 - 86,0 g/L; Kraft und Dürr 2005). Die Gesamtproteinkonzentrationen der einzelnen Versuchsgruppen sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Außerdem beinhalteten

die Gruppen KON_DON/LPS und DON_LPS zum Zeitpunkt $t = 120$ min einen signifikant geringeren Anteil an Gesamtprotein im Vergleich zum Startzeitpunkt der Messung. Auch in der Gruppe DON_KON verringerte sich das Gesamtprotein zu den Zeitpunkten $t = 120$ min ($p < 0,01$) und $t = 30$ min ($p < 0,05$) im Vergleich zum Startzeitpunkt. Allerdings zeigten auch die drei nicht mit LPS infundierten Gruppen einen Trend zur Abnahme der Gesamtproteinkonzentration, welcher allerdings innerhalb der physiologischen Grenze lag und dazu nicht signifikant war.

Tab. 11 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration (in g/L) im Schweineblut

Zeit	KON_KON	KON_DON	KON_LPS	KON_DON/LPS	DON_KON	DON_LPS	PSEM
-30 min	59,5	60,8	59,5 ^A	61,3 ^A	60,4 ^A	60,3 ^A	0,6
30 min	57,8	58,6	58,7 ^A	61,2 ^A	54,2 ^B	62,5 ^A	0,8
60 min	57,7	59,6	54,6 ^{AB}	58,4 ^{AB}	56,7 ^{AB}	57,8 ^{AB}	0,6
120 min	55,0	56,7	54,7 ^{AB}	53,6 ^B	54,8 ^B	54,1 ^B	0,7
180 min	58,8	56,2	51,5 ^B	51,4 ^C	56,1 ^{AB}	53,6 ^B	0,7
ANOVA							
group	p = 0,82						
time	p ≤ 0,001						
group*time	p ≤ 0,001						

Erläuterung: PSEM - pooled standard error of means, die angegebenen Werte zum jeweiligen Zeitpunkt stellen Mittelwerte dar, ^{abc} unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben in einer Reihe (Gruppeneffekt) und ^{ABC} unterschiedliche hochgestellt Großbuchstaben in einer Spalte (Zeiteffekt) sind signifikant ($p < 0,05$; adjusted Tukey-Kramer Post-Hoc Test), $n = 37$.

3.4.6 Gesamtbilirubin

Die Messungen für den Gesamtbilirubinverlauf über die Zeit im vorliegenden Versuch sind in Abbildung 12 und Tabelle 12 dargestellt. Hochsignifikante Effekte wurden hierbei für die Faktoren Gruppe ($p < 0,001$), Zeit ($p < 0,001$) und ihre Interaktion ($p < 0,001$) deutlich. Auffällig ist die sprunghafte Erhöhung der Bilirubinkonzentration in den drei LPS-

Gruppen zum Zeitpunkt $t = 180$ min verglichen mit den vorherigen Messzeitpunkten. Zudem sind diese drei Grenzwertüberschreitungen im Vergleich zu den Gruppen KON_KON ($p < 0,001$), KON_DON ($p < 0,05$) und DON_KON ($p < 0,001$) signifikant. Hierbei erzielte die Gruppe mit der kombinierten DON/LPS-Infusion eine weitaus höhere Bilirubinkonzentration als die beiden Gruppen mit der reinen LPS-Infusion. Die erreichte Signifikanz gegenüber den Gruppen KON_LPS und DON_LPS (beide $p < 0,001$) lässt hierbei einen additiven Effekt bei intravenöser Gabe beider Toxine im Gegensatz zur Einzelapplikation vermuten. Denn die Bilirubinkonzentration der Gruppe KON_DON/LPS war um 83% im Vergleich zu KON_DON und um 35% im Vergleich zu KON_LPS erhöht. Die Bilirubinkonzentration der Gruppe DON_LPS lag dabei insgesamt zum Zeitpunkt $t = 180$ min nur ganz knapp über der physiologische Grenze ($0,1 - 4,3 \mu\text{mol/L}$; Kraft und Dürr 2005).

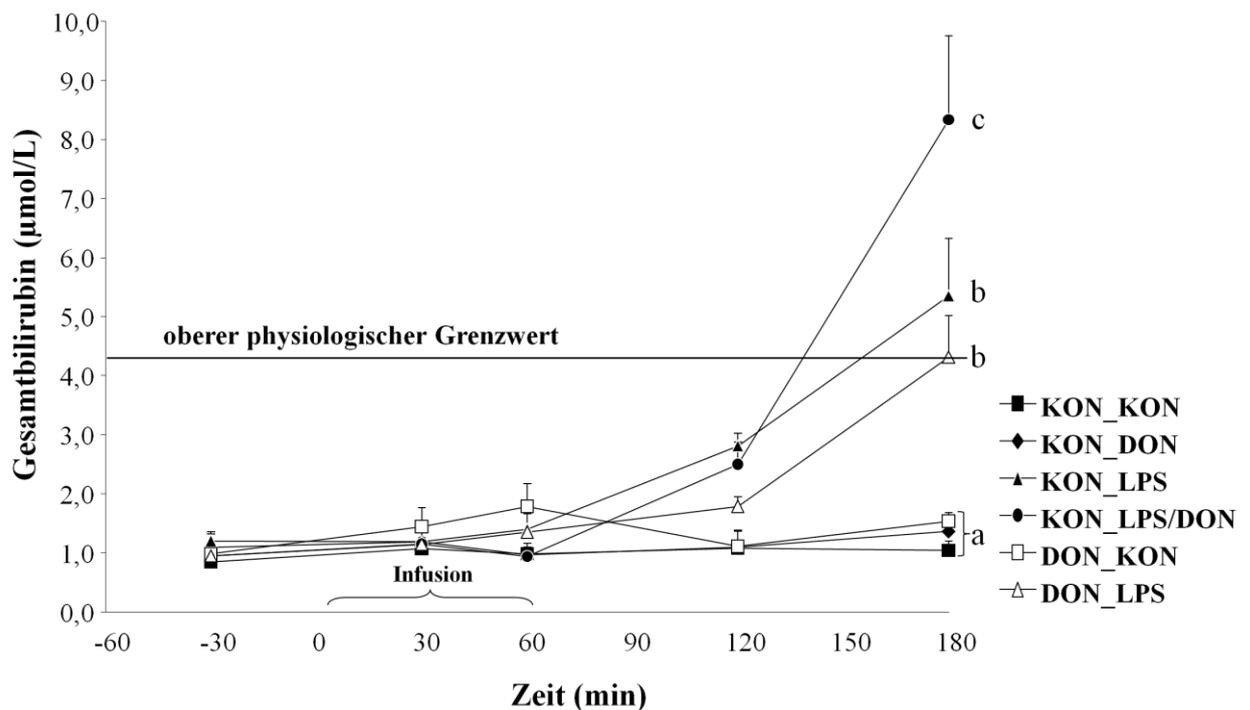


Abb. 12 Zeitlicher Verlauf von Gesamtbilirubin unter Einfluss von DON und LPS

Abgebildet ist der Verlauf der Bilirubinkonzentration in $\mu\text{mol/L}$ (y-Achse) zu den einzelnen Entnahmezzeitpunkten (x-Achse) im Schweineblut sortiert nach Versuchsgruppen. Erläuterung: ^{abc} unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben indizieren Signifikanz ($p < 0,05$; adjusted Tukey-Kramer Post-Hoc Test), $n=37$.

Tab. 12 Bestimmung der Gesamtbilirubinkonzentration (in $\mu\text{mol/L}$) im Schweineblut

Zeit	KON_KON	KON_DON	KON_LPS	KON_DON/LPS	DON_KON	DON_LPS	PSEM
-30 min	0,9	1,1	1,2 ^A	0,9 ^A	1,0	0,9 ^A	0,1
30 min	1,1	1,2	1,2 ^A	1,2 ^A	1,6	1,1 ^A	0,1
60 min	1,0	1,0	1,4 ^A	0,9 ^A	1,6	1,4 ^A	0,1
120 min	1,1	1,1	2,8 ^A	2,5 ^A	1,0	1,8 ^A	0,2
180 min	1,0 ^a	1,4 ^a	5,4 ^{bB}	8,3 ^{cB}	1,1 ^a	4,3 ^{bB}	0,6
ANOVA							
group	p \leq 0,001						
time	p \leq 0,001						
group*time	p \leq 0,001						

Erläuterung: PSEM - pooled standard error of means, die angegebenen Werte zum jeweiligen Zeitpunkt stellen Mittelwerte dar, ^{abc} unterschiedliche hochgestellte Kleinbuchstaben in einer Reihe (Gruppeneffekt) und ^{ABC} unterschiedliche hochgestellt Großbuchstaben in einer Spalte (Zeiteffekt) sind signifikant (p < 0,05; adjusted Tukey-Kramer Post-Hoc Test), n = 37.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In Bezug auf die zootechnischen Parameter konnte nur für das relative Lebergewicht ein signifikanter Gruppeneffekt nachgewiesen werden. Hierbei zeigten die LPS-Gruppen ein um circa 20% erhöhtes Lebergewicht im Vergleich zu den reinen DON-Gruppen und der Kontrollgruppe. Betrachtet man die Ergebnisse der Makroskopie, so waren ausschließlich die LPS-Gruppen auffällig. Die entsprechenden Lebern waren dunkelrot gefärbt und enthielten Petechien, Ekchymosen oder Sugillationen. Diese Blutungszeichen konnten in der Mikroskopie bestätigt werden.

Die Analyse des histologischen Aktivitätsindex zeigte für die Gruppe mit kombinierter Toxininfusion (KON_DON/LPS) im Vergleich zu KON_DON stark signifikante Hämorrhagien. Auch die anderen LPS-Gruppen zeigten mikroskopisch vermehrte intrahepatische Blutungen. Betrachtet man den Einfluss der Entzündungszellen, so spielt hauptsächlich das Auftreten von eosinophilen Granulozyten in allen Bereichen des Portalfelds eine große Rolle. Die größte Signifikanz ist ebenfalls in der kombinierten Gruppe KON_DON/LPS zu beobachten. Die reine LPS-Infusion zeigte azinär im Vergleich zur Kontrollgruppe eine starke intrahepatische Granulozytenansammlung. Somit ist ein eindeutig schädigender Einfluss auf den histologischen Aktivitätsindex der Schweineleber ausschließlich durch LPS zu verzeichnen. Dagegen verursachte die orale Exposition der Tiere mit DON kaum eine Leberschädigung.

Bei der Blutanalyse der leberspezifischen Enzyme befanden sich alle Veränderungen bis auf den Anstieg des Gesamtbilirubins im Normbereich. Dieser war sprunghaft 180 min nach Infusionsstart in den drei LPS-Gruppen zu beobachten und signifikant im Vergleich zu den anderen Gruppen. Außerdem zeigte die kombinierte Gruppe KON_DON/LPS zusätzlich eine signifikante Erhöhung verglichen mit den LPS-Einzelapplikationen.

Insgesamt wurde die Leberschädigung ausschließlich durch LPS verursacht. Die Infusion von DON schien keinen vergleichbaren hepatischen Schaden auszulösen. Dagegen wurde eher ein mildernder Einfluss durch die DON-Fütterung vor systemischer Endotoxinbelastung sichtbar.

4.2 Einleitung der Diskussion

DON als weit verbreitetes Schimmelpilzgift in Getreiden wie Weizen, Gerste, Mais und Hafer ist von großer Relevanz in der Futtermittel- und Nahrungsmittelindustrie. Die Trichothecene wirken sowohl immunstimulierend als auch immunsuppressiv. Dieser Effekt ist abhängig von der Dosis, der Frequenz, der Dauer der Exposition und vom untersuchten Immuntyp (Rotter et al. 1996, Pestka 2008, Pestka 2010b). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Toxizität von DON durch Vorhandensein von LPS potenziert wird, wobei das Immunsystem die Hauptrolle spielte (Islam und Pestka 2006). Eine niedrigdosierte LPS-Exposition führt zu einer Immunreaktion in Form von Opsonierung der eingedrungenen Endotoxine. Eine andauernde Exposition kann zu Gewebsschäden durch Aktivierung von Neutrophilen und der intravasalen Gerinnung führen. Die hochdosierte LPS-Gabe löst eine Kette von Entzündungsreaktionen aus, die Zelltod, Gewebsschäden und Organversagen verursachen können (Roth et al. 1998).

Das Ziel des vorliegenden Versuchsaufbaus war es, durch die kombinierte Gabe von DON und LPS über verschiedene Applikationsrichtungen anhand des Hausschweines als Tiermodell maximalen Stress bezogen auf das Immunsystem zu simulieren. Es wurde bereits eine Störung der Integrität der Darmschleimhaut durch DON sowie eine daraus resultierende systemische Wirkung des Mykotoxins vermutet (Pestka 2010a). Aufgrund dieser gastrointestinalen Epithelschädigung könnte eine Translokation von Kommensalen oder deren LPS ins Blut ermöglicht werden, woraufhin die Leber als erste Station von der Endotoxämie betroffen wäre. Klunker et al. (2012) diskutierten einen verstärkten Effekt der Kombination von DON und LPS auf die Darmschleimhaut des Hausschweins. Es konnte eine Umverteilung des zytologischen Anteils von ZO-1, einem tight-junction-Protein, nach apikal durch intravenöse Applikation von LPS (7,5 µg/kg KG) im proximalen und mittleren Jejunum nachgewiesen werden. Dieser Effekt zeigte sich nach kombinierter intravenöser Gabe von DON (100 µg/kg KG) und LPS zusätzlich auch im Duodenum. Als Modulator der Integrität von Interzellulärkontakten wie ZO-1 wurde LPS vermutet, zumal DON allein keinen Einfluss auf die Umverteilung von ZO-1 im Darmepithel zeigte. Es konnte keine synergistische oder additive Wirkung gefunden werden. Allerdings konnte für die apikale ZO-1-Expression ein Einfluss von DON abhängig von der Applikationsroute gefunden werden. So zeigten die Tiere der chronischen DON-Fütterungsgruppe keine Veränderungen der apikalen ZO-1-Expression, während in der Gruppe mit akuter intravenöser DON-Exposition (KON_DON) verglichen

mit den LPS-infundierten Tieren eine starke ZO-1-Schädigung im mittleren Jejunum nachgewiesen werden konnte (Klunker et al. 2012).

In der vorliegenden Untersuchung wurde das Hauptaugenmerk dagegen auf die Leber gelegt, die als erste metabolisierende Station wohl als erstes von der DON- und LPS-Toxizität betroffen ist. Durch ihre Fähigkeit zur Clearance, Detoxifikation und Produktion von Akute-Phase-Proteinen sowie anderen inflammatorischen Mediatoren ist die Leber neben ihrer Stoffwechselfunktion von großer Bedeutung für die Abwehr des Körpers (van Amersfoort et al. 2003). Aufgrund dieser Funktionen und durch die Anwesenheit beider Toxine mit der vermuteten potenzierenden Wirkung könnte die Leber in einem starken Maß betroffen sein.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der vermuteten potenzierenden Interaktion zwischen DON und LPS bezogen auf die Lebermorphologie und -funktion beim Schwein.

4.3 Einfluss von DON auf die Lebermorphologie und -funktion

Natürlich kontaminiertes DON-Getreide zeigt generell eine stärkere toxische Wirkung, als würde es mit der reinen Form des Schimmelpilzgiftes versetzt werden (D’Mello et al. 1999, Trenholm et al. 1994). Pestka (2010a) mutmaßte als Grund für die höhere Toxizität des natürlich kontaminierten DON-Getreides das Vorkommen von zusätzlichen Toxinen, wie Acetyl-DON oder DON-Glykosiden sowie anderen Schimmelpilzanteilen, welche zur verstärkten Wirkung von DON beitragen würden. So kommen zum Beispiel häufig Lagerpilze wie *Penicillium* und *Aspergillus* sowie deren Toxine im Getreide vor und könnten für erhöhte Toxizität verantwortlich sein (D’Mello et al. 1999, Gutzwiller und Gafner 2012). Auch Dänicke (2001) schrieb die Wirkung des „Mykotoxin-Cocktails“ in natürlich kontaminiertem Getreide nicht allein dem Leit-Toxin DON zu.

Neben der Futterzusammensetzung hat das verwendete Tiermodell Einfluss auf die Untersuchung selbst. So postulierten Dersjant-Li et al. (2003), dass die Effekte von DON in Tieren mit hoher Proteinretention größer wären, also zum Beispiel in jüngeren gegenüber älteren Tieren. Außerdem scheint das Geschlecht der Tiere eine Rolle zu spielen, denn es zeigte sich, dass männliche Schweine sensibler als weibliche Tiere auf DON reagierten (Cote et al. 1985, Friend et al. 1986, Goyarts et al. 2005). Im vorliegenden Versuch wurden nur männliche Tiere untersucht, sodass es nicht zu einem geschlechtsspezifischen Effekt kommen konnte. Bezogen auf die Herstellung der Futtermischung wurde bis auf den Weizen mit exakt der gleichen Zusammensetzung gearbeitet. Der Fusarien-kontaminierte Weizen stammte von einem Versuchsfeld und wurde so unter den Kontrollweizen gemischt, dass 3,1 mg DON/kg Futter enthalten war.

Das Vorliegen und somit die Wirkung weiterer unbekannter Toxine wären denkbar, wurde aber nicht weiter untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte bezogen auf die Lebendmasse der Schweine kein signifikanter Effekt gefunden werden. In der Literatur wurde jedoch für das Körpergewicht eine Abnahme durch DON gezeigt. So reduzierte DON laut Iverson et al. (1995-1996) nicht nur die mittlere tägliche Futtermittelaufnahme, die mittlere Gewichtszunahme und das totale Körpergewicht von Mäusen, sondern auch von Schweinen. Die verminderte Futtermittelaufnahme bei Schweinen konnte nach kombinierter Applikation von DON mit Aflatoxin nachgewiesen werden (Rotter et al. 1994, Smith et al. 1997, Swamy et al. 2002, Goyarts et al. 2005, Cheng et al. 2006, Chaytor et al. 2011). Die daraus resultierende Abnahme des Körpergewichts bei Schweinen wurde durch Harvey et al. (1989) und Chaytor et al. (2010, 2011) dokumentiert. Im Gegensatz dazu kam es in der vorliegenden Studie aufgrund des restriktiven Fütterungsregimes weder zu einer verminderten Futtermittelaufnahme noch zu einer folgenden Reduzierung des Körpergewichtes. Weiterhin muss eine Gewöhnung der Schweine an die chronische Toxinapplikation bedacht werden. Rotter et al. (1994) konnten eine Adaptation an die Fütterung mit DON (3 mg/kg Futter) nach vierwöchigem Experiment nachweisen. Hierbei stagnierte der Gewichtszuwachs in gleichem Maße wie die Kontrolle, nachdem in den ersten sieben Tagen ein steter Abfall zu verzeichnen war. Bergsjö et al. (1993) konnten in einem Fütterungsversuch mit DON eine Abnahme des erwarteten Gewichtszuwachses und infolgedessen ein geringeres Schlachtgewicht bei Schweinen nachweisen. Außerdem zeigte sich eine Zunahme des Lebergewichts der Tiere nach Fütterung mit DON (3,5 mg/kg Futter). In der hier vorliegenden Arbeit konnte dagegen kein signifikanter Einfluss von DON auf das absolute sowie das relative Lebergewicht der Schweine demonstriert werden. Es ist möglich, dass wie im vorliegenden Experiment eine Studiendauer von 37 Tagen für einen sichtbaren Einfluss zu gering ist. In Studien, welche andere Spezies untersuchten, gab es allerdings auch keinen ersichtlichen Effekt durch das Mykotoxin auf Organengewichte oder das Verhältnis von Organgewicht zu Gesamtgewicht, wie beispielsweise bei Ratten oder Mäusen (Gouze et al. 2006, Sprando et al. 2005). Im Gegensatz dazu konnte eine Erhöhung des Lebergewichtes und des relativen Lebergewichtes unter Einfluss von DON bei Sprague-Dawley-Ratten nachgewiesen werden (Pestka 2007, Pestka und Smolinski 2005).

In Hinblick auf die makroskopische Leberuntersuchung beim Schwein konnte in der vorliegenden Untersuchung kein Effekt durch Fütterung oder Infusion von DON eruiert werden. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit den Untersuchungen an Jungsauen von Goyarts

et al. (2007) und Tiemann et al. (2008). Diese Experimente zeigten, dass die Fütterung mit 4,4 mg DON/kg Futter vom 35. bis 70. Tag der Gestation, was einer Aufnahme von 49 µg DON/kg KG/d entspricht, in keiner Weise die Lebermorphologie, Blutchemie oder Organfunktion von Milz und Nieren beeinflusste. So scheint DON p.o. auch während der Entwicklungsphase des Organismus keine Schädigung der Leber hervorzurufen.

Bezogen auf die mikroskopische Evaluation konnte im vorliegenden Experiment mit Hilfe des angewendeten histologischen Aktivitätsindexes eine qualitative Differenzierung vorgenommen werden. Dieser Index, welcher sonst in der Humanmedizin Anwendung findet (Schirmacher et al. 2004), wurde erstmalig auf ein Tiermodell verwandt. Betrachtet man ausschließlich den Einfluss von DON auf die Lebermikroskopie, so zeigten sich im Gesamtindex die geringsten histologischen Veränderungen für die beiden Mykotoxin-Gruppen KON_DON und DON_KON. Das Schädigungsmuster der Kombinationsgruppe KON_DON/LPS zeigte sich bezogen auf diese beiden Mykotoxin-Gruppen signifikant stärker ausgeprägt. Diese Beobachtung konnte im Gesamtindex gemacht werden, aber für die Gruppe KON_DON auch in der Kategorie der Hämorrhagien sowie der eosinophilen periportalen und azinären Entzündung. Durch die Kombination der beiden Toxine kommt es demnach zu einer stärkeren Schädigung des Leberparenchyms. Allerdings konnte weder ein signifikanter additiver noch ein synergistischer Effekt gefunden werden. Eine alleinige schädigende Wirkung von oral appliziertem DON bezogen auf die Leber konnte bisher in der Literatur für das Schwein *in vivo* nicht nachgewiesen werden (Goyarts et al. 2007, Tiemann et al. 2008). Im Gegensatz dazu demonstrierten Mikami et al. (2010) einen schädigenden Effekt auf hepatisches Gewebe *in vivo* durch eine akute hochdosierte DON-Injektion (1000 µg/kg KG) bei Jungsauen. Schon sechs Stunden nach DON-Exposition fanden sich in der Immunhistochemie der untersuchten Schweinelebern apoptotische Körperchen und DNA-Strangbrüche, wobei sich dieser Anteil nach 24 Stunden wieder normalisierte. Dagegen waren die beobachteten panazinären Nekrosen in einigen Tieren nicht nur nach sechs Stunden, sondern auch nach 24 Stunden noch nachweisbar. Diese Ergebnisse stehen ganz im Gegensatz zu den hier erhobenen, denn in der vorliegenden Studie konnten weder einzelne noch konfluente Nekrosen hervorgerufen durch DON signifikant evaluiert werden. Generell scheint die Entstehung von Nekrosen einen längeren Zeitraum als die drei Stunden im vorliegenden Versuch in Anspruch zu nehmen. Mikami et al. (2010) nutzen in ihrem Experiment zudem eine zehnfach höhere DON-Dosierung (1000 µg DON/kg KG i.v.), was ebenfalls eine Ursache für die beobachteten Unterschiede darzustellen vermag.

Für die intrahepatischen Hämorrhagien stellte sich in der vorliegenden Arbeit ein ähnliches Bild dar. Bei alleiniger Gabe von DON i.v. oder p.o. konnte keine oder nur eine geringe Blutungsneigung gefunden werden. Weiterhin konnte keine Induktion von einzelnen oder konfluierenden Nekrosen durch DON beobachtet werden. Dagegen wurden in der Literatur histologische Leberveränderungen in einem Fütterungsversuch mit DON und ZON durch Tiemann et al. (2006) beschrieben. Sie konnten vorrangig in den Gruppen III (6100 µg DON und 235 µg ZON/kg Futter) und IV (9570 µg DON und 358 µg ZON/kg Futter) eine Abnahme von Glykogen, Anreicherung von Hämosiderin sowie Zunahme von intralobulärem Kollagen, Fettvakuolen und phagozytierenden Vakuolen verzeichnen. Allerdings kam es nicht zu einer Erhöhung der Transaminasen, was die Abwesenheit von Lebernekrosen in diesem Versuch erklären könnte. Ebenso wurden in der Literatur nach kombinierter Fütterung von 1 mg DON und 250 µg ZON/kg Futter bereits die Bildung von Nekrosen sowie intrahepatische Gefäßwandverdickung, Gefäßdilataationen und Blutungen bei den untersuchten Schweinen *in vivo* beschrieben (Cheng et al. 2006 und Chen et al. 2008). Hierbei wurde außerdem über eine Erhöhung von GGT, ASAT und ALAT durch DON und ZON im Sinne einer chemischen Multi-Organ-Toxizität berichtet (Cheng et al. 2006). Diese Untersuchungen verwendeten DON allerdings nicht als einziges Agens, sondern in Kombination mit ZON, weshalb kein alleiniger DON-Effekt beschrieben werden konnte. In der vorliegenden Arbeit konnte kein Einfluss durch DON auf die diese Parameter eruiert werden.

Für die Gesamtproteinkonzentration im Schweineblut zeigte sich bei der vorliegenden Analyse ein signifikanter Abfall in der Gruppe DON_KON für die Messzeitpunkte 30 min und 120 min nach Start der Infusion. Diese bereits in der Literatur beschriebene Abnahme der Serumproteinkonzentration nach DON-Fütterung konnten Döll et al. (2003) mit 3,9 mg DON/kg Futter und Bergsjö et al. (1993) mit 3,5 mg DON/kg Futter ebenfalls bei Schweinen zeigen. Da ein Großteil der Serumproteine in der Leber synthetisiert wird, könnte bei einer Verminderung derselben eine Lebersynthesestörung vorliegen. Schon leichte Verschiebungen des Blutvolumens können eine solche Veränderung verursachen. Accensi et al. (2006) konnten dagegen keine Veränderung in der Blutchemie oder der Immunantwort nach Fütterung von Schweinen mit DON feststellen. Allerdings wurden hier auch niedrige Konzentrationen (280, 560 oder 840 µg DON/kg Futter) des Mykotoxins verwendet. Kullik et al. (2013a) konnten ebenfalls keinen alleinigen Einfluss von DON auf die Proteinsyntheserate der Schweineleber *in vivo* oder auf die Albuminsynthese eruiieren.

Insgesamt lässt sich sagen, dass weder die Fütterung noch die Infusion von DON einen wesentlichen schädigenden Einfluss auf die Lebermorphologie und -funktion beim Schwein gezeigt haben.

4.4 Einfluss von LPS auf die Lebermorphologie und -funktion

Im Kontrast zu den fehlenden DON-Effekten hatte LPS einen bedeutenden Einfluss auf die Morphologie und Funktion der Schweineleber in der vorliegenden Untersuchung. Für die Lebendmasse und das Lebergewicht konnten zwar keine signifikanten Effekte nachgewiesen werden, doch das relative Lebergewicht zeigte einen Gruppeneffekt. Betrachtet man die LPS-enthaltenden Gruppen genauer, so fällt auf, dass die relativen Lebergewichte um circa 20% im Vergleich zu den anderen Gruppen erhöht waren. Diese beobachtete Erhöhung scheint aus den tendenziell niedrigeren Lebendmassen und höheren Lebergewichten der Gruppen KON_LPS, KON_DON/LPS und DON_LPS hervorzugehen. Eine Erhöhung des Lebergewichts nach Infusion mit LPS wurde zuvor bei Hühnern und Hunden in der Literatur beschrieben (Mireles et al. 2005, MacLean et al. 1956). Die Ursache dieser durch das Endotoxin hervorgerufenen relativen Lebergewichtszunahme scheint im Auftreten von hepatischen Blutungen zu liegen.

In der vorliegenden Arbeit konnten schon in der makroskopischen Untersuchung Hämorrhagien in Form von dunkelrot gefärbten Leberoberflächen und blutigem Parenchym bei den LPS-infundierten Tieren beobachtet werden. Weiterhin wurden Petechien, Ekchymosen und Sugillationen an der Leberoberfläche der LPS-Gruppen vorgefunden. Als Ursache der intrahepatischen Blutungen kann eine erhöhte Membranpermeabilität in den Endothelzellen durch Apoptose einzelner Zellen mit nachfolgender Diapedese, verursacht durch LPS, angenommen werden (Frey und Finlay 1998, Cybulsky et al. 1988). In der Literatur konnten Korish und Arafa (2011) eine septische Reaktion durch LPS-Infusion (20 mg/kg KG) in Ratten auslösen. Die Leberhistologie reichte dabei von Apoptosen und Nekrosen über Blutungen bis hin zur Infiltration mit Entzündungszellen. Die Makroskopie der LPS-infundierten Organe der Ratten zeigte tiefrote bis schwarze Färbungen und ähnelte dem Bild einer Stauungsleber. Diese makroskopischen Beobachtungen nach LPS-Infusion konnten durch die vorliegende Untersuchung beim Hausschwein bestätigt werden. Utili et al. (1977) postulierten, dass solche hämorrhagischen Veränderungen durch Schock induziert seien. Das bakterielle Endotoxin verursache Vasodilatation, aber führe auch zu Hämostase und einer erhöhten intravasalen Gerinnung (Dauphinee und Karsan 2006).

Pathohistologisch konnte in der vorliegenden Studie ebenfalls ein starker Einfluss durch LPS vorgefunden werden. Mit Hilfe des histologischen Aktivitätsindex konnte eine quantitative Einschätzung des Schädigungsgrades der Schweinelebern erfolgen und somit eine Vergleichbarkeit der histologischen Beobachtungen hergestellt werden. Hierbei hoben sich im Gesamtindex die LPS-Gruppen deutlich von den anderen Gruppen durch einen höheren erreichten Index ab. Da ein höherer Aktivitätsindex definitionsgemäß mit einer größeren histologischen Beeinträchtigung einhergeht, konnte ein schädigender Einfluss von LPS geschlussfolgert werden. Betrachtet man ausschließlich die Gruppe mit alleiniger LPS-Infusion (KON_LPS), so ist ein signifikanter Effekt ausschließlich in den Leberazini zu sehen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren eine signifikant stärkere neutrophile und eosinophile Entzündungsreaktion in den Azini zu beobachten. Auch gegenüber der Gruppe KON_DON zeigte KON_LPS eine signifikant stärkere histologische Aktivität bezogen auf die Migration von Eosinophilen im Leberazinus. Zu einer vorwiegend azinären Wirkung des Toxins könnte es in Folge einer venösen Abflussstauung gekommen sein. Ein solcher Zustand kommt beispielsweise bei Auftreten einer Stauungsleber aufgrund von Schock vor. Im septischen Schock ist die Leber neben ihrer normalen metabolischen Funktion mit den zusätzlich anfallenden Prozessen der Immunabwehr überlastet. Die Hepatozyten werden durch die Akkumulation metabolischer Endprodukte geschädigt. Daneben kommt es zur Störung der DNA-Synthese, was wiederum die Regenerationsfähigkeit der Leber beeinträchtigt (Antoniades et al. 2008).

Saetre und Kollegen stellten den septischen Verlauf in Schweinen nach sechsständiger Infusion mit *E.coli*-LPS (1,7 µg/kg KG) genauer dar. Es erfolgte die Entnahme von Leberproben vor, während und nach der Infusion. Schon nach einer Stunde wurden Leukozyteninfiltrate, Gewebsödem und Dilatation der Sinusoide sichtbar. Nach drei Stunden kam es zu Endothelschäden, Akkumulation von Lipiden in den Hepatozyten und zur Schädigung des Parenchyms. Des Weiteren wurden Thromben und phagozytierende Kupffer-Zellen in der Histologie auffällig. Die genannten Veränderungen dehnten sich nach sechs Stunden aus und es kam zusätzlich zu hepatischen Nekrosen (Saetre et al. 2001). Ähnliche Beobachtungen machten auch Nakajima und Kollegen, obwohl es erst 24 Stunden *post infusionem* zu Nekrosen kam. Die Endotoxinämie wurde in den untersuchten Schweinen durch eine Infusion von 100 µg/kg KG *E.coli*-LPS ausgelöst. Dabei reichte die Anzahl der untersuchten Tiere von eins bis drei, was eine statistische Auswertung durch die geringe Menge fragwürdig macht (Nakajima et al. 1995). Die in der Literatur beschriebenen Leberveränderungen konnten zumeist ebenfalls in den hier untersuchten Hausschweinen nachgewiesen werden, obwohl es keine Signifikanz für einzelne oder

konfluente Nekrosen gab. Ein möglicher Grund dafür könnte der Zeitpunkt der Probenentnahme in Relation zur Infusionsdauer sein. Der Zeitpunkt der Schlachtung erfolgte 195 min nach Start der Infusion, wobei nekrotische Herde als Folge einer Sepsis frühestens nach sechs Stunden oder später beschrieben sind. Obwohl die Leber eine hohe Regenerationsrate und schnelle Clearance von apoptotischen Zellen *in vivo* (Ihara et al. 1997) aufweist, benötigt sie in der Regel eine Dauer von 200 bis 300 Tagen für die vollständige Regeneration von Hepatozyten (Berlakovich 2011).

Martens und Kollegen provozierten eine Sepsis in Schweinen durch eine vierstündige Infusion von *Aeromonas hydrophila* (10^9 ; 0,2 - 4,0 ml/kg KG/h schrittweise infundiert), einem gramnegativen γ -Proteobakterium, und untersuchten anschließend die Leber (Martens et al. 2007). Die histologische Untersuchung wies ballonierte Hepatozyten und mit Blut gefüllte Sinusoide auf, was intrahepatischen Hämorrhagien entspricht. Zu solchen Einblutungen kann es aufgrund von Verletzung des Gefäßendothels kommen. Diese Leckagen in den Endothelzellen werden durch die Induktion von Zytokinen und anderen Mediatoren, wie Endothelin-1 und Thromboxan, verursacht (Yachida et al. 1998). Auch LPS induziert die Produktion von Zytokinen, wie beispielsweise von IL-1, IL-6 und TNF- α (van Amersfoort et al. 2003). Es konnte in der vorliegenden histologischen Untersuchung kein Einfluss von LPS allein auf die intrahepatische Blutungsneigung in den Schweinelebern nachgewiesen werden. Allerdings könnten möglicherweise sekundäre Störungen auftreten, denn die Endotoxin-geschädigte Leber könne sich laut Secchi et al. (2000) durch die interstitiellen Hämorrhagien nicht mehr an den reduzierten portalen Blutfluss anpassen, woraufhin die Hepatozyten und Kupffer-Zellen nicht mehr adäquat perfundiert würden und es zur eingeschränkten Leberfunktion kommen würde. Über sekundäre Veränderungen in der Leberfunktion durch Infusion von *E.coli*-LPS wurde in der Literatur bereits berichtet. Dabei variierte die pathologische Erhöhung der Konzentration von Bilirubin zwischen 30, 180 und 300 min, während ASAT im Verlauf der Zeit anstieg und frühestens nach 180 min eine pathologische Konzentration erreichte (Myers et al. 2010, Eriksson et al. 1998, Saetre et al. 2001). Das Ausmaß der Leberschädigung durch Injektion von *Staphylococcus aureus* wurde gezeigt durch Leifsson und Kollegen, die mittels bakterieller Injektionen in die Ohrvene bei Schweinen eine Sepsis auslösten (1 ml 10^8 *St. aureus*/kg KG). Die Bakteriämie führte zu einer vermehrten Leukozyteneinwanderung in die Leber mit einem Maximum 24 Stunden *post infectionem*. Nach 36 Stunden kam es bei zweimaliger Bakterieninjektion (nach 0 und 12 h) zu einer pathologischen Konzentrationserhöhung von Bilirubin und ASAT sowie nach 48 Stunden zur Exsudation von Fibrin, dem Auftreten von Mikroabszessen und fokalen Nekrosen

(Leifsson et al. 2010). Eine Laborwerterhöhung von Bilirubin und ASAT konnte auch in dem vorliegenden Experiment beobachtet werden. Außerdem zeigten die kontrollgefütterten und LPS-infundierten Schweine signifikante Veränderungen in der Blutchemie für das Gesamtprotein und -bilirubin. Es wurde zwar ein ASAT-Anstieg über die Zeit gemessen, welcher sich jedoch im physiologischen Bereich befand und keine statistische Signifikanz erreichte, wohingegen das Gesamtbilirubin zum Zeitpunkt $t_5 = 180$ min nach Start der Infusion über den physiologischen Grenzwert erhöht war. Eine Hyperbilirubinämie resultiert meist aus einer Störung des Häm-Metabolismus und entsteht aufgrund von Erkrankungen der Leber und der Gallengänge. Eine Schädigung der Gallengänge kann im vorliegenden Versuch durch eine fehlende Veränderung der GGT, einem Enzym der hepatischen Gallengänge, ausgeschlossen werden. Eine ASAT- und GLDH-Erhöhung würde durch Freisetzung aus dem Zellinneren, wie zum Beispiel bei der Apoptose oder Nekrose, erfolgen. Beide Enzyme sind in der Mitochondrienmembran und im Zytoplasma der Hepatozyten sowie im Gewebe des Herzmuskels und der Nieren lokalisiert. Allerdings konnte keine porcine hepatische Nekrosenbildung durch LPS beobachtet werden, was durch die physiologischen Werte von ASAT und GLDH gestützt wird. Zur genaueren Klärung der Ursache der Bilirubinerhöhung durch LPS wäre eine Unterteilung in direktes und indirektes Bilirubin hilfreich, weil so zwischen einer prä-, intra- und posthepatischen Cholestase besser unterschieden werden kann.

Albumin wird als das häufigste Plasmaprotein in der Leber produziert. Eine Abnahme der Albuminkonzentration ist deshalb direkt mit einer hepatischen Synthesestörung und folglich mit einer abnehmenden Leberfunktion verknüpft. Zu einer Leberfunktionsstörung kann es zum Beispiel im Rahmen eines septischen Geschehens durch die systemische Wirkung von Endotoxinen kommen. Die Serumkonzentration von Albumin nahm in der vorliegenden Untersuchung nach der Infusion von LPS zwar über die Zeit ab, doch das Maß der Abnahme war nicht stark genug, als dass sich Signifikanzen gegenüber den anderen Behandlungen gezeigt hätten. Dagegen konnte für die alleinige Gabe von LPS in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Abnahme der Gesamtproteinkonzentration über die Zeit nachgewiesen werden. Im Rahmen desselben Versuchsaufbaus berichteten Kullik et al. (2013a, b) unabhängig von der DON-Gabe ebenfalls über eine signifikant verringerte Protein- und Albuminsyntheserate der Leber nach LPS-Infusion. Der beobachtete Trend wurde bereits von Bruins und Kollegen als Proteinabnahme nach einer 24-Stunden-Infusion von $3 \mu\text{g } E.coli\text{-LPS/kg KG}$ beschrieben, welcher auch noch 24 Stunden später anhielt (Bruins et al. 2002). Als Ursache wäre eine sekundäre Störung der Proteinsynthese aufgrund von Leberstauung denkbar.

Ein Grund für die beobachteten Veränderungen in der Lebermorphologie und -funktion während der induzierten septischen Bedingungen könnte der Einfluss auf die hepatische Blutzirkulation darstellen. Über eine deutlich reduzierte venöse Leberperfusion in der Portalvene und auch arteriell in den Leberarterien wurde drei Stunden nach einer Infusion mit *E.coli*-LPS (1,7 µg/kg KG) berichtet (Saetre et al. 2001). Der Abfall der Leberperfusion mit nachfolgend abnehmender Sauerstoffversorgung wurde schon von anderen Autoren dokumentiert, die unterschiedliche Konzentrationen von *E.coli*-LPS verwendeten (0,5 µg/kg KG über 180 min und 2,5 µg/kg KG über 300 min) (Dahm et al. 1999, Andersson et al. 2010). Durch die insuffiziente Sauerstoffversorgung kam es in der Folge zu einem Wechsel von der aeroben zur anaeroben Glykolyse, woraufhin ein Anstieg des Laktatspiegels im peripheren Blut entstand. Dieser Umstand führte wiederum zur Schädigung der Hepatozyten und Endothelzellauskleidung der Sinusoide in der Leber. Daraufhin kam es durch Diapedese zu intrahepatischen Blutungen, welche gehäuft im septischen Zustand auftraten. Obwohl im vorliegenden Experiment keine Messung der Blutflussgeschwindigkeiten in der Portalvene und Leberarterie oder gar der Mikrozirkulation vorgenommen wurde, kann es zu einer Sauerstoffmangelversorgung der Schweineleber aufgrund der Endotoxämie gekommen sein. Diese könnte in der Folge zu den Schäden in der Lebermorphologie und -funktion beigetragen haben.

4.5 Wirkung der Kombination von DON und LPS

Um die verschiedenen DON-Effekte zu verstehen, ist die Untersuchung von Interaktionen mit anderen Agenzien, wie beispielsweise LPS, und die darauffolgende Reaktion von Tier und Mensch notwendig. In der Literatur wurde bereits eine verstärkende Wirkung durch Kombination von DON und LPS postuliert. Döll et al. (2009a, b) untersuchten die *in vitro*-Wirkung von DON auf primäre hepatische Zellkulturen vom Schwein mit und ohne Zugabe von LPS. Die Untersuchung der porcinen Hepatozyten *in vitro* ergab eine synergistische Reaktion von DON und LPS in Form einer signifikant erhöhten mRNA-Expression von TNF- α (Döll et al. 2009b). In einem zweiten *in vitro*-Versuch konnte in porcinen Hepatozytenkulturen eine tendenziell verminderte Proteinsynthese für 2 µmol/l DON bei Zugabe von 1 µg/ml LPS nachgewiesen werden (Döll et al. 2009a). Der gleiche Effekt zeigte sich für die Albuminkonzentration, welche sich bei kombinierter Gabe von DON und LPS signifikant reduzierte. Es konnte ein synergistischer Effekt beider Toxine angenommen werden. Im gleichen Sinne postulierten Islam und Pestka eine verstärkte immunogene DON-Wirkung bei Mäusen *in vivo* durch erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine nach vorheriger LPS-Gabe (Islam und Pestka 2006).

Hierbei wurde DON aber erst im zweiten Schritt des Tiermodells nach der Applikation von LPS dazugegeben. Den Tieren wurde zunächst LPS von Salmonellen (1 mg/kg KG) intraperitoneal appliziert, wonach sie acht Stunden später mit DON (12,5 mg/kg KG) gefüttert wurden. Die Mäuse mit vorheriger LPS-Injektion zeigten noch 24 Stunden später eine erhöhte Sensitivität gegenüber DON mit längerer und erhöhter Zytokinausschüttung. Die minimale Dosis von DON zur Zytokininduktion war nach vorheriger LPS-Gabe erniedrigt. Diese Ergebnisse implizierten eine erhöhte Empfindlichkeit des Organismus verursacht durch DON mit verstärkter Immunantwort durch vorherige LPS-Stimulation.

Auch im vorliegenden Versuch zeigten hauptsächlich die LPS-infundierten Tiere klinische Anzeichen einer Sepsis. Kullik et al. berichteten ebenfalls über den hier vorliegenden Versuch und beobachteten die Symptome der Tiere nach Infusion mit LPS oder DON genauer. Die Schweine reagierten nach LPS-Infusion mit Tachykardie, Fieber, Dyspnoe und Tremor. Des Weiteren waren Rötungen oder Einblutungen der Skleren auffällig. Die rektale Temperatur stieg innerhalb von drei Stunden von im Mittel 38,7 °C auf bis über 40 °C nach LPS-Injektion an. *Post infusionem* konnte außerdem bei 11 von 18 LPS-Tieren das Auftreten von Dermographismus beobachtet werden. Im Verlauf traten weiterhin Symptome wie Würgereiz und Erbrechen der Tiere auf. Zwar löste die DON-Infusion bei einigen Tieren Erbrechen aus, doch meist ohne Assoziation mit Symptomen einer Sepsis. Die Tiere der Kontrollgruppe und die chronisch mit DON gefütterten Tiere zeigten sich dagegen klinisch unauffällig (Kullik et al. 2013b).

In der vorliegenden Arbeit konnte für die Lebendmasse, das absolute und das relative Lebergewicht kein synergistischer Effekt für DON und LPS nachgewiesen werden. Zwar waren die relativen Lebergewichte aller LPS-Gruppen in gleichem Maße erhöht, doch war kein signifikanter Unterschied zwischen vorheriger DON-Fütterung oder gleichzeitiger DON-Infusion im Vergleich zur alleinigen LPS-Gabe zu eruieren. Auch in Bezug auf die Makroskopie konnte nicht zwischen alleiniger LPS-Applikation oder einer Kombinationsgruppe unterschieden werden. Es waren in allen LPS-Gruppen die ähnlich ausgeprägten hämorrhagischen Veränderungen mit Petechien, Sugillationen und Ekchymosen sichtbar.

Die chronische orale Exposition mit dem Vomitoxin hatte also keinen Einfluss auf das Lebergewicht und die Makroskopie, dagegen waren die Lebern der mit LPS infundierten Tiere schwerer, was mit den sichtbaren Hämorrhagien zusammenhängen kann. Es scheint also zu einem akuten intrahepatischen Blutungsereignis ausschließlich nach Infusion mit dem Endotoxin gekommen zu sein. So beobachteten auch Leifsson et al. (2010) und Saetre et al. (2001) das Auftreten von Gerinnungsstörungen und nachfolgend eine intrahepatische

Bildung von Thromben nach Endothelzellschädigung aufgrund von Endotoxinämie oder Bakteriämie. Wahrscheinlich traten diese Veränderungen im Rahmen einer DIC auf, worunter es ebenfalls zu Einblutungen in die Leber kommen kann. Für die Analyse der intrahepatischen Hämorrhagien fiel die Gruppe KON_DON/LPS mit der höchsten Punktzahl und somit stärksten Blutungsneigung auf, zeigte aber keine Signifikanz im Vergleich zu den ausschließlich mit LPS infundierten Tieren der Gruppe KON_LPS und DON_LPS. Darum kann auch hier ein synergistischer oder potenzierender Effekt ausgeschlossen werden. Jedoch konnten vermehrte Hämorrhagien für KON_DON/LPS in Bezug auf KON_DON gefunden werden, was wiederum für einen schädigenden Einfluss durch Zugabe von LPS spricht.

Insgesamt zeigte sich für die Gruppe KON_DON/LPS bei der mikroskopischen Evaluation in sechs von zehn Merkmalen ein signifikant erhöhter Aktivitätsindex, was für eine starke Schädigung auf Gewebsebene spricht. Es konnte zwar kein signifikant erhöhter Gesamtindex für KON_DON/LPS im Vergleich zur Kontrollgruppe KON_KON nachgewiesen werden, doch gegenüber KON_DON zeigte die Kombinationsgruppe einen doppelt so hohen Index. Dabei scheint jedoch kein potenzierender Effekt vorzuliegen, sondern der erhöhte Index allein durch LPS verursacht zu sein, denn auch die anderen LPS-infundierten Gruppen wie KON_LPS und DON_LPS zeigten einen deutlich erhöhten Index, auch wenn die Gruppen selbst keine Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe erreichen konnten.

Ähnlich verhielt es sich für die Merkmale der Entzündungsreaktion. Hier konnte für die eosinophile Zellmigration in jedem Leberabschnitt eine signifikant stärkere Schädigung bei kombinierter Toxingabe gefunden werden. Periportal und azinär war diese Signifikanz bezogen auf die alleinige DON-Injektion nachzuweisen, was wiederum einen potenzierenden Effekt durch Zugabe von LPS vermuten ließe. Allerdings war kein Unterschied zur alleinig mit LPS infundierten Gruppe zu eruieren. Die vorherige chronische Exposition mit DON über das Futter zeigte ebenfalls keinen potenzierenden Effekt bei Zugabe von LPS i.v. im Vergleich zur alleinigen intravenösen Applikation von LPS. Zusammenfassend konnte keine stärkere Schädigung auf Gewebsebene durch Kombination der Toxine evaluiert werden.

Ein präventiver Effekt durch Fütterung von DON vor der LPS-Infusion konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Die Tiere der Gruppe DON_LPS unterschieden sich im Gesamtindex nicht wesentlich von den Kontrolltieren. Auch die Signifikanz von DON_LPS zur Gruppe KON_LPS, welche einen Einfluss durch chronische orale DON-

Exposition suggerieren würde, fehlt. Eine mögliche Desensibilisierung des hepatischen Zellsystems durch chronische DON-Fütterung vor LPS-Infusion fand somit nicht statt.

Legt man das Augenmerk auf die Blutchemie, so ist ein mildernder Effekt durch vorherige DON-Fütterung lediglich bei der Evaluation der Bilirubinkonzentration zum Zeitpunkt $t_5 = 180$ min zu finden. Hier konnte eine signifikant geringere Bilirubinkonzentration für DON_LPS im Vergleich zur Kombinationsgruppe KON_DON/LPS nachgewiesen werden. Der Wert lag sogar noch unterhalb dem der Gruppe KON_LPS und scheint so einen präventiven Einfluss durch DON-Fütterung auf die nachfolgende Infusion mit dem Endotoxin zu haben. Jedoch konnte diese Art der Immunmodulation durch Fütterung mit DON-kontaminiertem Getreide für keinen anderen Parameter der klinischen Chemie belegt werden.

Ein abschwächender Effekt durch DON-Fütterung konnte in der Literatur bei einem Schweineversuch mit Injektion von immunogenem Ovalbumin gezeigt werden. Den Tieren wurde entweder Kontrollfutter, DON-kontaminiertes Getreide (3 mg/kg Futter), Fumonisin B-kontaminiertes Getreide (6 mg/kg Futter) oder ein Gemisch gefüttert. Anschließend war die Immunantwort der DON-gefütterten Tiere nach Ovalbumin-Infusion abgeschwächt in Bezug auf die Immunglobulinkonzentration, Lymphozytenproliferationsrate sowie die mRNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen. Die gemessene Serumalbuminkonzentration der DON-exponierten Tiere war ebenfalls niedriger als in der Kontrolle, wohingegen die Konzentration der GGT signifikant anstieg und sich ebenfalls ein signifikanter histopathologischer Leberschaden zeigte (Grenier et al. 2011). Dass Grenier und Kollegen in ihrer Arbeit einen signifikanten Leberindex für DON eruieren konnten, vermag an den verschiedenen Untersuchungskriterien liegen. Die Analyse von Grenier et al. erfolgte auf zellulärer Ebene, das heißt es wurden Vakuolenbildung im Zellkern und Zytoplasma sowie apoptotische Körperchen der Hepatozyten beobachtet, welche schon früher und bei niedrigeren Konzentrationen als in der vorliegenden Arbeit sichtbar waren. Dagegen konnten mit dem histologischen Aktivitätsindex aus der vorliegenden Arbeit erst spätere Veränderungen auf Gewebsverbandsebene betrachtet werden. Diese Art der Untersuchung kann erst spätere bzw. stärkere Veränderungen des Parenchyms erfassen. Rotter und Kollegen berichteten ebenfalls über eine abgeschwächte sekundäre Antikörperantwort in Schweinen, denen DON (3 mg/kg Futter) gefüttert wurde, gegenüber den Kontrolltieren nach der Immunisierung mit Schafs-Erythrozyten (Rotter et al. 1994). Die Fütterung mit DON schien die Immunantwort auf den anschließenden immunologischen Stimulus im Schwein abzuschwächen.

Für die restlichen Laborparameter zeigte die Kombination von DON und LPS i.v. fast durchgängig einen schädigenden Effekt. So konnte eine Erhöhung der ASAT und GLDH über die Zeit gezeigt werden, welche sich allerdings immer noch im physiologischen Bereich befand. Für Albumin und die Gesamtproteinkonzentration ergab sich eine signifikante Abnahme im zeitlichen Verlauf, was eine Beeinträchtigung der Lebersyntheseleistung bei kombinierter Toxinapplikation vermuten lässt. Denn auch für DON_LPS ließ sich eine signifikante Reduzierung des Gesamtproteingehaltes im Serum nachweisen, jedoch nicht für Albumin. Die Untersuchungen von Kullik et al. (2013b) stützen diese Annahme. Sie konnten mit demselben Versuchsaufbau und der Analyse des RNA-DNA-Quotienten für die Leber eine verminderte Ausrüstung der Zellen für die Proteinsynthese bei kombinierter Gabe von DON und LPS im Vergleich zur allein mit DON infundierten Gruppe nachweisen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die intravenöse Gabe von LPS sehr wohl einen schädigenden Einfluss unabhängig von der Zugabe von DON gezeigt hat. Doch der auffälligste Effekt auf die Lebermorphologie und -funktion wurde durch die kombinierte Infusion von DON und LPS erreicht, obwohl kein eindeutig potenzierender Effekt nachzuweisen war. Es ergab sich stattdessen der Hinweis auf einen abschwächenden Prozess durch vorherige DON-Fütterung in der Betrachtung der klinischen Chemie. Diese Veränderungen könnten den bereits in der Literatur diskutierten immunstimulierenden als auch immunsuppressiven Eigenschaften von DON zugeschrieben werden (Rotter et al. 1996).

4.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die kombinierte Gabe von Deoxynivalenol und Lipopolysaccharid über verschiedene Applikationsrouten am Hausschwein untersucht, um das gemeinsame Auftreten von Stressoren zu simulieren. Hierbei wurde in einer Fütterungsphase die chronische orale Belastung durch DON nachgestellt, um anschließend durch eine intravenöse Injektion von DON, LPS oder dem Toxingemisch eine Akutphase auszulösen. Denkbar wäre für nachfolgende Projekte eine Umkehrung der Versuchsreihenfolge, um eine mögliche Sensibilisierung oder Protektion durch akute Gabe von DON und LPS i.v. noch vor der chronischen Fütterung aufzudecken. Für eine Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede sollten neben männlichen Tieren auch weibliche in das Versuchsdesign eingeschlossen werden. Des Weiteren wäre an eine Verlängerung des Untersuchungszeitraumes zu denken, da es beispielsweise nicht vor sechs Stunden zum Auftreten von Gewebnekrosen in der Leber kommt (Saetre et al. 2001). Denkbar wäre außerdem die histologische Evaluation zu unterschiedlichen Versuchszeitpunkten mittels mehrmaliger Leberpunktion *in vivo* und somit eine Abbildung des Schädigungsmusters im zeitlichen Verlauf zusätzlich zur einmaligen Organentnahme am Versuchsende.

Bezogen auf die im vorliegenden Versuch untersuchten Parameter könnte neben dem entwickelten histologischen Aktivitätsindex auch für die makroskopische Untersuchung der Lebern ein Index entwickelt werden. Für den HAI existiert bereits ein zusätzliches Staging, welches das Auftreten einer Fibrose bis hin zur Zirrhose berücksichtigt (Schirmacher et al. 2004). Dieses könnte ebenfalls in einem nachfolgenden Experiment Anwendung finden.

Bei der Datenerhebung der Blutchemie wäre eine zusätzliche Bestimmung von direktem und indirektem Bilirubin hilfreich. Dadurch könnte eine Unterteilung der ursächlichen Cholestase in prä-, intra- oder posthepatisch erfolgen. Des Weiteren sollten ergänzende Bestimmungen der Leberenzyme wie der Alanin-Aminotransferase (ALAT oder Glutamat-Pyruvat-Transaminase [GPT]) und der alkalischen Phosphatase (AP) überdacht werden. Somit könnte beispielsweise auch der De-Ritis-Quotient (Quotient aus ASAT und ALAT) bestimmt werden, um Aussagen über die Schwere einer Leberschädigung zu treffen. Zusätzlich wäre die Ermittlung der Lebersyntheseleistung interessant. Diese könnte über die Analysen von Quick-Wert bzw. International Normalized Ratio (INR), Cholinesterase und Ammoniak abgebildet werden.

5 Zusammenfassung

Deoxynivalenol ist ein natürlich in Getreide vorkommendes Mykotoxin, welches für sein emetisches und immunmodulatorisches Potenzial bekannt ist (Rotter et al. 1996). Lipopolysaccharide sind ein Bestandteil der äußeren Bakterienmembran gramnegativer Erreger wie *E. coli* als fakultativ pathogener Kommensale des Gastrointestinaltraktes. Das Endotoxin weist zytotoxische und proinflammatorische Eigenschaften auf und gilt als potenzieller Auslöser einer Sepsis. Eine Potenzierung der toxischen Effekte beider Substanzen wurde an einem Mausmodell *in vivo* (Islam und Pestka 2006) und für Hepatozyten *in vitro* (Döll et al. 2009a, b) diskutiert. Die Untersuchung der Einflüsse von Deoxynivalenol und Lipopolysacchariden auf die Morphologie und Funktion der Schweineleber *in vivo* war das Ziel dieser Arbeit. Hierfür wurde ein geeigneter histopathologischer Index entwickelt: der histologische Aktivitätsindex (HAI). Des Weiteren wurden Körpergewicht, absolutes und relatives Lebergewicht der Tiere sowie leberspezifische Parameter im Schweineblut ausgewertet.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Deoxynivalenol-Exposition allein, sei es als Futterbestandteil oder in Form einer Infusion, keinerlei Einfluss auf die Lebermorphologie oder -funktion gezeigt hat. Dagegen konnte für die Gabe von Lipopolysacchariden ein signifikanter Effekt nachgewiesen werden. Das Endotoxin verstärkte die Entzündungsreaktion in den mit Kontrollfutter versorgten Tieren und verursachte gleichzeitig eine gestörte Leberfunktion.

In den Tieren, die das Kontrollfutter erhielten und anschließend mit der Kombination von Deoxynivalenol und Lipopolysacchariden infundiert worden waren, fanden sich weder ein vermutetes additives noch ein synergistisches Verhalten beider Toxine. Eine Ausnahme bildeten dabei die erhöhten Bilirubinwerte, welche einen additiven Effekt bei gleichzeitiger Infusion von Deoxynivalenol und Lipopolysacchariden im Vergleich zur alleinigen Toxin-Gabe vermuten lassen.

Interessanterweise schien die vorherige Fütterung der Lipopolysaccharid-infundierten Tiere mit Deoxynivalenol-kontaminiertem Futter die Auswirkungen auf Lebermorphologie und -funktion zu mildern. Es liegt nahe, dass die immunmodulatorischen Eigenschaften des Mykotoxins hierbei eine Rolle spielen.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Accensi F, Pinton P, Callu P, Abella-Bourges N, Guelfi J, Grosjean F, Oswald IP: Ingestion of low doses of deoxynivalenol does not affect hematological, biochemical, or immune responses of piglets. *J Anim Sci.* 84. 1935–1942 (2006)
- 2 Aderem A, Ulevitch RJ: Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature.* 406. 782–787 (2000)
- 3 Alnatura Produktions- und Handels GmbH: Produkt-Rückruf. (2011) URL: <http://www.alnatura.de/de/produkt-rueckruf-spirelli>, 21.01.2013
- 4 Andersson A, Fenhammar J, Weitzberg E, Sollevi A, Hjelmqvist H, Frithiof R: Endothelin-mediated gut microcirculatory dysfunction during porcine endotoxaemia. *Br J Anaesth.* 105. 640–647 (2010)
- 5 Antoniadou CG, Berry PA, Wendon JA, Vergani D: The importance of immune dysfunction in determining outcome in acute liver failure. *J Hepatol.* 49. 845–861 (2008)
- 6 Bauer J: The metabolism of trichothecenes in swine. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 102. 50–52 (1995)
- 7 Behre G, Hiddemann W: Endotoxinämie und Immuntherapie der Sepsis bei neutropenischen Tumorpatienten. In: Engelmann, L: Endotoxin, Infektion, Sepsis. *Pabst, Lengerich.* (1995) ISBN 9783931660031
- 8 Bergsjö B, Langseth W, Nafstad I, Jansen JH, Larsen HJ: The effects of naturally deoxynivalenol-contaminated oats on the clinical condition, blood parameters, performance and carcass composition of growing pigs. *Vet Res Commun.* 17. 283–294 (1993)
- 9 Berlakovich GA: Prometheus: Vision für die regenerative Medizin. *Ärzte Woche.* 3. (2011) URL: <http://www.springermedizin.at/fachbereiche-a-z/i-o/innere-medicin/hepatologie/?full=20411>, 12.06.2014
- 10 Beutler B, Cerami A: Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu Rev Biochem.* 57. 505–518 (1988)
- 11 Bhat RV, Beedu SR, Ramakrishna Y, Munshi KL: Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould-damaged wheat production in Kashmir Valley, India. *Lancet.* 1. 35–37 (1989)
- 12 Bondy GS, Pestka JJ: Immunomodulation by fungal toxins. *J Toxicol Environ Health Part A.* 3. 109–143 (2000)
- 13 Bone RC, Fisher CJ, JR, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA: Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med.* 17. 389–393 (1989)
- 14 Boulant JA: Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature. *Ann N Y Acad Sci.* 856. 108–115 (1998)
- 15 Bruins MJ, Lamers WH, Meijer AJ, Soeters PB, Deutz NEP: In vivo measurement of nitric oxide production in porcine gut, liver and muscle during hyperdynamic endotoxaemia. *Br J Pharmacol.* 137. 1225–1236 (2002)
- 16 Büttner MR: Synthetische LPS-bindende Peptide. Medizinische Fakultät - Universitätsklinikum Charité. Dissertation, Berlin. (2005) URL: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/buettner-mirjam-r-2005-01-24/PDF/Buettner.pdf>, 15.07.2014
- 17 CAST: Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. Council for Agricultural Science and Technology. Ames, Iowa (2003) ISBN 1-887383-22-0
- 18 Casteel SW, Turk JR, Cowart RP, Rottinghaus GE: Chronic Toxicity of Fumonisin in Weanling Pigs. *J Vet Diagn Invest.* 5. 413–417 (1993)

- 19 Chaytor AC, See MT, Hansen JA, de S, Middleton TF, Kim SW: Effects of chronic exposure of diets with reduced concentrations of aflatoxin and deoxynivalenol on growth and immune status of pigs. *J Anim Sci.* 89. 124–135 (2011)
- 20 Chaytor AC, See MT, Hansen JA, Souza LP de, Kendall TF, Middleton TF, Kim SW: Efficacy of feed additives to reduce the effects of chronic exposure to aflatoxin and deoxynivalenol on growth and immune status of pigs. *J Anim Sci.* 88. 818-818 (2010)
- 21 Chen F, Ma Y, Xue C, Ma J, Xie Q, Wang G, Bi Y, Cao Y: The combination of deoxynivalenol and zearalenone at permitted feed concentrations causes serious physiological effects in young pigs. *J Vet Sci.* 9. 39-44 (2008)
- 22 Cheng Y, Weng C, Chen B, Chang M: Toxicity of different Fusarium mycotoxins on growth performance, immune responses and efficacy of a mycotoxin degrading enzyme in pigs. *Anim Res.* 55. 579–590 (2006)
- 23 Cornelius C: Liver function: Clinical biochemistry of domestic animals. *Academic Press*, New York. (1989) ISBN 9780123963048
- 24 Cote LM, Beasley VR, Bratich PM, Swanson SP, Shivaprasad HL, Buck WB: Sex-related reduced weight gains in growing swine fed diets containing deoxynivalenol. *J Anim Sci.* 61. 942–950 (1985)
- 25 Cross A, Asher L, Seguin M, Yuan L, Kelly N, Hammack C, Sadoff J, Gemski P: The importance of a lipopolysaccharide-initiated, cytokine-mediated host defense mechanism in mice against extraintestinally invasive *Escherichia coli*. *J Clin Invest.* 96. 676–686 (1995)
- 26 Cybulsky MI, Chan MK, Movat HZ: Acute inflammation and microthrombosis induced by endotoxin, interleukin-1, and tumor necrosis factor and their implication in gram-negative infection. *Lab Invest.* 58. 365–378 (1988)
- 27 D’Mello J, Placinta C, Macdonald A: Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Anim Feed Sci Tech.* 80. 183–205 (1999)
- 28 Dahm PL, Thorne J, Myhre E, Grins E, Martensson L, Blomquist S: Intestinal and hepatic perfusion and metabolism in hypodynamic endotoxic shock. Effects of nitric oxide synthase inhibition. *Acta Anaesthesiol Scand.* 43. 56–63 (1999)
- 29 Dänicke S: Fusariumtoxine in der Tierernährung. *Lohmann-Information.* 4. 1–10 (2001) ISSN 1617-2892
- 30 Dänicke S, Beineke A, Goyarts T, Valenta H, Beyer M, Humpf H: Effects of a Fusarium toxin-contaminated triticale, either untreated or treated with sodium metabisulphite (Na₂S₂O₅, SBS), on weaned piglets with a special focus on liver function as determined by the ¹³C-methacetin breath test. *Arch Anim Nutr.* 62. 263–286 (2008)
- 31 Dänicke S, Goyarts T, Döll S, Grove N, Spolders M, Flachowsky G: Effects of the Fusarium toxin deoxynivalenol on tissue protein synthesis in pigs. *Toxico. Lett.* 165. 297–311 (2006)
- 32 Dänicke S, Valenta H, Döll S: On the toxicokinetics and the metabolism of deoxynivalenol (DON) in the pig. *Arch Anim Nutr.* 58. 169–180 (2004a)
- 33 Dänicke S, Valenta H, Klobasa F, Döll S, Ganter M, Flachowsky G: Effects of graded levels of Fusarium toxin contaminated wheat in diets for fattening pigs on growth performance, nutrient digestibility, deoxynivalenol balance and clinical serum characteristics. *Arch Anim Nutr.* 58. 1–17 (2004b)
- 34 Dauphinee SM, Karsan A: Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest.* 86. 9–22 (2006)
- 35 Dersjant-Li Y, Verstegen MWA, Gerrits WJJ: The impact of low concentrations of aflatoxin, deoxynivalenol or fumonisin in diets on growing pigs and poultry. *Nutr Res Rev.* 16. 223–239 (2003)

- 36 Diesing A, Nossol C, Dänicke S, Walk N, Post A, Kahlert S, Rothkötter H, Kluess J: Vulnerability of polarised intestinal porcine epithelial cells to mycotoxin deoxynivalenol depends on the route of application. *PLoS One*. 6. S. e17472 (2011a)
- 37 Diesing A, Nossol C, Panther P, Walk N, Post A, Kluess J, Kreutzmann P, Dänicke S, Rothkötter H, Kahlert S: Mycotoxin deoxynivalenol (DON) mediates biphasic cellular response in intestinal porcine epithelial cell lines IPEC-1 and IPEC-J2. *Toxicol Lett*. 200. 8–18 (2011b)
- 38 Dinarello CA: Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*. 77. 1627–1652 (1991)
- 39 Dinarello CA: Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *J Endotoxin Res*. 10. 201–222 (2004)
- 40 Doebber TW, Wu MS, Robbins JC, Choy BM, Chang MN, Shen T: Platelet activating factor (PAF) involvement in endotoxin-induced hypotension in rats. studies with paf-receptor antagonist kadsurenone. *Biochem Biophys Res Commun*. 127. 799–808 (1985)
- 41 Döll S, Dänicke S, Ueberschar KH, Valenta H, Schnurrbusch U, Ganter M, Klobasa F, Flachowsky G: Effects of graded levels of Fusarium toxin contaminated maize in diets for female weaned piglets. *Arch Tierernahr*. 57. 311–334 (2003)
- 42 Döll S, Schrickx J, Valenta H, Dänicke S, Fink-Gremmels J: Interactions of deoxynivalenol and lipopolysaccharides on cytotoxicity protein synthesis and metabolism of DON in porcine hepatocytes and Kupffer cell enriched hepatocyte cultures. *Toxicol Lett*. 189. 121–129 (2009a)
- 43 Döll S, Schrickx J, Dänicke S, Fink-Gremmels J: Interactions of deoxynivalenol and lipopolysaccharides on cytokine excretion and mRNA expression in porcine hepatocytes and Kupffer cell enriched hepatocyte cultures. *Toxicol Lett*. 190. 96–105 (2009b)
- 44 Drake TA, Cheng J, Chang A, Taylor FB: Expression of tissue factor, thrombomodulin, and E-selectin in baboons with lethal Escherichia coli sepsis. *Am J Pathol*. 142. 1458–1470 (1993)
- 45 Ehrlich KC, Daigle KW: Protein synthesis inhibition by 8-oxo-12,13-epoxytrichothecenes. *Biochim Biophys Acta*. 923. 206–213 (1987)
- 46 Eriksen GS: Metabolism and toxicity of trichothecenes. *Swedish University of Agricultural Sciences*. Uppsala (2003) ISBN 9789157664112
- 47 Eriksson M, Larsson A, Lundkvist K, Loof L: Endotoxaemic liver injury in a porcine model—relation to tumour necrosis factor- α release and survival. *Scand J Infect Dis*. 30. 169–172 (1998)
- 48 Esmon CT: Regulation of blood coagulation. *Biochim Biophys Acta*. 1477. 349–360 (2000)
- 49 EU-Kommission: Empfehlung der Kommission vom 17. August 2006 betreffend das Vorhandensein von Deoxynivalenol, Zearalenon, Ochratoxin A, T-2- und HT-2- Toxin sowie von Fumonisin in zur Verfütterung an Tiere bestimmten Erzeugnissen: *Amtsblatt der Europäischen Union* 229. 7-9 (2006 a)
- 50 EU-Kommission: Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln: *Amtsblatt der Europäischen Union* 354. 5-24 (2006 b)
- 51 Feinberg B, McLaughlin CS: Biochemical mechanism of action of trichothecene mycotoxins. Trichothecene mycotoxicosis: Pathophysiological effects. Vol. 1, Editor: V. R. Beasley. *CRC-Press*. Boca Raton, Florida. S. 27–35 (1989) ISBN 0849350883
- 52 Fink-Gremmels J: Mycotoxins: their implications for human and animal health. *Vet Q*. 21. 115–120 (1999)

- 53 Flegel WA, Baumstark MW, Weinstock C, Berg A, Northoff H: Prevention of endotoxin-induced monokine release by human low- and high-density lipoproteins and by apolipoprotein A-I. *Infect Immun.* 61. 5140–5146 (1993)
- 54 Forsell JH, Witt MF, Tai JH, Jensen R, Pestka JJ: Effects of 8-week exposure of the B6C3F1 mouse to dietary deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. *Food Chem Toxicol.* 24. 213–219 (1986)
- 55 Forsyth DM, Yoshizawa T, Morooka N, Tuite J: Emetic and refusal activity of deoxynivalenol to swine. *Appl Environ Microbiol.* 34. 547–552 (1977)
- 56 Frey EA, Finlay BB: Lipopolysaccharide induces apoptosis in a bovine endothelial cell line via a soluble CD14 dependent pathway. *Microb Pathog.* 24. 101–109 (1998)
- 57 Frey EA, Miller DS, Jahr TG, Sundan A, Bazil V, Espevik T, Finlay BB, Wright SD: Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med.* 176. 1665–1671 (1992)
- 58 Friend DW, Trenholm HL, Elliot JI, Hartin KE, Thompson BK: Effect of feeding vomitoxin-contaminated wheat to pigs. *Can J Anim Sci.* 62. 1211–1222 (1982)
- 59 Friend DW, Trenholm HL, Fiser PS, Hartin KE, Thompson BK: Effect of feeding diets containing deoxynivalenol (vomitoxin)-contaminated wheat or corn on the feed consumption, weight gain, organ weight and sexual development of male and female pigs. *Can J Anim Sci.* 66. 765–775 (1986)
- 60 Galanos C, Luderitz O, Rietschel ET, Westphal O, Brade H, Brade L, Freudenberg M, Schade U, Imoto M, Yoshimura H: Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur J Biochem.* 148. 1–5 (1985)
- 61 Gareis M, Bauer J, Gedek B: On the metabolism of the mycotoxin deoxynivalenol in the isolated perfused rat liver. *Mycotox Res.* 3. 25–32 (1987)
- 62 Geller DA, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Nussler AK, Di Silvio M, Wang SC, Nakayama DK, Simmons RL, Snyder SH, Billiar TR: Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90. 3491–3495 (1993)
- 63 GfE: Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Schweinen. *DLG-Verlag*, Frankfurt am Main (2006) ISBN 3769006836
- 64 Gouze ME, Laffitte J, Dedieu G, Galinier A, Thouvenot JP, Oswald IP, Galtier P: Individual and combined effects of low oral doses of deoxynivalenol and nivalenol in mice. *Cell Mol Biol.* 51. 809–817 (2005)
- 65 Gouze ME, Laffitte J, Rouimi P, Loiseau N, Oswald IP, Galtier P: Effect of various doses of deoxynivalenol on liver xenobiotic metabolizing enzymes in mice. *Food Chem Toxicol.* 44. 476–483 (2006)
- 66 Goyarts T, Dänicke S: Bioavailability of the Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) from naturally contaminated wheat for the pig. *Toxicol Lett.* 163. 171–182 (2006)
- 67 Goyarts T, Dänicke S, Brussow K, Valenta H, Ueberschar K, 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.* 171. 38–49 (2007)
- 68 Goyarts T, Dänicke S, Rothkötter H, Spilke J, Tiemann U, Schollenberger M: On the effects of a chronic deoxynivalenol intoxication on performance, haematological and serum parameters of pigs when diets are offered either for ad libitum consumption or fed restrictively. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 52. 305–314 (2005)
- 69 Greene DM, Bondy GS, Azcona-Olivera JI, Pestka JJ: Role of gender and strain in vomitoxin-induced dysregulation of IgA production and IgA nephropathy in the mouse. *J Toxicol Environ Health.* 43. 37–50 (1994)

- 70 Grenier B, Loureiro-Bracarense A, Lucioli J, Pacheco GD, Cossalter A, Moll W, Schatzmayr G, Oswald IP: Individual and combined effects of subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisins in piglets. *Mol Nutr Food Res.* 55. 761–771 (2011)
- 71 Gutzwiller A, Gafner J: Einfluss der Fusarientoxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon auf Leistung und Gesundheit von Zuchtsauen. Feed for Health, ETH-Schriftenreihe zur Tierernährung, Hrsg.: Kreuzer M, Lanzini T, Liesegang A, Bruckmaier R, Hess HD, Band 35, 46–51 (2012)
- 72 Hahn H: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. *Springer*, Heidelberg (2009) ISBN 9783540463627
- 73 Harvey RB, Edrington TS, Kubena LF, Elissalde MH, Casper HH, Rottinghaus GE, Turk JR: Effects of dietary fumonisin B1-containing culture material, deoxynivalenol-contaminated wheat, or their combination on growing barrows. *Am J Vet Res.* 57. 1790–1794 (1996)
- 74 Harvey RB, Kubena LF, Huff WE, Corrier DE, Clark DE, Phillips TD: Effects of aflatoxin, deoxynivalenol, and their combinations in the diets of growing pigs. *Am J Vet Res.* 50. 602–607 (1989)
- 75 Harvey RB, Kubena LF, Huff WE, Corrier DE, Rottinghaus GE, Phillips TD: Effects of treatment of growing swine with aflatoxin and T-2 toxin. *Am J Vet Res.* 51. 1688–1693 (1990)
- 76 Harvey RB, Kubena LF, Huff WE, Elissalde MH, Phillips TD: Hematologic and immunologic toxicity of deoxynivalenol (DON)-contaminated diets to growing chickens. *Bull Environ Contam Toxicol.* 46. 410–416 (1991)
- 77 Hersch M, Gnidec AA, Bersten AD, Troster M, Rutledge FS, Sibbald WJ: Histologic and ultrastructural changes in nonpulmonary organs during early hyperdynamic sepsis. *Surgery.* 107. 397–410 (1990)
- 78 Huff WE, Doerr JA, Hamilton PB, Vesonder RF: Acute toxicity of vomitoxin (Deoxynivalenol) in broiler chickens. *Poult Sci.* 60. 1412–1414 (1981)
- 79 Hughes DM, Gahl MJ, Graham CH, Grieb SL: Overt signs of toxicity to dogs and cats of dietary deoxynivalenol. *J Anim Sci.* 77. 693–700 (1999)
- 80 Hussein HS, Brasel JM: Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology.* 167. 101–134 (2001)
- 81 Ihara T, Sugamata M, Sekijima M, Okumura H, Yoshino N, Ueno Y: Apoptotic cellular damage in mice after T-2 toxin-induced acute toxicosis. *Nat Toxins.* 5. 141–145 (1997)
- 82 Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De G, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN: Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J. Hepatol.* 22. 696–699 (1995)
- 83 Islam Z, Nagase M, Yoshizawa T, Yamauchi K, Sakato N: T-2 toxin induces thymic apoptosis in vivo in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 148. 205–214 (1998)
- 84 Islam Z, Pestka J: LPS priming potentiates and prolongs proinflammatory cytokine response to the trichothecene deoxynivalenol in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol.* 211. 53–63 (2006)
- 85 Iverson F, Armstrong C, Nera E, Truelove J, Fernie S, Scott P, Stapley R, Hayward S, Gunner S: Chronic feeding study of deoxynivalenol in B6C3F1 male and female mice. *Teratog Carcinog Mutagen.* 15. 283–306 (1995-1996)
- 86 Janeway CA, Medzhitov R: Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 20. 197–216 (2002)
- 87 Joffe, AZ: Effects of fusariotoxins in humans: *Fusarium* species: Their biology and toxicology. *Wiley*, New York. S. 225-292 (1986a) ISBN 9780471827320

- 88 Joffe, AZ: On the question of yellow rain: *Fusarium* species: Their biology and toxicology. Wiley, New York. S. 441-444 (1986b) ISBN 9780471827320
- 89 Kirkeboen KA, Strand OA: The role of nitric oxide in sepsis-an overview. *Acta Anaesthesiol Scand.* 43. 275–288 (1999)
- 90 Klunker LR, Kahlert S, Panther P, Diesing A, Reinhardt N, Brosig B, Kersten S, Dänicke S, Rothkötter H, Kluess JW: Deoxynivalenol and E.coli lipopolysaccharide alter epithelial proliferation and spatial distribution of apical junction proteins along the small intestinal axis. *J Anim Sci.* 91. 276-285 (2012)
- 91 Korish A, Arafa M: Propolis derivatives inhibit the systemic inflammatory response and protect hepatic and neuronal cells in acute septic shock. *Braz J Infect Dis.* 15. 332–338 (2011)
- 92 Kraft W, Dürr UM: Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. *Schattauer, Stuttgart.* (2005) ISBN 9783794523085
- 93 Kullik K, Brosig B, Kersten S, Valenta H, Diesing A, Panther P, Reinhardt N, Kluess J, Rothkötter H, Breves G, Dänicke S: Interactions between the Fusarium toxin deoxynivalenol and lipopolysaccharides on the in vivo protein synthesis of acute phase proteins, cytokines and metabolic activity of peripheral blood mononuclear cells in pigs. *Food Chem Toxicol.* 57. 11–20 (2013a)
- 94 Kullik K, Brosig B, Kersten S, Valenta H, Diesing A, Panther P, Reinhardt N, Kluess J, Rothkötter H, Breves G, Dänicke S: Interactions of deoxynivalenol and lipopolysaccharides on tissue protein synthesis in pigs. *World Mycotoxin J.* 6. 185–197 (2013b)
- 95 Lauber U, Dillenburger T, Drochner W: Distinct effects of equal levels of Fusarium toxins (Deoxynivalenol) in growing pigs. Possible reasons. *Mycotox Res.* 17. 53–57 (2001)
- 96 Leathwood PD: Tryptophan availability and serotonin synthesis. *Proc Nutr Soc.* 46. 143–156 (1987)
- 97 Leifsson PS, Iburg T, Jensen HE, Agerholm JS, Kjelgaard-Hansen M, Wiinberg B, Heegaard PM, Astrup LB, Olsson AE, Skov MG, Aalbaek B, Nielsen OL: Intravenous inoculation of *Staphylococcus aureus* in pigs induces severe sepsis as indicated by increased hypercoagulability and hepatic dysfunction. *FEMS Microbiol Lett.* 309. 208-216 (2010)
- 98 Li A, Chang AC, Peer GT, Hinshaw LB, Taylor FB, JR: Comparison of the capacity of rhTNF-alpha and *Escherichia coli* to induce procoagulant activity by baboon mononuclear cells in vivo and in vitro. *Shock.* 5. 274–279 (1996)
- 99 Liao L, Grollman AP, Horwitz SB: Mechanism of action of the 12,13-epoxytrichothecene, anguidine, an inhibitor of protein synthesis. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synth.* 454. 273–284 (1976)
- 100 Li F, Li Y, Luo X, Yoshizawa T: Fusarium toxins in wheat from an area in Henan Province, PR China, with a previous human red mould intoxication episode. *Food Addit Contam.* 19. 163–167 (2002)
- 101 Li G, Shinozuka J, Uetsuka K, Nakayama H, Doi K: T-2 toxin-induced apoptosis in intestinal crypt epithelial cells of mice. *Exp Toxicol Pathol.* 49. 447–450 (1997)
- 102 Liu SF, Malik AB: NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 290. L622-L645 (2006)
- 103 Luo Y: Fusarium toxins contamination of cereals in China: Editors: K. Aibara, S. Kumagai, K. Ohtsubo, R. Yoshizawa. *Proc Japan Assoc Mycotoxicology Suppl.* 1. 97–98 (1988)
- 104 MacDonald EJ, Cavan KR, Smith TK: Effect of acute oral doses of T-2 toxin on tissue concentrations of biogenic amines in the rat. *J Anim Sci.* 66. 434–441 (1988)
- 105 MacLean LD, Spink WW, Visscher MB, Weil MH: Canine intestinal and liver weight changes induced by *E. coli* endotoxin. *Proc Soc Exp Biol Med.* 92. 602–605 (1956)

- 106 Martens M, Kumar MM, Kumar S, Goldenberg M, Kawata M, Pennycooke O, Strande L, Hadeed J, Camacho J, Hewitt C, Slotman GJ: Quantitative analysis of organ tissue damage after septic shock. *Am Surg.* 73. 243–248 (2007)
- 107 Matejovic M, Radermacher P, Tugtekin I, Stehr A, Theisen M, Vogt J, Wachter U, Ploner F, Georgieff M, Trager K: Effects of selective iNOS inhibition on gut and liver O₂-exchange and energy metabolism during hyperdynamic porcine endotoxemia. *Shock.* 16. 203–210 (2001)
- 108 Mayer H, Tharanathan RN, Weckesser J: Analysis of Lipopolysaccharides of Gram-Negative Bacteria. In: Gottschalk, G.: *Methods in Microbiology*, Vol. 18. Elsevier. Burlington (1985) ISBN 0080860478
- 109 Medzhitov R, Janeway CA: Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol.* 9. 4–9 (1997)
- 110 Meloche JL, Smith TK: Altered tissue amino acid metabolism in acute T-2 toxicosis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 210. 260–265 (1995)
- 111 Mikami O, Yamaguchi H, Murata H, Nakajima Y, Miyazaki S: Induction of apoptotic lesions in liver and lymphoid tissues and modulation of cytokine mRNA expression by acute exposure to deoxynivalenol in piglets. *J Vet Sci.* 11. 107–113 (2010)
- 112 Mikami O, Yamamoto S, Yamanaka N, Nakajima Y: Porcine hepatocyte apoptosis and reduction of albumin secretion induced by deoxynivalenol. *Toxicology.* 204. 241–249 (2004)
- 113 Miller ER, Ullrey DE: The Pig as a Model for Human Nutrition. *Annu Rev Nutr.* 7. 361–382 (1987)
- 114 Mireles AJ, Kim SM, Klasing KC: An acute inflammatory response alters bone homeostasis, body composition, and the humoral immune response of broiler chickens. *Poult Sci.* 84. 553–560 (2005)
- 115 Mirocha CJ, Pawlosky RA, Chatterjee K, Watson S, Hayes W: Analysis for Fusarium toxins in various samples implicated in biological warfare in Southeast Asia. *J Assoc Off Anal Chem.* 66. 1485–1499 (1983)
- 116 Morooka N, Uratsuji N, Yoshizawa T, Yamamoto H: Studies on the Toxic Substances in Barley Infected with Fusarium spp. *Food Hygiene and Safety Science.* 13. 368-375. (1972) ISSN 0015-6426
- 117 Mosimann W, Kohler T, Abou-Elmagd A: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere. Parey, Berlin. (1990) ISBN 9783489516163
- 118 Munford R: Sensing gram-negative bacterial lipopolysaccharides: a human disease determinant? *Infect Immun.* 76. 454–465 (2008)
- 119 Munford RS: Detoxifying endotoxin: time, place and person. *J Endotoxin Res.* 11. 69–84 (2005)
- 120 Murshedul AM, Nagase M, Yoshizawa T, Sakato N: Thymocyte apoptosis by T-2 toxin in vivo in mice is independent of Fas/Fas ligand system. *Biosci Biotechnol Biochem.* 64. 210–213 (2000)
- 121 Myers MJ, Farrell DE, Howard KD, Kawalek JC: Effects of intravenous administration of lipopolysaccharide on cytochrome P450 isoforms and hepatic drug metabolizing enzymes in swine. *Am J Vet Res.* 71. 342–348 (2010)
- 122 Nakajima Y, Momotani E, Takahashi H, Ishikawa Y, Ito T, Kanesaki M, Madarame H: Endogenous tumor necrosis factor (TNF) production and modification of pathological lesions in experimental Escherichia coli endotoxemia of piglets. *Vet Immunol Immunopathol.* 45. 45–54 (1995)
- 123 Naumann K, Bassler R: Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. 3. Auflage. Neumann-Neudamm, Melsungen. (1976) ISBN 9783922712145

- 124 Nejdfor P, Ekelund M, Jeppsson B, Westrom BR: Mucosal in vitro permeability in the intestinal tract of the pig, the rat, and man: species- and region-related differences. *Scand J Gastroenterol.* 35. 501–507 (2000)
- 125 Nolan JP: The role of endotoxin in liver injury. *Gastroenterology.* 69. 1346–1356 (1975)
- 126 Nolan JP: Endotoxin, reticuloendothelial function, and liver injury. *Hepatology.* 1. 458–465 (1981)
- 127 Obst A, Gehring K: Getreide: Krankheiten, Schädlinge, Unkräuter. *Mann, Gelsenkirchen-Buer.* (2002) ISBN 3786201234
- 128 Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH: Produktrückruf " Ziegler Käsetaler" und " Ziegler Paprikataler". (2011) URL <http://www.cleankids.de/2011/04/07/osterreich-ruckruf-von-kasetaler-und-paprikataler-150g-ziegler-wegen-mykotoxin/1149>, 21.01.2013
- 129 Oswald IP, Taranu I: Mycotoxins in farm animals: Metabolism, kinetics and occurrence of deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in physiological samples of pigs, ruminants and poultry. *Transworld Research Network.* (2008) ISBN 8178953129
- 130 Pastor CM, Hadengue A, Nussler AK: Minor involvement of nitric oxide during chronic endotoxemia in anesthetized pigs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 278. G416-24 (2000)
- 131 Peraica M, Radic B, Lucic A, Pavlovic M: Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull. World Health Organ.* 77. 754–766 (1999)
- 132 Perkowski J, Chelkowski J, Wakuliński W: Deoxynivalenol and 3-acetyl-deoxynivalenol in wheat kernels and chaff with head fusariosis symptoms: Mycotoxins in cereal grain. Part 13. *Nahrung.* 34. 325–328 (1990)
- 133 Pestka JJ: Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Arch Toxicol.* 84. 663–679 (2010a)
- 134 Pestka JJ: Deoxynivalenol-induced proinflammatory gene expression: mechanisms and pathological sequelae. *Toxins (Basel).* 2. 1300–1317 (2010b)
- 135 Pestka JJ: Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Anim Feed Sci Technol.* 137. 283–298 (2007)
- 136 Pestka JJ: Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 25. 1128–1140 (2008)
- 137 Pestka JJ, Smolinski AT: Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 8. 39–69 (2005)
- 138 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.* 32. 1125–1136 (1994)
- 139 Pfeiffer R: Untersuchungen über das Cholera Gift. *Zeitschr f Hygiene.* 11. 393–412 (1892)
- 140 Pilaro AM, Laskin DL: Accumulation of activated mononuclear phagocytes in the liver following lipopolysaccharide treatment of rats. *J Leukoc Biol.* 40. 29–41 (1986)
- 141 Poapolathep A, Ohtsuka R, Kiatipattanasakul W, Ishigami N, Nakayama H, Doi K: Nivalenol-induced apoptosis in thymus, spleen and Peyer's patches of mice. *Exp Toxicol Pathol.* 53. 441–446 (2002)
- 142 Prelusky DB: The effect of low-level deoxynivalenol on neurotransmitter levels measured in pig cerebral spinal fluid. *J Environ Sci Health B.* 28. 731–761 (1993)
- 143 Prelusky DB, Hartin KE, Trenholm HL, Miller JD: Pharmacokinetic fate of ¹⁴C-labeled deoxynivalenol in swine. *Fundam Appl Toxicol.* 10. 276–286 (1988)

- 144 Prelusky DB, Trenholm HL: The efficacy of various classes of anti-emetics in preventing deoxynivalenol-induced vomiting in swine. *Nat Toxins*. 1. 296–302 (1993)
- 145 Prelusky DB, Yeung JM, Thompson BK, Trenholm HL: Effect of deoxynivalenol on neurotransmitters in discrete regions of swine brain. *Arch Environ Contam Toxicol*. 22. 36–40 (1992)
- 146 Pugin J, Ulevitch RJ, Tobias PS: Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta mediate human endothelial cell activation in blood at low endotoxin concentrations. *J Inflamm*. 45. 49–55 (1995)
- 147 Rappaport AM: Hepatic blood flow: morphologic aspects and physiologic regulation. *Int Rev Physiol*. 21. 1–63 (1980)
- 148 Richard J: Some major mycotoxins and their mycotoxicoses - an overview. *Int J Food Microbiol*. 119. 3–10 (2007)
- 149 Rietschel ET, Brade H: Lipopolysaccharide, die Endotoxine und O-Antigene gramnegativer Bakterien: Chemische Struktur, biologische Wirkung und serologische Eigenschaften. *Infection*. 15. S.76-84 (1987) ISSN 0300-8126
- 150 Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zahringer U, Seydel U, Di Padova F: Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*. 8. 217–225 (1994)
- 151 Rokke O, Revhaug A, Osterud B, Giercksky KE: Increased plasma levels of endotoxin and corresponding changes in circulatory performance in a porcine sepsis model: the effect of antibiotic administration. *Prog Clin Biol Res*. 272. 247–262 (1988)
- 152 Roth RI, Su D, Child AH, Wainwright NR, Levin J: Limulus antilipopolysaccharide factor prevents mortality late in the course of endotoxemia. *J Infect Dis*. 177. 388–394 (1998)
- 153 Rotter BA, Prelusky DB, Pestka JJ: Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J Toxicol Environ Health Part A*. 48. 1–34 (1996)
- 154 Rotter BA, Thompson BK, Lessard M, Trenholm HL, Tryphonas H: Influence of low-level exposure to Fusarium mycotoxins on selected immunological and hematological parameters in young swine. *Fundam Appl Toxicol*. 23. 117–124 (1994)
- 155 Saetre T, Hovig T, Roger M, Gundersen Y, Aasen AO: Hepatocellular damage in porcine endotoxemia: beneficial effects of selective versus non-selective nitric oxide synthase inhibition? *Scand J Clin Lab Invest*. 61. 503–512 (2001)
- 156 Schatzmayr G, Zehner F, Taubel M, Schatzmayr D, Klimitsch A, Loibner AP, Binder EM: Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Mol Nutr Food Res*. 50. 543–551 (2006)
- 157 Schell TC, Lindemann MD, Kornegay ET, Blodgett DJ, Doerr JA: Effectiveness of different types of clay for reducing the detrimental effects of aflatoxin-contaminated diets on performance and serum profiles of weanling pigs. *J Anim Sci*. 71. 1226–1231 (1993)
- 158 Schirmacher P, Fleig W, Tannapfel A, Langner C, Dries V, Terracciano L, Denk H, Dienes H: Biopische Diagnostik der chronischen Hepatitis. *Pathologe*. 25. 337–348 (2004)
- 159 Schletter J, Heine H, Ulmer AJ, Rietschel ET: Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch Microbiol*. 164. 383–389 (1995)
- 160 Schollenberger M, Suchy S, Jara HT, Drochner W, Müller H: A survey of Fusarium toxins in cereal-based foods marketed in an area of southwest Germany. *Mycopathologia*. 147. 49–57 (1999)
- 161 Schrauwen E, Cox E, Houvenaghel A: Escherichia coli sepsis and endotoxemia in conscious young pigs. *Vet Res Commun*. 12. 295–303 (1988)
- 162 Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ: Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*. 249. 1429–1431 (1990)

- 163 Secchi A, Ortanderl JM, Schmidt W, Gebhard MM, Martin E, Schmidt H: Effect of endotoxemia on hepatic portal and sinusoidal blood flow in rats. *J Surg Res.* 89. 26–30 (2000)
- 164 Shao B, Lu M, Katz SC, Varley AW, Hardwick J, Rogers TE, Ojogun N, Rockey DC, Dematteo RP, Munford RS: A host lipase detoxifies bacterial lipopolysaccharides in the liver and spleen. *J Biol Chem.* 282. 13726–13735 (2007)
- 165 Shinozuka J, Li G, Kiatipattanasakul W, Uetsuka K, Nakayama H, Doi K: T-2 toxin-induced apoptosis in lymphoid organs of mice. *Exp Toxicol Pathol.* 49. 387–392 (1997)
- 166 Shinozuka J, Suzuki M, Noguchi N, Sugimoto T, Uetsuka K, Nakayama H, Doi K: T-2 toxin-induced apoptosis in hematopoietic tissues of mice. *Toxicol Pathol.* 26. 674–681 (1998)
- 167 Smith TK, McMillan EG, Castillo JB: Effect of feeding blends of Fusarium mycotoxin-contaminated grains containing deoxynivalenol and fusaric acid on growth and feed consumption of immature swine. *J Anim Sci.* 75. 2184–2191 (1997)
- 168 Sobrova P, Adam V, Vasatkova A, Beklova M, Zeman L, Kizek R: Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdiscip Toxicol.* 3. 94–99 (2010)
- 169 Sperandio P, Dehò G, Polissi A: The lipopolysaccharide transport system of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 1791. 594–602 (2009)
- 170 Sprando RL, Collins TFX, Black TN, Olejnik N, Rorie JJ, Eppley RM, Ruggles DI: Characterization of the effect of deoxynivalenol on selected male reproductive endpoints. *Food Chem Toxicol.* 43. 623–635 (2005)
- 171 Stehr S, Woest I, Hartog C, Reinhart K: Sepsis. *Internist.* 54. 63–74 (2013)
- 172 Sun X, Zhang X, Wang H, Cao W, Yan X, Zuo L, Wang J, Wang F: Effects of sterigmatocystin, deoxynivalenol and aflatoxin G1 on apoptosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Biomed Environ Sci.* 15. 145–152 (2002)
- 173 Swamy HVLN, Smith TK, MacDonald EJ: Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with Fusarium mycotoxins on brain regional neurochemistry of starter pigs and broiler chickens. *J Anim Sci.* 82. 2131–2139 (2004)
- 174 Swamy HVLN, Smith TK, MacDonald EJ, Boermans HJ, Squires EJ: Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with Fusarium mycotoxins on swine performance, brain regional neurochemistry, and serum chemistry and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *J Anim Sci.* 80. 3257–3267 (2002)
- 175 Szelenyi I, Herold H, Gothert M: Emesis induced in domestic pigs: a new experimental tool for detection of antiemetic drugs and for evaluation of emetogenic potential of new anticancer agents. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 32. 109–116 (1994)
- 176 Tai JH, Pestka JJ: Synergistic interaction between the trichothecene T-2 toxin and Salmonella typhimurium lipopolysaccharide in C3H/HeN and C3H/HeJ mice. *Toxicol Lett.* 44. 191–200 (1988)
- 177 Takayama K, Mitchell DH, Din ZZ, Mukerjee P, Li C, Coleman DL: Monomeric Re lipopolysaccharide from Escherichia coli is more active than the aggregated form in the Limulus amoebocyte lysate assay and in inducing Egr-1 mRNA in murine peritoneal macrophages. *J Biol Chem.* 269. 2241–2244 (1994)
- 178 Taylor MJ, Lafarge-Frayssinet C, Luster MI, Frayssinet C: Increased endotoxin sensitivity following T-2 Toxin treatment is associated with increased absorption of endotoxin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 109. 51–59 (1991)
- 179 Thuvander A, Wikman C, Gadhasson I: In vitro exposure of human lymphocytes to trichothecenes: individual variation in sensitivity and effects of combined exposure on lymphocyte function. *Food Chem Toxicol.* 37. 639–648 (1999)

- 180 Tiemann U, Brussow K, Kuchenmeister U, Jonas L, Kohlschein P, Pohland R, Dänicke S: Influence of diets with cereal grains contaminated by graded levels of two Fusarium toxins on selected enzymatic and histological parameters of liver in gilts. *Food Chem Toxicol.* 44. 1228–1235 (2006)
- 181 Tiemann U, Brussow K, Kuchenmeister U, Jonas L, Pohland R, Reischauer A, Jager K, Dänicke S: Changes in the spleen and liver of pregnant sows and full-term piglets after feeding diets naturally contaminated with deoxynivalenol and zearalenone. *Vet J.* 176. 188–196 (2008)
- 182 Tobias PS, Soldau K, Gegner JA, Mintz D, Ulevitch RJ: Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J Biol Chem.* 270. 10482–10488 (1995)
- 183 Trenholm HL, Friend D, Hamilton R, Prelusky DB, Foster B: Lethal toxicity and nonspecific effects. Trichothecene mycotoxicosis. Pathophysiologic effects Vol. I. Editor: Beasley, V.R. *CRC-Press.* Boca Raton, Florida. 107-141 (1989)
- 184 Trenholm HL, Thompson BK, Foster BC, Charmley LL, Hartin KE, Coppock RW, Albassam MA: Effects of feeding diets containing Fusarium (naturally) contaminated wheat or pure deoxynivalenol (DON) in growing pigs. *Can. J Anim Sci.* 74. 361–369 (1994)
- 185 Tumbleson ME, Schook LB: Advances in swine in biomedical research. *Plenum Press.* New York. (1996) ISBN 9780306454967
- 186 Turner PC, Burley VJ, Rothwell JA, White KLM, Cade JE, Wild CP: Dietary wheat reduction decreases the level of urinary deoxynivalenol in UK adults. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 18. 392–399 (2008)
- 187 Ueno Y: General Toxicology. Trichothecenes: Chemical, biological, and toxicological aspects. *Elsevier Scientific Pub. Co.* New York. (1983) ISBN 9780444416889
- 188 Ueno, Y: Trichothecenes in food. Mycotoxins in food, Food science and technology. Editor: Krogh, P. *Academic Press.* London. (1987) ISBN 9780124266704
- 189 Ueno Y, Hsieh DPH: The Toxicology of Mycotoxins. *Crit Rev Toxicol.* 14. 99–132 (1985)
- 190 Ueno Y, Umemori K, Niimi E, Tanuma S, Nagata S, Sugamata M, Ihara T, Sekijima M, Kawai K, Ueno I: Induction of apoptosis by T-2 toxin and other natural toxins in HL-60 human promyelotic leukemia cells. *Nat Toxins.* 3. 129–137 (1995)
- 191 Ulevitch RJ, Tobias PS: Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol.* 13. 437–457 (1995)
- 192 Utili R, Abernathy CO, Zimmerman HJ: Endotoxin effects on the liver. *Life Sci.* 20. 553–568 (1977)
- 193 van Amersfoort ES, van Berkel TJC, Kuiper J: Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev.* 16. 379–414 (2003)
- 194 Vazquez-Torres A, Vallance BA, Bergman MA, Finlay BB, Cookson BT, Jones-Carson J, Fang FC: Toll-like receptor 4 dependence of innate and adaptive immunity to Salmonella: importance of the Kupffer cell network. *J Immunol.* 172. 6202–6208 (2004)
- 195 Vesonder RF, Ciegler A, Jensen AH: Isolation of the emetic principle from Fusarium-infected corn. *Appl Microbiol.* 26. 1008–1010 (1973)
- 196 Vogel SN, Hogan MM: Role of cytokines in endotoxin-mediated host responses. In: Oppenheim JJ: Immunophysiology: The role of cells and cytokines in immunity and inflammation. *Oxford Univ. Press,* New York. (1990) ISBN 9780195070644
- 197 Watson SA, Mirocha CJ, Hayes AW: Analysis for trichothecenes in samples from Southeast Asia associated with "Yellow Rain". *Fundam Appl Toxicol.* 4. 700–717 (1984)
- 198 WHO: Selected mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot. *World Health Organization,* Geneva. (1990) ISBN 9789241571050

-
- 199 Williams PN, Collier CT, Carroll JA, Welsh TH, JR, Laurenz JC: Temporal pattern and effect of sex on lipopolysaccharide-induced stress hormone and cytokine response in pigs. *Domest Anim Endocrinol.* 37. 139–147 (2009)
- 200 Wisse E, Braet F, Luo D, Zanger R de, Jans D, Crabbe E, Vermoesen A: Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver. *Toxicol Pathol.* 24. 100–111 (1996)
- 201 Wolf-Hall CE, Schwarz PB: Mycotoxins and fermentation-beer production. *Adv Exp Med Biol.* 504. 217–226 (2002)
- 202 Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, Kane JP, Wright SD: Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J Exp Med.* 180. 1025–1035 (1994)
- 203 Yachida S, Kokudo Y, Wakabayashi H, Maeba T, Kaneda K, Maeta H: Morphological and functional alterations to sinusoidal endothelial cells in the early phase of endotoxin-induced liver failure after partial hepatectomy in rats. *Virchows Archiv.* 433. 173–181 (1998)
- 204 Young LG, McGirr L, Valli VE, Lumsden JH, Lun A: Vomitoxin in corn fed to young pigs. *J Anim Sci.* 57. 655–664 (1983)
- 205 Zaki MM, El-Midany SA, Shaheen HM, Rizzi L: Mycotoxins in animals: Occurrence, effects, prevention and management. *J Toxicol Environ Health Part A.* 4. 13–28 (2012)
- 206 Zhou H, 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.* 72. 130–142 (2003)
- 207 Zhou HR, Harkema JR, Yan D, Pestka JJ: Amplified proinflammatory cytokine expression and toxicity in mice coexposed to lipopolysaccharide and the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol). *J Toxicol Environ Health A.* 57. 115–136 (1999)
- 208 Zielonka L, Wisniewska M, Gajecka M, Obremski K, Gajecki M: Influence of low doses of deoxynivalenol on histopathology of selected organs of pigs. *Pol J Vet Sci.* 12. 89–95 (2009)

7 Anlagen

7.1 Methoden zur Analyse der Futtermischung

Analysierte Zusammensetzung (%)	KON	DON	Analyse-Verfahren
Rohprotein	17,4	17,0	Dumas-Verbrennungsmethode
Rohasche	5,7	5,4	Veraschung im Muffelofen
Rohfaser	5,3	4,9	Weender-Verfahren
Rohfett	4,8	5,2	Soxhlet-Verfahren
DON (mg/kg)	< 0,14	3,1	HPLC

Die Analyse der Futtermischung erfolgte nach den Methoden des Verbandes Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA, Stand 2006, nach Naumann und Bassler 1976). Erläuterung: KON - Kontrollfutter, DON - DON-kontaminiertes Getreide, HPLC - *High performance liquid chromatography*.

7.2 Protokoll zur Herstellung der Stammlösungen

DON-Stammlösung:

- DON (Sigma-Aldrich, Nr. 0156), 5mg, Pulverform
- Acetonitril
- NaCl 0,9%, steril
- Verwendung ausschließlich steriler Gefäße

Herstellung:

- 5 mg DON in 5 ml Acetonitril auflösen (ergibt 1 mg/ml Konzentration)
- 1 ml Aliquots anfertigen und bei -20 °C lagern
- 1 ml Aliquot mit Stickstoff bis zur vollständigen Trocknung einengen
- das Pellet in 5 ml steriler physiologischer NaCl-Lösung resuspendieren
- evtl. für 2 bis 3 min im Ultraschallbad zur besseren Löslichkeit behandeln (ergibt 0,2 mg/ml Stammlösung)
- Stammlösung aliquotieren und bei -20 °C lagern

LPS-Stammlösung:

- LPS (Sigma-Aldrich, Nr. L2630), 100mg, Pulverform
- NaCl 0,9%, steril
- Verwendung ausschließlich steriler Gefäße

Herstellung:

- 100 mg LPS in 50 ml steriler physiologischer NaCl-Lösung auflösen (ergibt 2 mg/ml Konzentration)
- anschließend steril filtrieren, aliquotieren und bei -20 °C lagern

7.3 Protokoll der Katheteroperation

- Implantation beider Katheter in einer Operation mit einer Dauer von 60 bis 90 min im Institut für Tierernährung der Bundesforschungsanstalt für Tiergesundheit des Friedrich-Loeffler-Instituts (FLI) Braunschweig
- Narkose durch Applikation von 0,125 ml Ketamin/kg LM i.m. (Ursotamin®, 100 mg/ml, Serumwerk Bernburg AG), 0,05 ml Azaperon/kg LM i.m. (Stresnil®, 40 mg/ml, Janssen, Neuss) in die Nackenmuskulatur und 0,3 ml/kg LM Thiopental i.v. (Trapanal®, 1 g/20 ml, Inresa GmbH, Freiburg) in die laterale Ohrvene
- Anschließend Rückenlagerung mit Fixierung der gestreckten Gliedmaßen
- Einschnitt in den Sulcus jugularis des ventralen Halses unter sterilen Bedingungen
- Stumpfe Präparation der *Vv. jugulares externae sinister et dexter*
- Implantation eines Polyurethan-Katheters (Ch 08, 60 cm, Durchmesser 2,67 mm, Nutricia, Niederlande)
- Verschieben der Katheter bis ungefähr 15 cm vor das Herz unter Abbindung des kranialen Anteils der *V. jugularis*
- Subcutane Tunnelung der beidseitigen Katheter und Fixierung im Nacken
- Nachfolgend Wundnaht mit nochmaliger Desinfektion durch Aluminium-Spray
- Zur Erhaltung der Katheterdurchlässigkeit wurden diese mit einer Lösung aus Heparin und NaCl gespült
- postoperative Schmerztherapie mit 1 ml Rimadyl® i.m. (Carprofen, 50 mg/ml, Pfizer AG, Berlin)

7.4 Protokoll Paraffineinbettung

1. Tag:	4 Stunden	Ethanol 70%ig
	4 Stunden	Ethanol 80%ig
	über Nacht	Ethanol 90%ig
2. Tag:	4 Stunden	Ethanol 96%ig
	4 Stunden	Ethanol 100%ig
	über Nacht	Ethanol 100%ig / Xylol
3. Tag:	30 min	Xylol I
	30 min	Xylol II
	2 Stunden	Paraplast I
	2 Stunden	Paraplast II
	2 Stunden	Paraplast III

- Anschließend erfolgt das Eingießen von heißem Paraffin
- Nach Erkalten sind die Präparate schnittfähig

7.5 Protokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

- Entparaffinieren 2 mal je 5 min in Xylol
- Absteigende Alkoholreihe je 1 min
- Einstellen der Schnitte aus Aqua dest. in saueres Hämatoxylin nach Ehrlich für 5 min
- Spülen in Aqua dest.
- Harte Differenzierung in HCl-Alkohol (99 ml Ethanol 70%ig mit 1 ml Salzsäure)
- Auswaschen in reichlich Leitungswasser und anschließend Bläuen für 10 min in fließendem lauwarmem Leitungswasser
- Einstellen in 1%ige wässrige Eosinlösung für 1 bis 5 min Färben in Eosin (je 1g Eosin-Natrium auf 200ml Aqua dest. und je 1g Eosin Yellowish auf 200ml Aqua dest.)
- Auswaschen für 10 min in Wasser
- Differenzieren in 80%igem Ethanol
- 2 mal 2 min 96%igem Ethanol
- Xylol für 3 bis 5 min

Eindecken der Objekte:

- Objektträger mit histologischen Anschnitten (Schnittdicke 5µm) trocknen lassen
- Eindeckmedium auftragen
- Deckglas (25 x 60 mm) passend und luftleer andrücken, nochmals trocknen lassen

8 Danksagung

Bedanken möchte ich mich an erster Stelle bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Hermann-Josef Rothkötter, für die Überlassung des Themas und Integrierung in das wissenschaftliche Team des Instituts für Anatomie. Für die Begleitung des langen Weges zur Dissertation danke ich meiner Betreuerin, Frau Dr. med. vet. Jeannette Klüß. Sie führte mich immer wieder auf den wissenschaftlichen Weg zurück und stand mir mit Rat und Tat jederzeit zur Seite und trug so zur Organisation, Motivation und Gestaltung der Publikation und Dissertation bei. Frau Dr. med. Patricia Panther und Dr. med. vet. Nicole Reinhardt habe ich die Starthilfe für diese Arbeit zu verdanken und Frau PD Dr. med. Dörthe Jechorek bin ich durch die gemeinsame Entwicklung eines geeigneten Indexsystems zu Dank verpflichtet. Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. agr. habil. Sven Dänicke für die fachliche Unterstützung bei der Erstellung der Statistik und der Veröffentlichungen.

Weiterhin möchte ich den technischen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Anatomie, im Speziellen Frau Christine Gerlach und Frau Brigitte Ketzler für die Hilfe bei der Anfertigung der Präparate danken. Meiner damaligen Institutskollegin Silke Storsberg danke ich für die immer aufmunternden Worte und ohne das LOM-Stipendium der Otto-von-Guericke Universität wäre diese Arbeit wohl undenkbar gewesen.

Zu einem Großteil meiner Motivation trug die parallele Dissertationsarbeit von Leslie Klunker bei. Neben dem wertvollen Erfahrungsaustausch konnte ich auf Leslie als Freundin immer zählen und tue es noch.

Zu guter Letzt bleibt mir der Dank an meine Familie und meinen Freund Benjamin. Sie haben mich immer unterstützt und mir den Glauben an einen Abschluss dieser Arbeit mehrmals zurückgegeben.

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**„Einfluss von Deoxynivalenol und *Escherichia coli*-Lipopolysaccharid
auf die Lebermorphologie und -funktion beim Schwein“**

im Institut der Anatomie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Rothkötter und Frau Dr. med. vet. J. Klüß ohne sonstige Hilfe durchgeführt habe und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 08.08.2014

Cassandra Stanek

10 Lebenslauf

Name: Cassandra Stanek

Geburtsdatum: 09. 03. 1987

Geburtsort: Magdeburg

Familienstand: ledig

Schulbildung: August 1993 bis Juli 1997
Grundschule Roggengrund, Magdeburg

August 1997 bis Juli 1999
Sekundarschule Dahlenwarsleben

August 1999 bis Juli 2006
Kurfürst-Joachim-Friedrich-Gymnasium, Wolmirstedt

Schulabschluss: 2006, allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Studium: seit Oktober 2006 Studium der Humanmedizin
an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg;
1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im SS 2008

Praktisches Jahr: 1. Terial - Urologie: August bis Dezember 2011
Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R.

2. Terial - Chirurgie: Dezember 2011 bis März 2012
Klinikum Dorothea Christiane Erxleben Quedlinburg

3. Terial - Innere Medizin: März bis Juli 2012
Krankenhaus Jerichower Land GmbH

Hochschulabschluss: 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung am 06.11.2012 bestanden

Approbation: am 21.11.2012 erteilt

Anstellungen: April bis Dezember 2013 Assistenzärztin in der Klinik für Allgemeine Innere Medizin, Gastroenterologie und Geriatrie des Krankenhauses Jerichower Land GmbH, Burg

seit Januar 2014 Assistenzärztin in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin am Krankenhaus Jerichower Land GmbH, Burg

Promotion: seit 2009 Doktorandin am Institut für Anatomie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

LOM-Stipendium (Leistungsorientierte Mittelvergabe) an der Medizinischen Fakultät Magdeburg von Dezember 2012 bis März 2013

11 Veröffentlichungen

Publikation:

Stanek C, Reinhardt N, Diesing A-K, Nossol C, Kahlert S, Panther P, Kluess J, Rothkötter H-J, Kuester D, Brosig B, Kersten S, Dänicke S:

„A chronic oral exposure of pigs with deoxynivalenol partially prevents the acute effects of lipopolysaccharides on hepatic histopathology and blood clinical chemistry“;

Toxicology Letters 215 (3) 193-200; 17.12.2012

(DOI 10.1016/j.toxlet.2012.10.009)

Poster:

Stanek C, Kuester D, Brosig B, Müller K, Panther P,

Kluess J, Kersten S, Dänicke S, Rothkötter H-J, Walk N:

„Effects of deoxynivalenol (DON) and lipopolysaccharide (LPS) on liver histopathology and blood chemistry in pigs“;

34. Mycotoxin Workshop in Braunschweig (14. - 16.05.2012)

Stanek C, Reinhardt N, Diesing A-K, Nossol C, Kahlert S, Panther P, Rothkötter H-J, Kuester D, Brosig B, Kersten S, Dänicke S, Kluess J:

„Pig’s chronic oral exposure to deoxynivalenol (DON) partially attenuates acute effects of *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) on hepatic morphology and function“;

108. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft in Magdeburg (22. - 25.03.2013)