Univerza
v Ljubljani
Veterinarska
fakulteta

Igor Ujčič Vrhovnik

UČINEK KRME, KI VSEBUJE MIKOTOKSIN DEOKSINIVALENOL (DON), NA LIMFATIČNE ORGANE MLADIC IN NJIHOVIH SESNIH PUJSKOV

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2018

Univerza
v Ljubljani
Veterinarska
fakulteta

UDK: 636.4.085:582.82:615.98:612.017:591.044:591.44+591.434(043.3)

Mag. Igor Ujčič Vrhovnik, dr. vet. med.

UČINEK KRME, KI VSEBUJE MIKOTOKSIN DEOKSINIVALENOL (DON), NA LIMFATIČNE ORGANE MLADIC IN NJIHOVIH SESNIH PUJSKOV

Doktorska disertacija

EFFECTS OF FEED, CONTAINING MYCOTOXIN DEOXYNIVALENOL (DON) ON LYMPHATIC ORGANS OF GILTS AND THEIR SUCKLING PIGLETS

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2018

Igor Ujčič Vrhovnik

Učinek krme, ki vsebuje mikotoksin deoksinivalenol (DON), na limfatične organe mladic in njihovih sesnih pujskov

Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za varno hrano, krmo in okolje in na Inštitutu za patologijo, divjad, ribe in čebele na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani.

Javni zagovor je bil opravljen:

Mentor: izr. prof. dr. Breda Jakovac Strajn, dr. vet. med.

Somentor: prof. dr. Milan Pogačnik, dr. vet. med.

Izjava o delu:
Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršil avtorskih pravic ter intelektualne lastnine drugih.

Člani strokovne komisije za oceno in za zagovor:

predsednik: prof. dr. Tadej Malovrh, dr. vet. med.

članica: prof. dr. Nina Gale, dr. med.

član: zn. svet., izr. prof. dr. Anton Vengušt, dr. vet. med.

Za družino in prijatelje …

… če verjameš, se lahko vse zgodi …

… verjemi v svoje sanje …

… sapere aude …

IZVLEČEK

Ključne besede: prašiči - imunologija; krma - analize; histologija - veterinarska; mikotoksini - škodljivi učinki - toksičnost; trihoteceni - toksičnost; imunosupresija; vranica - patologija; limfatično tkivo - patologija; ileum - patologija; timus - patologija; imunohistokemija; apoptoza; celična proliferacija; samica; živali, novorojene

Namen naloge je bil z morfometričnimi in imunohistokemičnimi metodami potrditi imunosupresivni učinek krme, ki vsebuje mikotoksin deoksinivalenol (DON), na limfatične organe mladic in njihovih enotedenskih pujskov. Naključno izbrane mladice (n = 20) smo delili v kontrolno (n = 10) in poskusno skupino (n = 10). Mladice v poskusni skupini so bile krmljene s krmo, ki je vsebovala 5,08 mg DON/kg, štiri tedne pred porodom, med laktacijo in do ponovne osemenitve (skupaj 52 ± 1 dan). Mladice so bile žrtvovane 5 do 8 dni po odstavitvi pujskov. Prav tako je bil v prvem tednu starosti žrtvovan po en pujsek iz vsakega gnezda. Pri vseh živalih smo odvzeli vzorce ileuma s Peyerjevimi ploščami, mezenterialne bezgavke in vranico, pri pujskih tudi timus. Na histoloških preparatih smo z morfometričnimi metodami določili arealno in numerično gostoto profilov germinativnih središč limfatičnih foliklov. Z imunohistokemičnimi barvanji smo določali celice v apoptozi, proliferaciji, število makrofagov in limfocitov T. Skupno smo na vzorcih limfatičnih organov mladic in pujskov preučili 64 parametrov in v 49 primerih ugotovili statistično značilne razlike med kontrolno in poskusno skupino ($P < 0,05$). Rezultati dokazujejo, da ima krma, kontaminirana z DON, imunosupresivni učinek na mladice in njihove pujske.

ABSTRACT

Keywords: swine - immunology; animal feed - analysis; histology - veterinary; mycotoxins - adverse effects - toxicity; trichotecene - toxicity; immunosuppression; spleen - pathology; lymphoid tissue - pathology; ileum - pathology; thymus gland - pathology; immunohistochemistry; apoptosis; cell proliferation; female; animals, newborn

The purpose of the assay was to use morphometric and immunohistochemical methods to confirm the immunosuppressive effect of the feed containing mycotoxin deoxynivalenol (DON) on the lymphatic organs of gilts and their one-week old piglets. Randomly selected gilts (n = 20) were divided into control (n = 10) and experimental (n = 10) groups. The gilts in the experimental group were fed with feed containing 5.08 mg of DON/kg, four weeks before giving birth, during lactation and until re-insemination (total of 52 ± 1 day). The gilts were sacrificed 5 to 8 days after weaning piglets, and one piglet was sacrificed from each nest during the first week of age. In all animals, samples of ileum with Peyer's patch, mesenteric lymph nodes and spleen were taken, and also from the thymus in piglets. On histological slices, we determined, with morphometric methods, the areal and numerical densities of the profiles of the germinative centres of lymphatic follicles. With the immunohistochemical stainings we determined cells in apoptosis, proliferation, number of macrophages and T lymphocytes. Overall, the samples of the lymphatic organs of gilts and piglets were used to examine 64 parameters, and in 49 cases statistically significant differences between the control and experimental groups were found ($P < 0.05$). The results prove that feed contaminated with DON has an immunosuppressive effect on gilts and their piglets.

KAZALO

IZVLEČEK **5**
ABSTRACT **6**
KAZALO TABEL **9**
KAZALO SLIK **13**
1 UVOD **17**
2 PREGLED LITERATURE **21**
2.1 MIKOTOKSINI **21**
2.1.1 Trihoteceni 22
2.1.2 Deoksinivalenol (DON) 23
2.2 IMUNSKI SISTEM **29**
2.2.1 Timus 30
2.2.2 Peyerjeve plošče 32
2.2.3 Mezenterialne bezgavke 34
2.2.4. Vranica 35
2.3 IMUNOHISTOKEMIČNO IN MORFOMETRIČNO VREDNOTENJE UČINKOV DON NA ORGANE PRAŠIČEV **36**
2.3.1 Imunohistokemično označevanje celic v apoptozi 37
2.3.2 Imunohistokemično označevanje celične proliferacije, limfocitov T in makrofagov 39
2.3.3 Morfometrične in histopatološke preiskave 40
3 MATERIAL IN METODE **42**
3.1 MATERIAL **42**
3.1.1 Živali 42
3.1.2 Krma 42
3.1.3 Limfatični organi 44
3.2 METODE **47**
3.2.1 Barvanje tkivnih rezin s hematoksilinom in eozinom (HE) 47
3.2.2 Morfometrična analiza 48
3.2.3 Ugotavljanje deleža celic v apoptozi 50
3.2.4 Imunohistokemično označevanje celične proliferacije, makrofagov in limfocitov T 52
3.2.5 Analiza imunohistokemično označenih tkivnih rezin 54
3.2.6 Statistične metode 56
4 REZULTATI **57**
4.1 PUJSKI **57**
4.1.1 Timus 57
4.1.1.1 Apoptoza 57
4.1.1.2 Relativno razmerje površine med skorjo in sredico timusa pujskov 58
4.1.1.3 Makrofagi 59
4.1.1.4 Proliferacijski indeks 60
4.1.2 Mezenterialne bezgavke 63
4.1.2.1 Apoptoza 63
4.1.2.2 Makrofagi 65
4.1.2.3 Proliferacijski indeks 67
4.1.2.4 Arealna in numerična gostota 69
4.1.3 Peyerjeve plošče ileuma 70
4.1.3.1 Apoptoza 70
4.1.3.2 Makrofagi 72
4.1.3.3 Proliferacijski indeks 74
4.1.3.4 Limfociti T 76

4.1.3.5 Arealna in numerična gostota ... 77
4.1.4 Vranica ... 78
4.1.4.1 Apoptoza ... 78
4.1.4.2 Makrofagi ... 80
4.1.4.3 Proliferacijski indeks ... 82
4.1.4.4 Arealna in numerična gostota ... 84
4.2 PLEMENSKE MLADICE ... 85
4.2.1 Mezenterialne bezgavke ... 85
4.2.1.1 Apoptoza ... 85
4.2.1.2 Makrofagi ... 87
4.2.1.3 Proliferacijski indeks ... 89
4.2.1.4 Arealna in numerična gostota ... 91
4.2.2 Peyerjeve plošče ileuma ... 92
4.2.2.1 Apoptoza ... 92
4.2.2.2 Makrofagi ... 94
4.2.2.3 Proliferacijski indeks ... 96
4.2.2.4 Limfociti T ... 98
4.2.2.5 Arealna in numerična gostota ... 99
4.2.3 Vranica ... 100
4.2.3.1 Apoptoza ... 100
4.2.3.2 Makrofagi ... 102
4.2.3.3 Proliferacijski indeks ... 104
4.2.3.4 Arealna in numerična gostota ... 106
4.3 POVZETEK REZULTATOV ... 107
4.4 KORELACIJA MED KRMO IN OPAZOVANIMI SPREMENLJIVKAMI ... 108
5 RAZPRAVA ... 110
6 ZAKLJUČKI ... 124
7 POVZETEK ... 125
8 SUMMARY ... 128
9 ZAHVALE ... 131
10 LITERATURA ... 133
11 PRILOGE ... 145

KAZALO TABEL

Tabela 1: Kemijska in mikrobiološka analiza krmnih mešanic za kontrolno in poskusno skupino mladic. 43

Table 1: Chemical and microbiological analysis of complete feed for the control and experimental groups of gilts. 43

Tabela 2: Koncentracija mikotoksinov (mg/kg) v krmnih mešanicah za kontrolno in poskusno skupino mladic. 44

Table 2: The concentration of mycotoxins (mg/kg) in complete feed for the control and experimental groups of gilts. 44

Tabela 3: Povprečne mase pujskov ± SD od poroda do odstavitve v kontrolni in poskusni skupini. 45

Table 3: Average weight of the piglets ± SD during the experiment in the control and experimental groups. 45

Tabela 4: V raziskavi uporabljeni vzorci limfatičnih organov in metode. 55

Table 4: Samples of the lymphatic organs and methods used in the study. 55

Tabela 5: Povprečno število TUNEL-pozitivnih celic v skorji in v sredici timusov pujskov kontrolne in poskusne skupine. 57

Table 5: The average number of TUNEL-positive cells in the thymus cortex and medulla of piglets from the control and experimental groups. 57

Tabela 6: Relativno razmerje med skorjo in sredico timusa pujskov kontrolne in poskusne skupine, izražena v %. 59

Table 6: The relative ratio of the thymus cortex and medulla in the piglets of the control and the experimental groups, expressed in %. 59

Tabela 7: Povprečno število makrofagov v timusu pujskov kontrolne in poskusne skupine. . 59

Table 7: The average number of macrophages in thymus of piglets from the control and experimental groups. 59

Tabela 8: Število celic v proliferaciji na 1000 preštetih celic v timusu pujskov kontrolne in poskusne skupine. 61

Table 8: The number of cells in proliferation of 1000 counted cells in thymus of piglets from the control and experimental groups. 61

Tabela 9: Povprečno število TUNEL-pozitivnih celic v mezenterialnih bezgavkah pujskov kontrolne in poskusne skupine. 63

Table 9: The average number of TUNEL-positive cells in mesenteric lymph nodes of piglets from the control and experimental groups. 63

Tabela 10: Povprečno število makrofagov v mezenterialnih bezgavkah pujskov kontrolne in poskusne skupine. 65

Table 10: The average number of macrophages in mesenteric lymph nodes of piglets from the control and experimental groups. 65

Tabela 11: Število celic v proliferaciji na 1000 preštetih celic v mezenterialnih bezgavkah pujskov kontrolne in poskusne skupine. 67

Table 11: The number of cells in proliferation of 1000 counted cells in mesenteric lymph nodes of piglets from the control and experimental groups. 67

Tabela 12: Povprečna arealna in numerična gostota germinativnih središč limfatičnih foliklov v mezenterialnih bezgavkah pujskov kontrolne in poskusne skupine..... 69

Table 12: The average areal and numerical densities of germinal centers of the lymphatic follicles in the mesenteric lymph nodes of piglets from the control and experimental groups 69

Tabela 13: Povprečno število TUNEL-pozitivnih celic v Peyerjevih ploščah ileuma pujskov kontrolne in poskusne skupine. 70

Table 13: The average number of TUNEL-positive cells in the ileum Peyer's patches of piglets from the control and experimental groups..... 70

Tabela 14: Povprečno število makrofagov v Peyerjevih ploščah ileuma pujskov kontrolne in poskusne skupine..... 72

Table 14: The average number of macrophages in the ileum Peyer's patches of piglets from the control and experimental groups 72

Tabela 15: Število celic v proliferaciji na 1000 preštetih celic v Peyerjevih ploščah ileuma pujskov kontrolne in poskusne skupine. 74

Table 15: The number of cells in proliferation of 1000 counted cells in the ileum Peyer's patches of piglets from the control and experimental groups 74

Tabela 16: Povprečno število limfocitov T v Peyerjevih ploščah ileuma pujskov kontrolne in poskusne skupine..... 76

Table 16: The average number of lymphocytes T in the ileum Peyer's patches of piglets from the control and experimental groups. 76

Tabela 17: Povprečna arealna in numerična gostota germinativnih središč limfatičnih foliklov v Peyerjevih ploščah ileuma pujskov kontrolne in poskusne skupine 77

Table 17: The average areal and numerical density of germinal centers of the lymphatic follicles in the ileum Peyer's patches of piglets from the control and experimental groups ... 77

Tabela 18: Povprečno število TUNEL-pozitivnih celic v vranicah pujskov kontrolne in poskusne skupine..... 78

Table 18: The average number of TUNEL-positive cells in the spleen of piglets from the control and experimental groups 78

Tabela 19: Povprečno število makrofagov v vranici pujskov kontrolne in poskusne skupine 80

Table 19: The average number of macrophages in the spleen of piglets from the control and experimental groups. 80

Tabela 20: Število celic v proliferaciji na 1000 preštetih celic v vranici pujskov kontrolne in poskusne skupine..... 82

Table 20: The number of cells in proliferation of 1000 counted cells in the spleen of piglets from the control and experimental groups. 82

Tabela 21: Povprečna arealna in numerična gostota germinativnih središč limfatičnih foliklov v vranici pujskov kontrolne in poskusne skupine. 84

Table 21: The average areal and numerical densities of germinal centers of the lymphatic follicles in the spleen of piglets from the control and experimental groups. 84

Tabela 22: Povprečno število TUNEL-pozitivnih celic v mezenterialnih bezgavk mladic kontrolne in poskusne skupine. 85

Table 22: The average number of total TUNEL-positive cells in the mesenteric lymph nodes of gilts from the control and experimental groups. 85

Tabela 23: Povprečno število makrofagov v mezenterialnih bezgavkah mladic kontrolne in poskusne skupine..... 87

Table 23: The average number of macrophages in the mesenteric lymph nodes of gilts from the control and experimental groups. 87

Tabela 24: Število celic v proliferaciji na 1000 preštetih celic v mezenterialnih bezgavkah mladic kontrolne in poskusne skupine. 89

Table 24: The number of cells in proliferation of 1000 counted cells in the mesenteric lymph nodes of gilts from the control and experimental groups. 89

Tabela 25: Povprečna arealna in numerična gostota germinativnih središč limfatičnih foliklov v mezenterialnih bezgavkah mladic kontrolne in poskusne skupine 91

Table 25: The average areal and numerical densities of germinal centers of the lymphatic follicles in the mesenteric lymph nodes of gilts from the control and experimental groups ... 91

Tabela 26: Povprečno število TUNEL-pozitivnih celic v Peyerjevih ploščah ileuma mladic kontrolne in poskusne skupine 92

Table 26: The average number of total TUNEL-positive cells in the ileum Peyer's patches of gilts from the control and experimental groups. 92

Tabela 27: Povprečno število makrofagov v Peyerjevih ploščah ileuma mladic kontrolne in poskusne skupine..... 94

Table 27: The average number of macrophages in the ileum Peyer's patches of gilts from the control and experimental groups. 94

Tabela 28: Število celic v proliferaciji na 1000 preštetih celic v Peyerjevih ploščah ileuma mladic kontrolne in poskusne skupine. 96

Table 28: The number of cells in proliferation of 1000 counted cells in the ileum Peyer's patches of gilts from the control and experimental groups 96

Tabela 29: Povprečno število limfocitov T v Peyerjevih ploščah ileuma mladic kontrolne in poskusne skupine..... 98

Table 29: The average number of lymphocytes T in the ileum Peyer's patches of gilts from the control and experimental groups 98

Tabela 30: Povprečna arealna in numerična gostota germinativnih središč limfatičnih foliklov v Peyerjevih ploščah ileuma mladic kontrolne in poskusne skupine 99

Table 30: The average areal and numerical densities of germinal centers of the lymphatic follicles in the ileum Peyer's patches of gilts from the control and experimental groups 99

Tabela 31: Povprečno število TUNEL-pozitivnih celic v vranici mladic kontrolne in poskusne skupine 100

Table 31: The average number of TUNEL-positive cells in the spleen of gilts from the control and experimental groups. 100

Tabela 32: Povprečno število makrofagov v vranici mladic kontrolne in poskusne skupine 102

Table 32: The average number of macrophages of gilts from the control and experimental group..... 102

Tabela 33: Število celic v proliferaciji na 1000 preštetih celic v vranici mladic kontrolne in poskusne skupine..... 104

Table 33: The number of cells in proliferation of 1000 counted cells in the spleen of gilts from the control and experimental groups 104

Tabela 34: Povprečna arealna in numerična gostota germinativnih središč limfatičnih foliklov v vranici mladic kontrolne in poskusne skupine 106

Table 34: The average areal and numerical densities of the germinal centers of the lymphatic follicles in the spleen of gilts from the control and experimental groups 106

Tabela 35: Povzetek rezultatov morfometričnih meritev v vzorcih limfatičnih organov pri pujskih in mladicah, z označeno statistično značilno razliko med poskusno in kontrolno skupino. 107

Table 35: Summary of the results of morphometric measurements in samples of lymphatic organs in piglets and gilts with marked statistically significant difference between the experimental and control group..... 107

Tabela 36: Prikaz korelacije med opazovanimi spremenljivkami in konzumacijo krme pri mladicah in njihovih pujskih. 108

Table 36: The correlation among the observed variables and feed consumption of gilts and their piglets. 108

KAZALO SLIK

Slika 1: Molekulski mehanizem delovanja DON (povzeto po Pestka, 2007). 24

Figure 1: The molecular mechanism of action of DON (adapted from Pestka , 2007). 24

Slika 2: Shema odvzetih vzorcev limfatičnih organov..... 46

Figure 2: Scheme of taken samples of lymphatic organs..... 46

Slika 3: Shema morfometričnih analiz in imunohistikemičnih barvanj na vzorcih tkiv limfatičnih organov. 47

Figure 3: Scheme of the morphometric analyzes and immunohistochemical staining on tissue samples of the lymphatic organs. 47

Slika 4: Slika zaslona pri merjenju površine za določitev razmerja med skorjo in sredico timusa z računalniškim programom NIS-Elements BR (Nikon). 49

Figure 4: Picture of the screen when measuring the surface to determine the relative ratio between the cortex and the medulla of the thymus, with the NIS-Elements BR (Nikon) computer program 49

Slika 5: Apoptoza celic v timusu pujskov..... 58

Figure 5: Cell apoptosis in thymus piglets..... 58

Slika 6: Imunohistokemičen prikaz makrofagov v timusu pujskov.. 60

Figure 6: Immunohistochemical analysis of macrophages in piglets thymus..... 60

Slika 7: Imunohistokemičen prikaz proliferacije celic v timusu pujskov. 62

Figure 7: Immunohistochemical analysis of cell proliferation in piglets thymus. 62

Slika 8: Apoptoza celic v mezenterialnih bezgavkah pujskov..... 64

Figure 8. Cell apoptosis in the mesenteric lymph nodes of piglets..... 64

Slika 9: Imunohistokemičen prikaz makrofagov v mezenterialnih bezgavkah pujskov..... 66

Figure 9: Immunohistochemical analysis of macrophages in the mesenteric lymph nodes of piglets. 66

Slika 10: Imunohistokemičen prikaz proliferacije celic v mezenterialnih bezgavkah pujskov68

Figure 10: Immunohistochemical analysis of cell proliferation in the mesenteric lymph nodes of piglets..... 68

Slika 11: Apoptoza celic v Peyerjevih ploščah ileuma pujskov..... 71

Figure 11. Cell apoptosis in the ileum Peyer's patches of piglets. 71

Slika 12: Imunohistokemičen prikaz makrofagov v Peyerjevih ploščah ileuma pujskov..... 73

Figure 12: Immunohistochemical analysis of macrophages in ileum Peyer's patches of piglets 73

Slika 13: Imunohistokemičen prikaz proliferacije celic v Peyerjevih ploščah ileuma pujskov75

Figure 13: Immunohistochemical analysis of cell proliferation in ileum Peyer's patches of piglets. 75

Slika 14: Imunohistokemičen prikaz limfocitov T v Peyerjevih ploščah ileuma pujskov..... 76
Figure 14. Immunohistochemical analysis of lymphocytes T in ileum Peyer's patches of piglets. 76
Slika 15: Apoptoza celic v vranici pujskov..... 79
Figure 15: Cell apoptosis in the spleen of piglets. 79
Slika 16: Imunohistokemičen prikaz makrofagov v vranici pujskov..... 81
Figure 16: Immunohistochemical analysis of macrophages in the spleen of piglets. 81
Slika 17: Imunohistokemičen prikaz proliferacije celic v vranici pujskov. 83
Figure 17: Immunohistochemical analysis of cell proliferation in the spleen of piglets. 83
Slika 18: Apoptoza celic v mezenterialnih bezgavkah mladic..... 86
Figure 18: Cell apoptosis in the mesenteric lymph nodes of gilts. 86
Slika 19: Imunohistokemičen prikaz makrofagov v mezenterialnih bezgavkah mladic..... 88
Figure 19: Immunohistochemical analysis of macrophages in the mesenteric lymph nodes of gilts. 88
Slika 20: Imunohistokemičen prikaz proliferacije celic v mezenterialnih bezgavkah mladic . 90
Figure 20: Immunohistochemical analysis of cell proliferation in the mesenteric lymph nodes of gilts..... 90
Slika 21: Apoptoza celic v Peyerjevih ploščah mladic. 93
Figure 21: Cell apoptosis in the ileum Peyer's patches of gilts. 93
Slika 22: Imunohistokemičen prikaz makrofagov v Peyerjevih ploščah ileuma mladic. 95
Figure 22: Immunohistochemical analysis of macrophages in ileum Peyer's patches of gilts. 95
Slika 23: Imunohistokemičen prikaz proliferacije celic v Peyerjevih ploščah ileuma mladic. 97
Figure 23: Immunohistochemical analysis of cell proliferation in ileum Peyer's patches of gilts. 97
Slika 24: Imunohistokemičen prikaz limfocitov T v Peyerjevih ploščah ileuma mladic..... 98
Figure 24: Immunohistochemical analysis of lymphocytes T in ileum Peyer's patches of gilts. 98
Slika 25: Apoptoza celic v vranici mladic. 101
Figure 25: Cell apoptosis in the spleen of gilts. 101
Slika 26: Imunohistokemičen prikaz makrofagov v vranici mladic. 103
Figure 26: Immunohistochemical analysis of macrophages in the spleen of gilts. 103
Slika 27: Imunohistokemičen prikaz proliferacije celic v vranivi mladic. 105
Figure 27: Immunohistochemical analysis of cell proliferation in the spleen of gilts. 105

SEZNAM OKRAJŠAV

3ADON	3-acetil-deoksinivalenol
15ADON	15-acetil-deoksinivalenol
AG	arealna gostota
BES	brezdušične ekstraktivne snovi
ºC	stopinj celzija
CCasp3	metoda za določanje »cleaved caspase3«
DAS	mikotoksin diacetoksiscirpenol
DNK	deoksiribonukleinska kislina (angl. DNA)
DON	mikotoksin deoksinivalenol
ERK	angl. extracelular signal-regulated kinase
G1, 2, 0	stopnje celičnega ciklusa
GF	angl. germ free
gs	germinativno središče
HE	barvanje hematoksilin eozin
HT-2	mikotoksin HT-2
IgA	imunoglobulini razreda A
IgM	Imunoglobulini razreda M
IPDRČ	Inštitut za patologijo, divjad, ribe in čebele
i/v	intravenozno
i/p	intaperitonealno
p/o	peroralno
JNK	angl. jun N-terminal kinase
Kat. št.	kataloška številka
LD_{50}	srednji letalni odmerek
MAPK	mitogensko aktivirane protein kinaze
M celice	angl. Microfold cells
ME	metabolna energija
MHC	poglavitni histokompatibilnostni kompleks
mRNA	sporočilna RNA

NG	numerična gostota
p53	protein 53
PBS	angl. Phosphor buffer solution (fosfatni pufer)
RNK	ribonukleinska kislina
rp	rdeča pulpa
S	stopnja celičnega ciklusa
SPF	angl. specific pathogen free
T-2	mikotoksin T-2
TBST	angl. Tris-Buffered-Saline-Tween (pH = 7,5)
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt) dUTP Nick-End Labeling
t. m.	telesna masa
TNF-α	tumor nekrotizirajoči faktor α
UV	ultravijolično valovanje
ZEA/ZON	mikotoksin zearalenon

1 UVOD

Mikotoksin deoksinivalenol (DON) je zelo razširjen mikotoksin. Večinoma ga proizvajajo plesni vrste *Fusarium*, ki uspevajo na koruzi in drugih žitih. Spada v skupino trihotecenov (Pestka in sod., 2004). Trihoteceni iz skupine A, kamor spadata T-2 toksin in diacetoksiscirpenol, se redko pojavljajo v hrani. Trihoteceni iz skupine B so razširjeni po vsem svetu in se pojavljajo tudi v končnih proizvodih. Povzročajo zastrupitve živali in ljudi. Znano je, da trihoteceni iz skupine B na različne načine negativno vplivajo na zdravje ljudi in živali. V to skupino spadajo DON in njegovi acetilirani predstopnji, 3-acetildeoksinivalenol in 15-acetildeoksinivalenol, nivalenol in njegova acetilirana predstopnja 4-acetilnivalenol. Navedeni mikotoksini se v naravi pogosto skupaj pojavljajo (Pestka, 2010a). Njihove koncentracije in kombinacije so zelo raznolike, poleg tega so lahko v istem vzorcu tudi drugi mikotoksini, ki jih proizvaja ista ali druga plesen. To je vzrok, zakaj se rezultati različnih raziskav med seboj razlikujejo in zakaj potencialna nevarnost teh mikotoksinov še vedno za zdravje ljudi in živali ni razjasnjena.

V nedavnih raziskavah je bilo ugotovljeno, da je DON med mikotoksini, ki jih proizvajajo plesni *Fusarium*, najpogosteje ugotovljen mikotoksin v žitnih vzorcih. Pojavnost v njih je bila 58 % (Streit in sod., 2012; Ferrigo in sod., 2016; Lee in Ryu, 2017). Prisotnost DON v hrani in v krmi nedvomno pomeni resno vprašanje o njeni varnosti. Ker DON standardni procesi predelave (mletje, pečenje) ne uničijo, ga najdemo v mnogih končnih proizvodih. Zato je Komisija EU izdala uredbo o največjih še sprejemljivih vsebnosti DON v proizvodih, namenjenih za človeško prehrano (Commission regulation 1126/2007/EC), in priporočila za živalsko prehrano (Commission recommendation 2006/576/EC).

S številnimi raziskavami na laboratorijskih živalih in celičnih linijah je bilo ugotovljeno, da izpostavljenost nizkim dozam DON poveča izražanje genov za citokine, kemokine in vnetje ter tako deluje imunostimulatorno. Visoke doze DON povzročajo apoptozo levkocitov in s tem imunosupresijo (Pestka in sod., 2004).

Sedanje raziskave na področju DON (Pestka in sod., 2004) so usmerjene na preučevanje molekularnih povezav med mitogensko aktiviranimi protein kinazami (MAPK) in DON,

vendar se še nismo premaknili od dejstva, da DON lahko deluje stimulativno ali zaviralno na imunski odziv, včasih celo v enaki koncentraciji, kar predstavlja na videz nerešljivo protislovje, vendar pri teh raziskavah niso bile uporabljene standardizirane metode, prav tako so med njimi zelo različno predstavljeni in obravnavani raziskovalni modeli. Celice imunskega sistema, kot so makrofagi, limfociti B in T, so tarče delovanja DON. Na rezultate raziskav vpliva doza, pogostnost in čas izpostavljenosti ter časovna točka, v kateri je bila opravljena imunološka analiza.

Med živalskimi vrstami, pri katerih so ugotavljali učinke DON, so se kot najobčutljivejša vrsta pokazali prašiči. Najbolj opazno klinično znamenje pri zauživanju krme z DON nad koncentracijo 0,9 mg/kg je manjša ješčnost prašičev, zaradi česar slabše priraščajo.

Poskusi z DON na prašičih so pomembni predvsem zaradi dveh razlogov: prvič, prašiči so pomemben vir hrane, zato manjše zauživanje krme zaradi vsebnosti DON povzroča veliko gospodarsko škodo. Drugi razlog je, da so prašiči fiziološko podobni ljudem, zato so pomemben model za biomedicinske raziskave pri različnih bolezenskih stanjih ljudi. Obstaja verjetnost, da DON povzroča v prašičih in v ljudeh zelo podobne učinke in da z raziskavami, narejenimi na prašičih, lahko sklepamo o morebitnih podobnih učinkih na ljudeh (Rothkötter, 2009; Pestka, 2010a; Pestka, 2010b).

O učinkih DON na imunski odziv prašičev je razmeroma malo znanega. Podatki kažejo, da DON povzroči slabši imunski odziv po cepljenju, poveča ali zmanjša proliferativno sposobnost limfocitov po dodatku mitogenov fitohemaglutinina (PHA) ali konkanavalina A (Con-A), vpliva na dendritične celice (npr. zmanjša njihovo endocitozno aktivnost), poveča maso jeter ter zmanjša koncentracijo serumskih albuminov in globulinov (Goyarts in sod., 2006b; Bimczok in sod., 2007; Pinton in sod., 2008).

Le nekaj raziskav je, v katerih so preučevali učinke krme, kontaminirane z DON, na breje mladice (prvič breje svinje), ki so še posebno občutljiva kategorija prašičev. V nekaterih raziskavah so ugotovili zmanjšano ješčnost živali, vendar to ni vplivalo na embrionalno smrtnost (Friend in sod., 1983). Ravno nasprotno, v drugih raziskavah niso potrdili vpliva DON na ješčnost, prav tako ni bilo statistično značilnih razlik v številu novorojenih in

odstavljenih pujskov (Chavez, 1984; Friend s sod., 1986). Diaz-Llano in Smith (2006, 2007) sta ugotovila, da krmljenje brejih mladic in mladic v laktaciji s 5,5 mg/kg DON, 0,5 mg/kg 15 acetil-DON in 0,3 mg/kg zearalenona poveča število mrtvorojenih pujskov, vendar ne vpliva na maso ob odstavitvi in smrtnost pujskov med laktacijo.
Posledice na pujskih, če njihove matere med brejostjo konzumirajo krmo z DON, so lahko neposredne zaradi transplacentarnega prenosa toksina v razvijajoče se pujske ali posredno zaradi manjše ješčnosti svinj. Zato dobijo pujski manj energije, kar se lahko odraža na različne načine (Dänicke in sod., 2007). Kvaliteta mleka pri konzumaciji krme z DON ni spremenjena (Diaz-Llano in Smith, 2007), poleg tega se DON izloča v mleko le v sledovih, < 2 µg/kg (Friend in sod., 1986).

Če povzamemo, v poskusih z DON na brejih mladicah, teh je bilo do sedaj opravljenih zelo malo, različni avtorji niso ugotovili sprememb na fetusih in sesnih pujskih (Dänicke in sod., 2007; Goyarts in sod., 2007; Tiemann in sod., 2008; Wippermann in sod., 2009; Goyarts in sod., 2010; Gutzwiller, 2010), zato so se raziskovalci osredotočili na raziskave starejših pujskov, večinoma odstavljencev, ki že samostojno konzumirajo krmo (Chen in sod., 2008; Mikami in sod., 2010). Rezultati raziskav se razlikujejo. Predvsem pri nizkih koncentracijah DON so te razlike bolj očitne, kjer Chen in sod. (2008) ugotavljajo, da že povzročajo histopatološke spremembe tako na jetrih, vranici, bezgavkah, maternici in ledvicah, medtem ko Accensi in sod. (2006) ugotavljajo, da nizke koncentracije DON pri prašičih ne povzročajo nobenih hematoloških in biokemičnih sprememb, ne vplivajo na imunski odziv in da ostajajo učinki nizkih koncentracij DON neznani.

Kljub navedenemu smo v naših prejšnjih raziskavah ugotovili, da imajo mladice, ki konzumirajo krmo s koncentracijo DON 5,08 mg/kg, v kolostrumu statistično značilno manj imunoglobulinov razreda A (IgA). V serumu njihovih pujskov 12, 24 in 48 ur po prvem sesanju je bilo statistično značilno manj IgA in tudi IgG (Jakovac-Strajn, 2008).

Namen naloge je z morfometričnimi in z imunohistokemičnimi metodami dokazati imunosupresivni učinek krme, ki vsebuje mikotoksin DON, na limfatične organe mladic in njihovih teden dni starih sesnih pujskov. Mladice v poskusni skupini so bile krmljene s krmo,

ki je vsebovala 5,08 mg DON/kg, štiri tedne pred porodom, v času laktacije in do ponovne osemenitve (skupaj 52 ± 1 dan). Pričakujemo, da:

- obstaja razlika med kontrolno in poskusno skupino v številu in velikosti germinativnih središč limfatičnih organov (v Peyerjevih ploščah ileuma, mezenterialnih bezgavkah in vranici pri mladicah in pujskih) ter v razmerju med skorjo in sredico timusa pri pujskih;
- obstaja razlika med kontrolno in poskusno skupino v stopnji apoptoze in proliferacije celic, številu makrofagov in limfocitov T v vseh omenjenih limfatičnih organih.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 MIKOTOKSINI

Mikotoksini so sekundarni, toksični presnovki plesni, ki so škodljivi za ljudi in živali. V primerjavi s primarnimi presnovki (aminokisline, maščobne kisline, saharidi in proteini) predstavljajo mikotoksini substance, ki niso bistvenega pomena za razvoj plesni. Te potrebujejo za svojo rast hrano, primerno vlago, kisik in ustrezno temperaturo (najpogosteje 12-25 ^{o}C). Dejavniki, ki zmanjšujejo vitalnost rastlin, kot so: suša na poljih, visoka temperatura, žuželke; po drugi strani pa vlaga in mehanične poškodbe rastlin ob žetvi, povečujejo njihovo dovzetnost za okužbo s plesnimi. Med skladiščenjem krme pospeši razmnoževanje plesni več kot 13 % vsebnost vlage substrata, več kot 70 % relativna vlaga zraka, temperature nad 13 ^{o}C in aerobni pogoji skladiščenja krme (Žust in sod., 2004). Dokaj dobro so znane razmere, ki jih plesni potrebujejo za rast, malo pa vemo o razmerah, ki pogojujejo nastanek mikotoksinov. Verjetno jih plesni izločajo kot odgovor na stres, ko za njihovo aktivno rast ni več ustreznih razmer. Glede tvorbe toksinov obstajajo med plesnimi tudi genetske razlike. Kemično so mikotoksini različni in imajo nizko molekularno maso (Osweiler, 1999; Bennett in Klich, 2003). Njihov spekter bioloških učinkov je širok. Toksični so lahko za točno določena mesta v organizmu ali pa lahko poškodujejo bistvene fiziološke mehanizme celičnih funkcij, npr. celično membrano, celični energetski mehanizem, medcelične povezave ter proliferacijo in diferenciacijo (Jakovac-Strajn, 2008).

K mikotoksinom prištevamo 300 do 400 substanc. Približno 12 skupin teh je deležnih večje pozornosti zaradi ogrožanja živalskega in človeškega zdravja (Biro, 2003). Mikotoksikoze so motnje, povzročene z mikotoksini, za razliko od mikoz, nastalih zaradi okužbe živali s plesnimi (Žust in sod., 2004). Klinična znamenja so odvisna od vrste mikotoksina, njegove količine in časa delovanja ter od starosti, zdravstvenega stanja, vrste in spola izpostavljenega osebka (Bennett in Klich, 2003). Na živalih se škodljivi učinki kažejo predvsem z nespecifičnimi znamenji, kot so: slabša ješčnost, zmanjšana proizvodnja, zaostajanje v rasti in večja dovzetnost za okužbe (Žust in sod., 2004). Na potek bolezni seveda vplivajo tudi genetska zasnova živali, neprimerna prehrana in drugi toksični dejavniki, o katerih danes vemo še zelo malo. Pojavljanje mikotoksikoz je največkrat povezano z zauživanjem

kontaminirane krme, pomemben način okužbe je tudi stik kože in plesnivih substratov ali njihovo vdihavanje (Bennett in Klich, 2003).

Strokovnjaki razvijajo na plesni odporne vrste rastlin in različne fungicide, vendar ne poznamo nobene zares učinkovite zaščitne metode. Priporočljivi so preventivni ukrepi, ki vključujejo dobro proizvodno prakso in zadostno sušenje pridelka po žetvi. Obolelim živalim lahko nudimo le podporno terapijo (dieta, rehidracija) (Jakovac-Strajn, 2008). Mikotoksinom se pravzaprav ne da izogniti, ker so nekakšni »naravni« kontaminanti hrane. Zaradi načina pridelovanja in klimatskih sprememb vedno bolj pridobivajo na pomembnosti (Bennett in Klich, 2003). Ljudje so zastrupitvam z mikotoksini, ki imajo lastnost kopičenja v živalskem tkivu ali organih, lahko izpostavljeni tudi posredno, to je z uživanjem živil živalskega izvora (Cavret in Lecoeur, 2006).

V skupino zdravju nevarnih mikotoksinov spadajo: aflatoksini, DON, fumonizini, zearalenon (ZEA), T-2 toksin, ohratoksin A in ergot alkaloidi. Zadnja leta se najpogosteje pojavljajo okužbe žitaric (pšenica, ječmen, koruza) s plesnimi iz rodu *Fusarium,* ki proizvajajo izredno pomembno skupino mikotoksinov – trihotecene (Biro, 2003).

2.1.1 Trihoteceni

Mikotoksine iz skupine trihotecenov, ki spadajo v skupino več kot 200 strukturno podobnih presnovkov, proizvajajo plesni iz rodov *Fusarium*, *Myrothecium*, *Cephalosporium*, *Trichoderma* in *Stachybotrys* (Pestka in sod., 2008). To so raznolika skupina seskviterpenoidnih presnovkov, ki imajo, poleg seskviterpenskega obroča, tudi epoksi skupino na 12. ter 13. ogljikovem (C) atomu. Izraz trihotecen izvira iz besede trihotecin, ki je bil identificiran kot prvi član te družine (Bennett in Klich, 2003; Pestka 2004). Večina trihotecenov ima dvojno vez na položaju C-9, 10 in različne komponente na položaju C-3, 4, 7, 8 in 15 (Biro, 2003).

Trihotecene delimo na osnovi razlik, njihovih značilnih funkcionalnih skupin, v štiri skupine: A, B, C in D. Toksina T-2 in DAS sta najpomembnejša predstavnika skupine A; skupine B pa DON in nivalenol (NIV) (Biro, 2003). V skupino C spadajo makrociklični trihoteceni:

verukarini A, B, J, roridini A, D, E in satratoksini F, G in H (Biro, 2003; Žust in sod., 2004); v skupino D pa trihoteceni, ki vsebujejo velik makrocikličen obroč, združen z epoksitrihotecenskim jedrom. Primer takšnega trihotecena je krotocin (Grove, 1993). Iz rodu *Fusarium* trihotecene skupine A v glavnem proizvajajo *F. sporotrichioides, F. poae* ter *F. equiseti*, medtem ko trihotecene skupine B proizvajajo le *F. graminearum* in *F. culmorum* (Biro, 2003). Odvisno od okoliščin lahko plesni ene vrste proizvajajo različne posamične ali hkrati po dva in več toksinov iz skupine trihotecenov, lahko pa tudi druge, zlasti zearalenon, moniliformin in fumonizine (Žust in sod., 2004).

Pri ljudeh in živalih se njihovi toksikološki učinki kažejo kot neješčnost, gastroenteritis, slabost in hematološke motnje. Na trihotecene je še posebno občutljiv imunski sistem (Pestka in sod., 2008). DAS (diacetoksiscirpenol), DON in T-2 so najbolj raziskani trihoteceni, vendar način njihovega delovanja še ni dokončno pojasnjen (Bennett in Klich, 2003).

2.1.2 Deoksinivalenol (DON)

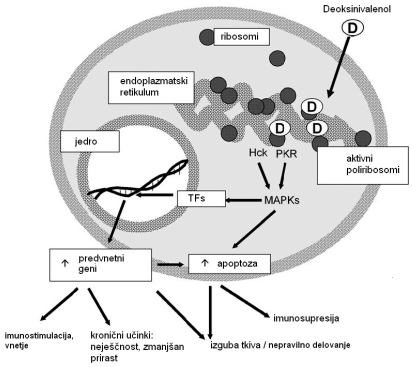
DON, najpogosteje ugotovljen trihotecen, je znan tudi pod imenom vomitoksin. Vse živalske vrste so nanj občutljive. Zaradi razlik v presnovi, absorbciji, porazdelitvi toksina po organizmu in izločanju so najbolj občutljivi prašiči, sledijo miši, podgane, perutnina in prežvekovalci. V Evropi je DON povezan z akutnimi in kroničnimi obolenji farmskih, ekonomsko pomembnih živali, še posebno prašičev (Biro, 2003).

DON je manj toksičen od drugih trihotecenov, vendar je najbolj razširjen in ga pogosto najdemo v ječmenu, koruzi, rži, sončničnih semenih, pšenici in mešani krmi (Bennett in Klich, 2003). Topen je v vodi in v polarnih topilih ter stabilen v organskih topilih. Za njegovo dolgotrajno shranjevanje sta najprimernejša etil acetat in acetonitril. Zaradi α, β- nenasičenih keto skupin ima kratkovalovno UV-absorbcijo. Med obdelavo surovin DON ne propade in je odporen tudi na blage kisline, ker je trihotecenski skeleton kemično stabilen (Widestrand in Pettersson, 2001; Biro, 2003).

DON je bil prvič izoliran na Japonskem, in sicer pod imenom »Rd-toksin«, iz poškodovanega ječmena, okuženega s plesnijo vrste *Fusarium* (Morooka in sod., 1972). Ista substanca je bila

izolirana iz koruze leto dni kasneje, zaradi nje so prašiči bruhali, zato je dobila ime vomitoksin (Vesonder in sod., 1973). Pri prašičih je bilo od takrat opisanih veliko primerov odklanjanja in zmanjšane konzumacije krme, kar je pomemben vzrok ekonomskih izgub (Rotter in sod., 1996). Številne študije so pri laboratorijskih živalih pokazale, da DON vpliva tudi na imunski odziv (Bondy in Pestka, 2000; Morgavi in Riley, 2007). Ugotovljeni mehanizem delovanja pri laboratorijskih živalih nakazuje možno vpletenost v spremenjen imunski odziv tudi v farmskih razmerah, čeprav primarni ciljni organ delovanja DON ostaja pri farmskih živalih nedoločen. Najbolj viden učinek je zmanjšana telesna masa zaradi zmanjšane ješčnosti in slabosti (Morgavi in Riley, 2007).

Trihoteceni *in vitro* inhibirajo sintezo proteinov. Vežejo se na 60S podenoto evkariontskih ribosomov in ovirajo aktivnost peptidiltransferaze. To vpliva na iniciacijo (T-2 toksin) ali na elongacijo peptidne verige (DON) (Biro, 2003; Goyarts in sod., 2006). Posledica je moteno celično sporazumevanje zaradi »ribotoksičnega stresnega odgovora«. Tega so dokazali za vse trihotecene in preostale inhibitorje translacije (npr. anisomicin, šiga toksin, ricin in α-sarcin) (Iordanov in sod., 1997). DON sproži fosforilacijo različnih MAPK, kot so ERK, p38 in JNK *in vitro* (Yang in sod., 2000; Moon in Pestka, 2002) ter *in vivo* (Zhou in sod., 2003). Pri procesih imunskega odziva in apoptoze so MAPK pomembni posredniki sporazumevanja (Slika 1) (Pestka, 2007).



Slika 1: Molekulski mehanizem delovanja DON (povzeto po Pestka, 2007).

Figure 1: The molecular mechanism of action of DON (adapted from Pestka , 2007).

Zaradi inhibitornega učinka na sintezo proteinov so na DON najbolj občutljive celice in tkiva z visoko biološko razpolovno dobo, na primer limfociti in hepatociti. V *in vivo* preučevanje

učinkov DON na sintezo proteinov je bilo usmerjenih le nekaj raziskav (Robbana-Barnat in sod., 1987; Azcona-Olivera in sod., 1995b; Friedman in sod., 1996). Prvi so preučevali učinek DON na inhibicijo sinteze proteinov pri prašičih Dänicke in sod. (2006) ter Goyarts in sod. (2006a). Radioaktivno označen fenilalanin ([$^2H_5$] – fenilalanin, 125 mg/kg telesne mase, t. m.) so aplicirali eno uro po hranjenju in raziskovali učinek DON na sintezo proteinov v jetrih (albumini, fibrinogen) in limfocitih. Prašiče (mase približno 40 kg) so krmili s krmo, ki je vsebovala 5,7 mg DON/kg krme. Vsi prašiči so dobivali enako količino krme, da bi lahko razlikovali učinek DON od učinkov zaradi zmanjšane ješčnosti. Ker so želeli proučiti pomen načina aplikacije, so živalim dali DON akutno (enkratni obrok), kronično (več kot 4 tedne) ter intravenozno (i/v, 53 µg DON/kg t. m.). Ugotovili so, da med skupinami ni bilo razlik v plazemski koncentraciji celotnih proteinov, albuminov (približno 60 g/l), fibrinogena in serumskih encimov. Sinteza albuminov je bila statistično značilno manjša, sinteza fibrinogena pa ne (Goyarts in sod., 2006a). Po žrtvovanju prašičev so dokazali (Dänicke in sod., 2006), da je bila sinteza proteinov statistično značilno manjša v ledvicah, vranici in ileumu ter manj izrazita v skupini, ki je DON dobila akutno, kar bi bila lahko posledica višje stopnje glukuronidacije cirkulirajočega DON (36 %). Glukuronidacije niso dokazali po i/v aplikaciji. Na sintezo proteinov v jetrih, skeletni in srčni mišičnini, mezenterialnih bezgavkah, duodenumu, jejunumu, mukoznih celicah jejunuma, pankreasu in pljučih DON ni imel učinka.

Spremenjena vrednost serumskih proteinov in spremembe na želodčni sluznici, po mnenju nekaterih avtorjev, nakazujejo specifične učinke DON (Prelusky in sod., 1994; Rotter in sod., 1994b, 1995). Pri prašičih so ocenjevali stopnjo mukoznih sprememb v fundusni regiji želodca od 0 do 7 (višja številka je pomenila bolj zgubano sluznico). Skupina, ki je uživala z DON kontaminirano krmo (4 mg DON/kg), je imela v primerjavi s kontrolno skupino in skupino, ki je dobivala kontrolno krmo restrikcijsko, najvišjo številko. Ugotovitev, da se prašiči, ki so dobivali DON, razlikujejo od drugih dveh skupin, je bila v skladu s prejšnjimi raziskavami (Rotter in sod., 1994b) in nakazuje, da so učinki na sluznico želodca lahko posledica krmljenja prašičev z DON in zmanjšane ješčnosti. Takšni učinki na črevesju so se pojavili tudi pri živalih, ki so bile izpostavljene trihotecenom z inhalacijo (Marrs in sod., 1986). Poleg direktnega učinka DON na sintezo plazemskih proteinov je treba omeniti še indirekten učinek na sekrecijo limfocitov T, kajti povečano izločanje interlevkina (IL) 6 (IL-

6) lahko sproži akutni odziv, v katerem se poviša koncentracija fibrinogena kot pozitivnega proteina akutne faze in se zmanjša koncentracija albumina kot enega negativnih reaktantov akutne faze (Goyarts in sod., 2006a), kot tudi nevroendokrine učinke DON (Rotter in sod., 1996).

Z gastrointestinalno absorbcijo mikotoksin DON hitro preide v kri in se razporedi po organizmu. Pri prašičih so dokazali DON v krvi manj kot 30 minut po konzumaciji. Ugotovili so do 82 % sistemsko resorbcijo, po kateri se je pojavila prehodna razporeditev v tkivih s polovičnim časom izločanja 3,9 h. V tkivih se je akumuliralo zelo malo toksina (Prelusky in sod., 1988; Prelusky in Trenholm, 1991a, b; Eriksen in sod., 2004). Podobno so ugotovili tudi v poskusu, ko so prašiči v obroku dobivali 4,7 mg DON/kg krme. Absorbcija je bila najmanj 67 % (Friend in sod., 1986a). Izločanje DON iz plazme pri prašičih je po enkratnem oralnem odmerku, v primerjavi z drugimi domačimi živalmi, počasnejše in je približno 7-krat daljše kot pri ovcah, 2-krat daljše kot pri kravah in malenkost daljše kot pri nesnicah (Cavret in Lecoeur, 2006). Približno 10 % DON in njegovih derivatov je pri ovcah in prašičih vezanih na plazemske beljakovine. Vzrok oziroma način te povezave ostaja neznan (Cavret in Lecoeur, 2006). Hitro pojavljanje v plazmi ali krvi kaže na absorbcijo v začetku prebavnega trakta, predvsem iz želodca in zgornjega dela tankega črevesja. O načinu, kako mikotoksini prehajajo črevesno bariero, je malo znanega. Zelo verjetno poteka prehod s pomočjo aktivnega ali pasivnega transcelularnega transporta. Pasivni transport je odvisen od fizikalno-kemičnih lastnosti molekul, ki omogočajo prehod apikalne ali bazalne lipofilne membrane. Molekule z izrazitejšo lipofilnostjo lažje prehajajo skozi črevesno bariero. Za aktivni transport so potrebni transporterji, ki jih za mikotoksine plesni iz rodu *Fusarium* zaenkrat še ne poznamo (Cavret in Lecoeur, 2006; Sergent in sod., 2006).

Ker je DON vodotopen, se v živalskem tkivu slabo akumulira. Coppock in sod. (1985) ter Prelusky in Trenholm (1991b) niso mogli dokazati statistično značilnih reziduov v tkivih 24 ur po intravenozni (i/v) aplikaciji DON v odmerku 0,5 in 1,0 mg DON/kg t. m. Tudi po dalj časa trajajoči (3-7 tednov) konzumaciji DON v krmi (6,0-7,6 mg/kg) sta Prelusky in Trenholm (1992) odkrila samo sledi reziduov v tkivih. Ključno opažanje pri teh študijah je, da se DON pri vseh vrstah presnavlja in ne bioakumulira. Zato rezidui v mleku, mesu in jajcih ne predstavljajo za ljudi nobene nevarnosti. Kljub navedenemu pa se metabolizem, kopičenje in

možen prenos DON tudi s hrano živalskega izvora še vedno proučuje (Jakovac-Strajn, 2008). Ocenjeno tveganje je za ljudi zaradi konzumacije naštetih tkiv neznatno v primerjavi s konzumacijo kontaminiranih žitaric, kjer so koncentracije znatno večje. Pomembna ugotovitev je bila, da vrednosti koncentracij DON v serumu, žolču in tkivih variirajo celo takrat, ko vsem prašičem dajemo enako količino krme (restriktivno krmljenje). To dokazuje, da so, poleg vsebnosti DON v krmi, individualne razlike med živalmi v absorbciji, distribuciji, metabolizmu in ekskreciji tisti najpomembnejši dejavniki, ki vplivajo na koncentracijo DON v analiziranih vzorcih (Jakovac-Strajn, 2008). Friend in sod. (1986b) so ugotovili, da se DON z mlekom izloča le v sledovih (manj kot 2 µg/kg), če ga svinje zaužijejo s krmo v koncentraciji 0,2 mg, 3,8 mg in 6,2 mg/kg krme, in ne vpliva na kvaliteto in sestavo mleka (Friend in sod., 1986b; Diaz-Llano in Smith, 2007).

V žitaricah se včasih, poleg DON, nahajata tudi njegovi acetilirani obliki, 3-ADON in 15-ADON. Acetilirani trihoteceni se hitro de-acetilirajo, kar pomeni, da se po absorbciji 3-ADON, fuzarenon X ali T-2 toksin spremenijo v DON, nivalenol ali HT-2 toksin (Cavret in Lecoeur, 2006). Forsell in sod. (1987) so primerjali toksičnost 15-ADON in DON ter opazili, da je 50 % letalna doza (LD_{50}) pri intraperitonealni (i/p) aplikaciji 113 mg/kg t. m. za 15-ADON in 78 mg/kg t. m. za DON, kar kaže na to, da je DON 1,4-krat bolj toksičen kot 15-ADON. Ravno obratno se je pokazalo pri oralni aplikaciji, kjer je bila LD_{50} za 15-ADON 34 mg/kg t. m. in za DON 49 mg/kg t. m.. Omenjeno je potrebno upoštevati pri interpretaciji analiz krme in čim bolj natančno ugotoviti, kakšni koncentraciji DON so živali dejansko izpostavljene.

Pri miškah je akutni i/p odmerek DON (10-100 mg/kg t. m.) povzročil nekrozo intestinalnega trakta, kostnega mozga in limfatičnega tkiva ter poškodbe na ledvicah in srcu (Forsell in sod., 1987). Poškodbe na srcu so opazili tudi pri miših, ki so jim nekaj tednov dajali krmo s 10-20 mg DON/kg (Robbana-Barnat in sod., 1987). Histopatološke preiskave so pokazale, da DON vpliva na imunski sistem in je potencialni gastrointestinalni iritant (Tryphonas in sod., 1984). Subkronična konzumacija DON, primerljiva s koncentracijo, ki se nahaja v kontaminirani hrani in krmi, vpliva na črevesni prenos in absorbcijo hranilnih snovi pri miših (Hunder in sod., 1991). Ugotovili so tudi, da je občutljivost na DON odvisna od spola, saj so mišje samice bolj odporne kot intaktni ali kastrirani samci (Rotter in sod., 1994a). Čeprav je DON

akutno letalen, ko ga živali konzumirajo v zadostnih količinah, pa je bolj pogosta srednja do nizka konzumacija toksina, ki povzroči številne še slabo znane učinke, povezane s proizvodnjo in imunostjo. Monogastrične živali, še posebno prašiči, so na DON zelo občutljivi. Kokoši, purani in prežvekovalci imajo višjo toleranco. Pri perutnini koncentracija do 8 mg DON/kg krme nima nobenih učinkov na proizvodne parametre. Vendar pa so hitrorastoči brojlerji bolj občutljivi in začnejo prej odklanjati krmo kot nesnice. Prežvekovalci so na učinke DON precej neobčutljivi, delno verjetno zaradi sposobnosti vampovih mikroorganizmov, ki lahko v 24-ih urah detoksicirajo DON, če ga je v krmi do 10 mg/kg (Rotter in sod., 1996). Manjša konzumacija se pri prežvekovalcih pojavlja pri koncentraciji 10-20 mg DON/kg krme. Molznice so, v primerjavi s pitanci in ovcami, na DON bolj občutljive verjetno zaradi večjega stresa, ki so mu izpostavljene (Morgavi in Riley, 2007).

Pri prašičih sta pri konzumaciji krme, naravno kontaminirane z DON v koncentraciji manj kot 2 mg/kg, bistvena klinično opazna učinka, in sicer zmanjšana ješčnost in nižja telesna masa (Friend in sod., 1982; Trenholm in sod., 1984; Rotter in sod., 1994b). Učinki so pri nizkih koncentracijah večinoma prehodni in živali hitro nadoknadijo začetne izgube (Weaver in sod., 1978; Friend in sod., 1992; Prelusky in sod., 1994). Pri prašičjih pitancih je bila ugotovljena statistično značilno zmanjšana ješčnost pri 1,3 mg DON/kg krme, ki ji je sledilo popolno odklanjanje krme pri 12 mg DON/kg krme in bruhanje pri 20 mg DON/kg krme (Forsyth in sod., 1977; Young in sod., 1983; Abbas in sod., 1986). Prav zmanjšana ješčnost pa po drugi strani pomeni, da so toksični učinki v veliki meri samo-omejeni, zato v terenskih poskusih nikoli ni bilo dokumentiranih hudih poškodb (Chavez in Rheaume, 1986; Friend in sod., 1986a; Harvey in sod., 1989). Bolj pogosti znaki akutne izpostavljenosti so abdominalna bolečina, povečano slinjenje in občutek slabosti (Vesonder in Hesseltine, 1981; Young in sod., 1983). Klinično se pojavljajo tudi gastrointestinalne težave: mehko blato, driska, povečana dovzetnost za druge bolezni in padec kondicije (Morgavi in Riley, 2007). Anoreksične in emetične sposobnosti DON so enake ali celo večje od opisanih za bolj toksične trihotecene. Na primer: T-2 toksin je približno 10-krat bolj toksičen, vendar ima dosti manjšo emetično aktivnost od DON (Forsyth in sod., 1977; Vesonder in Hesseltine, 1981; Friend in sod., 1982; Pestka in sod., 1987; Prelusky in Trenholm, 1993). Tudi Bergsjø in sod. (1993) so ugotovili statistično značilno zmanjšano dnevno konzumacijo krme in klavno maso pri prašičih, krmljenih s 3,5 mg DON/kg krme. Pri tej koncentraciji DON so

ugotovili tudi povečano maso jeter, zmanjšano koncentracijo serumskih proteinov in albuminov ter začasno zmanjšanje hematokrita, serumskega kalcija in serumskega fosforja.

Nekaj raziskav je preučevalo tudi učinke krme, kontaminirane z DON, na breje mladice. Friend in sod. (1983) so mladice prvih 54 dni brejosti krmili s krmo, ki je vsebovala 0,1 mg, 1,7 mg in 3,5 mg DON/kg krme. Zadnja koncentracija je povzročila statistično značilno zmanjšanje konzumacije in telesne mase. Leto dni kasneje je Chaves (1984) med brejostjo in laktacijo krmil mladice s krmo, ki je vsebovala 0,17-3,29 mg DON/kg. V konzumaciji krme in številu novorojenih ter odstavljenih pujskov ni bilo statistično značilnih razlik, bile pa so v telesni masi med skupinami v obdobju prasitev, zadnjih 90 dni gestacije in po prasitvah. V naslednjem poskusu so Friend in sod. (1986c) krmili mladice med brejostjo in laktacijo s krmo, ki je vsebovala 0,2, 3,8 in 6,2 mg DON/kg. Na mladicah in na masi njihovih pujskov ob odstavitvi in klanju niso opazili nobenega učinka. Nedavno sta Diaz-Llano in Smith (2006) ugotovila, da krma, naravno kontaminirana z DON, lahko poveča število mrtvorojenih pujskov. Ista avtorja (Diaz-Llano in Smith, 2007) sta v svoji zadnji raziskavi, kjer so breje in doječe svinje krmili s 5,5 mg DON/kg, zaključila, da ni nobenih razlik v telesni masi pujskov ob odstavitvi. Prav tako nista opazila nobenih učinkov na smrtnost pujskov med laktacijo. Ugotovila pa sta zmanjšano konzumacijo krme in posledično izgubo telesne mase pri mladicah.

Mnogi mikotoksini, med njimi tudi DON, lahko vplivajo na imunski odziv pri ljudeh in živalih. Ta lastnost DON je zadnja leta deležna velike pozornosti. Večina raziskav kaže, da DON lahko deluje imunosupresivno ali imunostimulatorno, to je odvisno od koncentracije in časa izpostavljenosti (Rotter in sod., 1996; Meky in sod., 2001; Pestka, 2007; Pestka, 2010a). V intenzivni prašičerejski proizvodnji imajo tudi najmanjši učinki na imunski odziv pomembne ekonomske posledice (Jakovac-Strajn, 2008).

2.2 IMUNSKI SISTEM

Imunski sistem sestavlja več strukturno in funkcijsko različnih organov in tkiv, razporejenih po različnih delih telesa. Organi so ali samostojni, obdani s kapsulo, ali pa se nahajajo kot skupki difuznega limfatičnega tkiva. Glede na funkcijo jih delimo na primarne limfatične

organe, ki nudijo primerno mikrookolje za razvoj naivnih limfocitov, ter na sekundarne limfatične organe, kjer se imunsko zmožni limfociti srečajo z antigeni. Limfne žile in krvožilni sistem povezujejo limfatične organe v učinkovito celoto. K primarnim limfatičnim organom sodijo timus, kostni mozeg, Fabricijeva burza pri pticah in Peyerjeve plošče pri nekaterih sesalcih. V teh organih zorijo imunsko zmožni limfociti. Sekundarni limfatični organi so vranica, bezgavke in limfatično tkivo sluznic. V njih se razvija imunski odziv, saj se tu imunsko zmožni limfociti srečajo z antigenom, se razmnožujejo in preoblikujejo (Vozelj, 1985; Rigler, 1992; Jurca, 2003; Tizard, 2004; Tizard 2009).

2.2.1 Timus

Timus je primarni limfatični organ, ki ga imajo vsi vretenčarji (Vozelj, 1985) in ima režnjasto zgradbo. Posamezni režnji so med seboj ločeni z vezivnotkivnimi pretini in so sestavljeni iz zunanjega korteksa (skorje) in notranje medule (sredice) (Vozelj, 1985; Jurca, 2003). V nasprotju s timusom pri drugih domačih živalih timus prašiča ni čisto entodermalnega izvora. Pri oblikovanju prvotnega glavnega dela timusa sodeluje namreč z majhnim delom tudi slepi končni del ektodermalnega odseka duktusa precervicalisa. Poleg tega ima prašič lahko še dodatno samostojni *thymus superficialis*, ki izvira iz duktusa precervikalisa in je izključno ektodermalnega izvora (Rigler, 1992).

Velikost timusa se v življenju spreminja, saj je največji pri novorojenih živalih in nekoliko manjši med puberteto. Pri odraslih živalih je zelo majhen in ga je včasih tudi težko najti. Lociran je v prsni votlini, pod srcem. Pri konjih, govedu, ovcah, prašičih ter kokoših se razteza tudi na predelu vratu, in sicer vse do ščitnice (Tizard, 2004). Pri prašiču leži prsni del timusa na eni strani, na osrčniku, in na drugi strani, na prsnici. Delitev na desni in levi reženj nakazuje kavdalna zareza. Iz prsnega dela izhaja parni *isthmus cervicothoracalis* kot 1,5 cm dolga nit. Njemu se priključi parni vratni del (*pars cervicalis thymi*, dolg ~ 20 cm in 3-4 cm širok). Najprej se ventralno prilega sapniku, v sprednjem vratnem področju pa je ob strani. *V. jugularis externa* označuje njegovo dorzolateralno omejitev, *a. carotis communis* in *v. jugularis int.* pa ležita na njegovi dorzomedialni strani. Tako sega vratni del do višine grla. Timusov reženj pri prašiču sega pod lobanjsko bazo in je od vratnega dela bolj ali manj razločno razmejen s parenhimskim mostičkom. V ta del je vključen tudi že prej omenjeni *thymus superficialis*. Zato lahko pri pujsku, zrelem za rojstvo, govorimo o glavnem delu (*pars*

cranialis thymi) in spojnem delu (*isthmus craniocervicalis thymi*). Pogosto narezani, zato dvodelni, glavni del se dotika *procesusa jugularis* zatilnice, leži pa tudi na *glanduli mandibularis* in pod bezgavko (*nl. retropharyngeus medialis*) (Rigler, 1992).

Poglavitna tipa celic, ki ju najdemo v timusu, so dozorevajoči limfociti, ki jih imenujemo timociti in retikulumske celice epitelijskega izvora. Skorja vsebuje številne timocite, medtem ko je teh celic v sredici manj. Med timociti so razporejene epitelne celice (niso limfatičnega porekla), folikularne dendritične celice in makrofagi. Pretežno v sredici najdemo še skupke tesno nakopičenih, degeneriranih epitelnih celic (t. i. Hassalova telesca) (Vozelj, 1985; Jurca, 2003; Tizard, 2004). Ti skupki vsebujejo keratin in v njihovi sredini so ostanki malih krvnih žil, njihovo bistvo pa je izločanje rastnega faktorja, timusnega stromalnega limfopoetina. Kapilare, ki oskrbujejo timusov korteks, obdaja tanka bazalna membrana s kontinurano plastjo epitelnih celic. Ta pregrada preprečuje vstop antigenom, ki so v cirkulaciji. Timusa ne zapušča nobena limfna žila. Ko se žival stara, se timus manjša in na njegovem mestu se pojavi maščobno tkivo. Kljub vsemu se pri takem zmanjšanem timusu še vedno najdejo manjše količine aktivnega limfoidnega tkiva (Tizard, 2004).

Če novorojeni živali odstranimo timus, se ne razvijejo limfociti T ali pa jih je zelo malo v cirkulaciji in se ne razvije celična imunost (ni pozne preobčutljivosti, žival ne zavrača presajenih tujih celic ali organov), protitelesni imunski odziv pa ostane skoraj neokrnjen (variira lahko tvorba določenih protiteles) (Kališnik, 2003; Tizard, 2004). Tako žival lahko ohranimo pri življenju samo v sterilnem okolju, če dobiva antibiotike ali če presadimo timus, sicer kmalu pogine (Kališnik, 2003). Pri neonatalni timektomiji domačih živali je slika zelo podobna kot pri neonatalni timektomiji mišk, vendar je manj dramatična, saj timus pri domačih živalih prej dozori in so kritične faze rasti zaključene že pred samim rojstvom (Tizard, 2004). Odstranitev timusa pri odraslih sesalcih nima takojšnjega učinka, s časom pa se pri takih osebkih zmanjša količina limfocitov T v periferni krvi in s tem povezana celična imunost (Tizard, 2004).

Timociti so različnih razvojnih stopenj (različno zrele celice), katerih predhodnice (progenitorne celice T) so prispele iz kostnega mozga v skorjo po krvnih žilah. Njihovo migracijo usmerjajo kemokini, ki jih izločajo timusne epitelne celice. Posamezne skupke

timocitov, ki počasi potujejo iz skorje proti sredici timusa, zajamejo v gube svoje plazemske membrane mrežni preplet stromalnih celic, ki ga sestavljajo različne vrste celic, vsaka od njih pa opravlja svojo nalogo. Tako pridejo v stik z molekulami poglavitnega histokompatibilnega kompleksa (MHC), s telesu lastnimi antigeni in s timusnimi hormoni, ki močno pospešujejo razvoj in zorenje timocitov. Ti stiki so bistveni v procesu zorenja timocitov. Timociti, ki se aktivirajo po prepoznavi lastnih antigenov v sklopu MHC molekul, apoptotično odmrejo. Spodbude pri nadaljnjem razvoju so deležni timociti, ki se ob srečanju z MHC molekulami zmerno aktivirajo, kar je varovalo pred apoptozo. V procesu zorenja timocitov gre torej za negativno in pozitivno selekcijo, ki na koncu privede do tega, da v periferni krvi ni nefunkcionalnih ali avtoreaktivnih limfocitov T (Jurca, 2003; Tizard, 2004; Tizard, 2009).

Večji del timocitov v timusu preživi le kratko obdobje (le dva do štiri dni) in nato odmre apoptotično. Manjši del timocitov (pribl. 5 %) pa zapusti timus kot zreli limfociti T, ki nato po krvi potujejo v sekundarna limfatična tkiva (bezgavke, vranico), kjer se lahko srečajo s telesu tujimi antigeni, ki jih po prepoznavi spodbudijo k razmnoževanju in končni diferenciaciji v efektorske celice. Manjši del takih celic se razvije v spominske limfocite T, ki se nato nahajajo v različnih tkivih telesa in nekatere med njimi preživijo tudi do deset ali več let. V fizioloških razmerah telesu tuj antigen ne vstopa v timus in normalno se v njem imunski odziv ne razvije (Vozelj, 1985; Tizard, 2009).

2.2.2 Peyerjeve plošče

Limfatično tkivo sluznic oziroma t. i. imunski sistem sluznic sestavljajo skupki limfatičnega tkiva, ki je brez zunanjih ovojnic. To je razporejeno v submukozi dihal, prebavil in sečil. Gre torej za organizirano limfatično tkivo v zgornjih dihalnih poteh, tonzile ali mandeljne v žrelu, Peyerjeve plošče in skupke limfocitov v *lamini propria* tankega črevesja. Omenjena tkiva so sicer zgrajena podobno kot bezgavke, kar pomeni, da tudi v njih najdemo limfne folikle in germinativne centre z limfociti B in področja, kjer prevladujejo limfociti T (Jurca, 2003). Včasih so menili, da so Peyerjeve plošče ekvivalent Fabricijevi burzi in da pri sesalcih v njih zorijo limfociti B. Danes še vedno ni popolnoma pojasnjeno, ali so pri nekaterih sesalskih vrstah (ovca, pes, prašič) Peyerjeve plošče dejansko primarni limfatični organ, v katerih zorijo limfociti B (Tizard, 2009; Sinkora in sod., 2011). Ob foliklih Peyerjevih plošč vsebuje

sluznica številne limfocite B in limfocite T, infiltrirane med epitelijskimi celicami (Vozelj, 1985).

Več živalskih vrst ima, poleg majhnega dela Peyerjevih plošč v *ileumu*, tudi obsežni del Peyerjevih plošč v *jejunumu*. Tako razporeditev lahko najdemo tudi pri prašiču, ki je omnivor. Pri njem lahko govorimo tudi o tipični »prežvekovalski« morfologiji ilealnih Peyerjevih plošč, vendar le kratek čas po rojstvu. Domneva se, da ima ilealni del Peyerjevih plošč določeno vlogo pri razvoju limfocitov B, ki pa še ni povsem pojasnjena. Postnatalna resekcija ilealnega dela Peyerjevih plošč ni imela nikakršnega vpliva na število limfocitov B in ne kasneje na njihovo prisotnost v cirkulaciji v življenju prašičev (Rothkötter, 2009).

Tako ilealni kot jejunalni del Peyerjevih plošč je zmožen prevzeti telesu tuje antigene iz lumna črevesja (Rothkötter, 2009). Na meji, kjer se Peyerjeve plošče dotikajo črevesne sluznice, se je oblikovalo posebno epitelno tkivo, ki prekriva imunske celice kot nekakšna kapsula in vsebuje celice M (angl. Microfold cells). Te prenašajo antigene iz lumna črevesja do spodaj nahajajočih se limfocitov in tako posredno pomagajo pri sprožitvi imunskega odziva. V nasprotno smer se, iz submukoze v lumen črevesja lahko aktivno transportirajo imunoglobulini razreda A, ki se sintetizirajo lokalno kot odziv na antigensko spodbudo iz lumna črevesja. Sekretorni IgA na črevesni sluznici so torej prva obrambna linija proti okužbi s patogenimi mikrobi. Plazmatke v limfatičnem tkivu črevesja lahko izločajo tudi protitelesa razreda E, kar lahko povezujemo z imunskim odzivom na infestacijo s helminti (Jurca, 2003).

Transport proteinskih antigenov iz lumna proti submukozi so dokazali v večini študij, vezanih na M celice, medtem ko so bile bakterijske celice ali celice kvasovk transportirane samo z nekaterimi M celicami. Pravilo, po katerem se vrši prenos antigena proti Peyerjevim ploščam pri prašičih, še ni povsem znano. Vendar so študije na miškah pokazale, da M celice pri prenosu v Peyerjeve plošče igrajo pomembno vlogo predvsem pri prenosu nekaterih patogenih bakterij, medtem ko se drugi patogeni transportirajo tudi preko dendritičnih celic v sluznici (Rothkötter, 2009).

Postnatalni razvoj ilealnega in jejunalnega dela Peyerjevih plošč so proučevali pred odstavitvijo pujskov in po njej (pri 1, 1,5, 2 meseca starih pujskih). Folikli jejunalnega dela

Peyerjevih plošč rastejo s starostjo, so dvakrat daljši in širši pri SPF (angl. specific pathogen free) ter običajnih prašičih kot pri GF (angl. germ free) prašičih. To nakazuje na vpliv antigenov iz lumna črevesja pri njihovem razvoju. Pri GF prašičih velikost foliklov ilealnega dela Peyerjevih plošč zraste med prvim in drugim mesecem, medtem ko so pri SPF in običajnih prašičih ti primerljivi v vseh treh starostnih skupinah. Razlike so se pojavile tudi na interfolikularnem področju, saj je bilo pri 1 in 1,5 mesecih starih pujskih večje v jejunalnem delu Peyerjevih plošč kot pa v ilealnem delu. Imunohistološke študije so pokazale, da je bila pri GF prašičih večja izraženost površinskih IgM in neznatna izraženost IgA na limfocitih B. Pri SPF in običajnih prašičih pa so limfociti B izražali različen nivo površinskih ali citoplazemskih IgM ali IgA. Limfociti T so se pojavljali pri vseh skupinah bolj v jejunalnem kot v ilealnem delu Peyerjevih plošč. Tu je bilo malo limfocitov T predvsem zaradi manjšega interfolikularnega področja. Majhno število dvojno negativnih limfocitov T je bilo razporejeno v interfolikularnem področju pri vseh živalih. Mikrobni antigeni imajo velik vpliv na jejunalni in ilealni del Peyerjevih plošč pri prašiču. Morfološke razlike teh dveh delov dokazujejo, da se postnatalno različno razvijajo, čeprav pa še ni povsem jasno, ali ima ta morfološka razlika za posledico tudi različno funkcijo teh delov Peyerjevih plošč (Barman et al., 1997). Starost in mikrobni vpliv iz črevesnega lumna povečata velikost Peyerjevih plošč, vendar njihovo število in pozicija ostaneta nespremenjena. Prav tako omenjajo, da pri prašičih ni nadaljnjega razvoja novih oziroma regresije starih Peyerjevih plošč v jejunalnem delu (Rothkötter and Pabst, 1989).

2.2.3 Mezenterialne bezgavke

Bezgavke povezujejo limfne žile v zaokroženo celoto. Skoraj vsa limfa, ki nastane v črevesju, se drenira v mezenterialne bezgavke (Vozelj, 1985; Rigler, 1992). Zato so mezenterialne bezgavke pomemben pokazatelj okužbe pri pregledu in presoji živalskega mesa (Rigler, 1992).

Bezgavke so sekundarni limfatični organi, režnjaste zgradbe, sestavljeni iz limforetikularnega tkiva in obdani z vezivnotkivno ovojnico. Smiselno so razporejene vzdolž limfnih žil na strateških mestih. Njihova naloga je dreniranje limfe, zadrževanje in odstranjevanje mikrobov ter drugih škodljivih snovi. So torej okolje, kjer se z antigeni srečujejo imunske celice, ki se nato aktivirajo, se pomnožujejo in diferencirajo ob medsebojni komunikaciji (Jurca, 2003).

Pri prašiču so bezgavke morfološko nekoliko drugačne kot pri drugih živalskih vrstah, saj imajo zasukano skorjo in sredico. Sredica je obrnjena periferno, skorja pa centralno. Tudi glede oblike, velikosti in števila bezgavke se prašič razlikuje od drugih živalskih vrst. Pri mladih prašičih sestavljajo večino skupin bezgavk večje število majhnih bezgavk, pri starejših živalih pa na značilnih anatomskih mestih najdemo zmanjšano število posameznih bezgavk (Rigler, 1992).

V skorji bezgavke najdemo številne primarne limfne folikle (vozličke), ki vsebujejo zrele, mirujoče limfocite B. Folikli se, z limfociti B po antigenski spodbudi preoblikujejo v sekundarne folikle, ki vsebujejo germinativni center. Tu se pospešeno razmnožujejo in preoblikujejo limfociti B. Tako najdemo v tem delu plazmatke, posamezne limfocite T, makrofage in dendritične celice. V funkcionalnem smislu lahko ta del bezgavke poimenujemo od timusa neodvisno območje, saj med celicami prevladujejo limfociti B. Od timusa odvisno območje pa je mejni del skorje, to je v smeri proti sredici (parakortikalno območje), kjer se nahaja večina limfocitov T. Posebnost tega predela so tako imenovane interdigitalne dendritične celice, ki izražajo velike količine molekul MHC, saj predstavljajo antigene limfocitom T pomagalkam (CD4) in tako začenjajo imunski odziv na antigene, ki so prispeli v bezgavko. V sredici ali meduli bezgavke, kjer se prepleta limforetikularno tkivo z večjimi krvnimi žilami in mezgovnicami, se nahajajo tudi druge vrste in razvojne stopnje imunskih celic (Jurca, 2003).

2.2.4. Vranica

Vranica prašiča je svetlo rdečkast organ, ima dolgo jezičasto obliko, ki se v spodnjem delu zoži. Na prečnem prerezu je trikotne oblike (Rigler, 2000). Obdana je z vezivnotkivno ovojnico, iz katere potekajo pretini in oblikujejo osnovno ogrodje organa. Funkcionalno tkivo vranice je bela in rdeča pulpa. Bela pulpa vsebuje ogromno limfocitov, rdeča pa poleg teh še veliko eritrocitov, makrofagov in drugih celic. Dejansko limfatično tkivo predstavljajo omejena območja bele pulpe, razporejena po tkivu vranice okrog manjših arterij in arteriol. Na teh mestih, tako kot v bezgavkah, najdemo veliko limfocitov B in T. V primerjavi z bezgavkami, ki nadzirajo bolj ali manj omejena anatomska območja telesa, saj drenirajo limfo, ki priteče iz teh predelov, vranica s pomočjo imunskih celic kontrolira kri in se odziva na širše, sistemske vdore telesu tujih antigenov. Bela pulpa zajame in zadrži antigene, nudi

mesto makrofagom, limfocitom in plazmatkam. Tu imunske celice med seboj komunicirajo in ob sistemskem vdoru antigena omogočajo nastanek imunskega odziva, prav tako pa se tu z določenimi fiziološkimi mehanizmi organizem znebi starih in poškodovanih eritrocitov (Jurca, 2003).

Limfociti B se v germinativnih centrih srečajo z antigeni, jih prepoznavajo, se nato razmnožujejo in končno preobrazijo v plazmatke. V mejnih predelih, tik ob območjih, odvisnih od timusa, t. i. periarteriolarni limfoidni ovoji, je teh centrov največ. Vsebujejo dve tretjini limfocitov T pomagalk ($CD4^+$ celice) in eno tretjino citotoksičnih limfocitov T ($CD8^+$ celice). V vranico potujejo limfociti po krvnih žilah, saj ta ni povezana v sistem limfnih žil. Limfociti T se v vranici zadržijo krajši čas, približno 5 do 6 ur, medtem ko se limfociti B zadržujejo dlje, tako da lahko specifično prepoznajo predstavljene antigene in preidejo v nadaljnje razvojne faze do efektorskih celic. Aktivirani limfociti, protitelesa in druge efektorske molekule prečkajo mejni obroč na poti iz bele pulpe in skozi sinuse rdeče pulpe pripotujejo v vene ter zapustijo vranico (Jurca, 2003).

2.3 IMUNOHISTOKEMIČNO IN MORFOMETRIČNO VREDNOTENJE UČINKOV DON NA ORGANE PRAŠIČEV

V veterinarski medicini se morfološka diagnostika klasično opira predvsem na rutinska barvanja, na primer: s hematoksilin in eozinom, redkeje na histokemična barvanja. Vendar pa specializiranost veterinarske prakse zahteva natančne diagnoze (na primer pri tumorjih). Imunohistokemični testi so kombinacija imunoloških in kemičnih reakcij, ki jih vizualiziramo z mikroskopom (Ramos-Vara in sod., 2008). Imunohistokemija (IHC) je lahko zelo uporabna pri določanju limfocitnih populacij in subpopulacij v tkivih, po domnevni izpostavljenosti tkiv imunosupresivnemu dejavniku. Ta metoda je bolj občutljiva in specifična v primerjavi s klasično histologijo ter je zelo uporabna v kombinaciji s pretočno citometrijo (na primer proučevanje limfocitnih sub-populacij) (Gillett in Chan, 2000).

Pri proučevanju imunosupresivnih učinkov krme, naravno kontaminirane z mikotoksinom DON, na mlade plemenske svinje v obporodnem obdobju so že uporabili pretočno citometrijo (Jakovac-Strajn, 2008). Protitelesa, ki se uporabljajo pri pretočni citometriji, niso prilagojena

za IHC, saj so lahko antigenski epitopi na celicah tkiv maskirani ali denaturirani zaradi kemične fiksacije (Gillett in Chan, 2000). Čeprav sta pretočna citometrija in IHC zelo občutljivi, biološka oziroma klinična pomembnost sprememb (razlike v številu, porazdelitev v tkivu) v populaciji limfocitov ni vedno jasna. Kljub vsemu povečamo z uporabo IHC občutljivost določanja razlik v tkivih po izpostavljenosti imunosupresivnih snovi. IHC lahko uporabljamo za določanje učinkov imunosupresivnih snovi pri odraslih živalih ali pri tkivih zarodkov. Za rutinske toksikološke študije, pri čemer morfološko določamo učinek imunosupresivnih snovi s pomočjo IHC, lahko uporabljamo limfatične organe, timus, vranico, bezgavke (lahko periferne ali centrale, aksilarne oziroma mezenterialne), Peyerjeve plošče (predvsem distalni ileum) in tonzile (Gillett in Chan, 2000).

2.3.1 Imunohistokemično označevanje celic v apoptozi

Apoptoza (gr. *apoptosis* – odpadek, razpad) je progamirana celična smrt, kjer gre za naravni pojav v življenjskem ciklu neke celice (npr. limfocitov) in jo moramo ločiti od nekroze, ki nastopi zaradi zunanjih vzrokov (zastrupitev ali pomanjkanje kisika). Celica, ki vstopi v proces celične smrti, sledi vnaprej začrtanemu genetskemu programu. Najprej razpade jedrna DNK, jedro se degenerira in zgosti. Sledi fagocitoza ostankov propadle celice (Jurca, 2003). Ta programirana oblika celične smrti je vpletena tudi v morfogenezo in homeostaze organov in tkiv. V primarnih limfatičnih organih se v procesu zorenja limfocitov odstranijo avto-reaktivni limfociti, in sicer z apoptozo v procesu klonske selekcije, vendar je apoptoza pomemben regulativni mehanizem limfocitov B in T tudi pri zorenju in diferenciaciji v perifernih limfatičnih organih po stiku z antigenom (Resenders in sod., 2004). Apoptoza lahko sodeluje v immunopatogenezi nekaterih virusnih bolezni, saj lahko značilno prispeva h klinični sliki, ko vpliva na zmanjšanje števila imunskih celic, in s tem k imunski odzivnosti gostitelja (Resenders in sod., 2004).

Apoptoza vključuje začetno stopnjo s kaskado zunanjih in notranjih dražljajev, z aktivacijo kaspaze in stopnjo celične smrti, z jedernim in celičnim kolapsom. Kaspaza-3 igra centralno vlogo, ki ob aktivaciji nepovratno povzroči začetek celične smrti z degradacijo proteinov in aktivacijo endonukleaz. Zato je kaspaza-3 znana kot znak apoptoze. Kljub temu je znano, da vsakokratna aktivacija kaspaze-3 ni privedla do apoptoze predvsem pri zgodnjih aktivacijah T limfocitov (Resenders in sod., 2004). Veliko ključnih proteinov, ki sodelujejo pri apoptozi, je

že znanih, vendar je njihovo molekularno delovanje potrebno natančno pojasniti (Elmor 2007).

Določanje apoptoze v tkivnih rezina je pogost pristop. Lahko uporabimo metodo za določanje kaspaze-3 (CCasp3) ali metodo TUNEL. Pomanjkljivost metode TUNEL je predvsem v tem, da lahko zazna, poleg sprememb DNK, značilnih za apoptozo, še druge poškodbe DNK, ki se pojavijo npr. pri mitozi ali nekrozi (Resenders in sod., 2004). Kljub nekaterim pomanjkljivostim pa je metoda TUNEL uporabna za določanje apoptoze (Duan in sod., 2003; Resenders in sod., 2004) tudi v prašičjih tkivih, vklopljenih v parafinske bloke (Sato in sod., 2000; Nakajima in sod., 2000). Sato in sod. (2000) so z metodo TUNEL določali apoptozo v limfatičnih organih prašičev (timus, vranica in bezgavke), medtem so Nakajima in sod. (2000) apoptozo z metodo TUNEL določali v prašičjih jetrih in ledvicah. Z njo se lahko določi apoptozo tudi v limfocitih in makrofagih (Resenders in sod., 2004).

DON lahko spodbudi v celici tvorbo prostih radikalov in s tem peroksidacijo lipidov ter poškodbo DNK (Awad in sod., 2014). Povzroči pa lahko tudi neposredne DNK-poškodbe (Bensassi in sod., 2009, Awad in sod., 2014), saj z vezavo na 60S podenoto evkariontskih ribosomov inhibira sintezo proteinov, DNK in RNK (Awad in sod., 2014). Zaustavi celično proliferacijo in povzroči fragmentacijo DNK, ki ji sledi aktivacija proteina p53 in kaspaze-3. Zaradi tega ga lahko obravnava kot genotoksični faktor, ki z aktivacijo apoptoze povzroči celično smrt (Bensassi in sod., 2009). Mikami in sod. (2010) so pri enomesečnih prašičih, in sicer po i/v injiciranju DON (1mg/kg telesne teže), ugotavljali tudi histološke spremembe v jetrih,vranici, tonzilah, mezenterialnih bezgavkah, timusu in Peyerjevih ploščah ileuma. Za določanje apoptoze so uporabili metodo TUNEL. Štetje TUNEL pozitivnih celic je potekalo na 5 naključno izbranih poljih na rezino, na monitorju, pri visoki povečavi. Ugotovili so sistemsko apoptozo tako limfocitov v limfatičnih organih kot hepatocitov. Povečano število TUNEL pozitivnih celic so ugotovili v vranici, tonzilah, bezgavkah, timusu in Peyerjevih ploščah ileuma (Mikami in sod., 2010). Marin in sod. (2006) so ugotovili, da DON povzroča intenzivnejšo apoptozo limfocitov v prašičji krvi. DON je povečal apoptozo limfocitov tudi v bezgavkah in vranici (Gerez in sod., 2015). To pa ima lahko za posledico povečano občutljivost na okužbe živali, intoksicirane z DON (Marin in sod., 2006).

2.3.2 Imunohistokemično označevanje celične proliferacije, limfocitov T in makrofagov

Imunohistokemične metode so postale uporabne tudi pri ocenjevanju celične proliferacije v histološkem materialu (McCormick in sod., 1993). Protein Ki-67 se je izkazal za strogo poveznega z vsemi fazami celičnega cikla, to je z G1, S, G2 in mitozo, vendar je v fazi G0 odsoten. Poleg tega se ga med popravljanjem DNK ne zazna (Key in sod.; 1994). Gernier in sod. (2011) so pri 5 tednov starih pujskih dokazovali učinke DON in fumonizina na proliferacijo hepatocitov v jetrih. Celično proliferacijo so določili s štetjem Ki-67 pozitivnih jeder na 100 preštetih jeder (tkivne rezine, svetlobni mikroskop, 40x povečava). Dokazali so med drugim tudi, da krma, kontaminirana z DON in drugimi uporabljenimi mikotoksini, spremeni specifični imunski odziv na cepljenje, kar je bilo dokazano z nižjo proliferacijo limfocitov iz periferne krvi po antigenski stimulaciji (in vitro, na ploščah) in manjšo količino anti-ovalbuminov IgG v plasmi. Učinek DON na proliferacijo limfocitov v periferni krvi so ugotovili tudi Marin in sod. (2006). Različne koncentracije DON so dodajali izoliranim limfocitom iz periferne krvi zdravih odstavljenih pujskov. Rezultati so pokazali, da nizke koncentracije DON (1-10^2ng/ml) stimulirajo, visoke (10^4-10^5ng/ml) pa intenzivno zavrejo proliferacijo limfocitov. Nasprotne si rezultate pa so v svoji študiji dobili Wippermann in sod. (2009). Ugotovili so, da DON, ki je bil krmljen svinjam med brejostjo, na imunohistokemične parametre celic tkiv imunskega sistema, jeter in črevesnega trakta pri 70 dni starih fetusih pujskov ni imel učinka. Svinje so dobivale med 35 in 70 dnevom gestacije, krmo s koncentracijo DON 4,42 mg/kg in ZEA 0,0048 mg/kg krme. V vzorcih jeter, vranice, bezgavk, timusa, črevesja in kostnega mozga so ugotavljali CD3 in CD79a (za dokazovanje limfocitov B in razločevanje z limfociti T), p-p-53, p-p-38 MAPK, kaspazo-3 (za določanje apoptoze), TNF-alfa (citokin za regulacijo imunskih celic, za indukcijo apoptoze in/ali vnetja), proliferacijo celic (z določanjem Ki-67) in makrofage (z MAC 387 – mieloid/histocit antigenom) (Wippermann in sod., 2009). Protitelesa, ki bi izključno odkrivala prašičje celice tipa makrofag, so redka, verjetno zaradi visoke heterogenosti te celične populacije (Chianini in sod., 2001). V ta namen se lahko uporablja protitelo MAC387 (Monoclonal mouse anti-human myeloid/histocyte antigen, clone MAC 387) (Chianini in sod., 2001), ki se veže na mieloid/histocit antigen izražen, v makrofagih (Brandtzaeg in sod., 1992). Antigen CD3 izražajo limfociti T tako v timusu, kostnemu mozgu, perifernih limfatičnih tkivih kot v krvi (Campana in sod., 1987; Tunnacliffe in sod., 1989). Zelo učinkovito protitelo za določanje

limfocitov T je kunčje poliklonsko protitelo proti človeškemu CD3 (Polyclonal rabbit anti-human CD3) (Mason in sod., 1989).

2.3.3 Morfometrične in histopatološke preiskave

Prednosti merjenja v histopatologiji in citopatologiji so priznane že vrsto let. Potreba po merjenju izhaja iz spoznanja, da so nekatere od diagnostičnih odločitev, ki jih naredimo, slabo ponovljive. Merjenje ima več prednosti pred konvencionalno vizualno oceno: objektivnost, ponovljivost in sposobnost zaznavanja sprememb, ki niso takoj očitno vidne s prostim očesom (Hamilton in sod., 1995). Zato je z uporabo metod, ki vključujejo morfometrijo, imunohistokemijo in elektronsko mikroskopijo, mogoče doseči boljšo ponovljivost (Collan, 1984). Za izdelavo morfoloških meritev poznamo različne tehnike, kot so linearna meritev (na primer merjenje dolžine med dvema točkama), stereologija (na primer določanje v dveh dimenzijah – površino; v treh dimenzijah – volumen) in tehnike z naprednimi interaktivnimi računalniškimi sistemimi (na primer z uporabo elektromagnetnih pisal) (Hamilton in sod., 1995). Po našem vedenju so redke študije, ki bi z morfometrijo ugotavljale spremembe na limfatičnih organih prašičev po vnosu DON v organizem. Eno takih študij so izvedli Wippermann in sod. (2009), ki so med brejostjo krmili DON svinjam in so potem ugotavljali učinke DON na morfometrične parametre celic tkiv imunskega sistema, jeter in črevesnega trakta na fetusih v 70 dnevu gestacije. Ugotovili so, da ni razlik med poskusno in kontrolno skupino. Tudi novejša morfometrična raziskava prašičjega duodenuma (25 kg težke mladice) po dodatku različnih koncentracij DON in/ali ZEA p/o ni pokazala nobenih razlik v primerjavi s kontrolno skupino. Ugotovili pa so povečano število limfocitov in makrofagov v lamini propri duodenuma (Lewczuk in sod., 2016). Drugačne ugotovitve predstavljajo Chen in sod. (2008) s klasično histopatološko preiskavo, kjer sta DON in ZEA pri mladih prašičih povzročila spremembe na jetrih, vranici, bezgavkah, uterusu in ledvicah. Glede na dostopno literaturo v večini študij, ki obravnavajo DON, limfatične organe in prašiče, uporabljajo klasično histopatologijo. Že Cote in sod. (1985) so s histološko preiskavo ugotovili, da DON povzroča limfoidno degeneracijo, nekrozo in izčrpanost Peyerjevih plošč črevesja, bronhialnih in mezenterialnih bezgavk, vranice, tonzil in timusa. Te spremembe so ugotavljali pri pet tednov starih pujskih, ki so zauživali 0,7-3,1-5,8 ppm DON. Beardall in Miller (1994) navajata, da se izpostavljenost visokim odmerkom trihotecenov kaže v hitrem zmanjšanju količine limfatičnega tkiva in levkopeniji, ki se pojavita pred smrtjo zaradi sindroma,

podobnega cirkulatornemu šoku. Zielonka in sod. (2009) so poskusnim skupinam prašičev enkratno dodali DON (v kapsulah) kot dodatek h krmi in so s histopatologijo ugotovili spremembe v duodenumu, jejunumu, ileumu, jetrih in mezenterialnih bezgavkah. V teh organih je prišlo do regresivnih lezij, ki so bile sicer bolj izražene v skupini, ki je dobila višjo koncentracijo DON (0,4 mg/kg t. m.). Po dodatku DON je prišlo do histoloških sprememb v jetrih, ledvicah, srcu in vranici tudi v študiji Dumitrescu in sod. (2008). Ferrari in sod. (2009) so v študiji osem tednov starim pujskom s krmo aplicirali dlje časa DON, pa s histopatološko preiskavo limfatičnih tkiv v črevesju niso ugotovili nobenih značilnih sprememb. Tudi z imunohistokemičnimi metodami jih niso dokazali (Ferrari in sod., 2009). Ena od zadnjih raziskav dokazuje, da krmljenje krme, kontaminirane z DON, pujskom, starim pet tednov, povzroči histopatološke spremembe na jetrih, pljučih in na ledvicah (Grenier in sod., 2011). Tudi Gerez in sod. (2015) pri enako starih pujskih, ki so dobivali DON, Nivalenol (NIV), ZEA ugotavljajo histoloških sprememb v črevesju, jetrih in limfatičnih organih. Poškodbe jeter, vranice in bezgavk po konzumaciji kontaminirane krme z DON so ugotovili tudi Bracarense in sod. (2017). Rezultati njihovih morfoloških in imunohistokemičnih analiz nakazujejo, da lahko zaužitje DON povzroči oslabelost jeterne funkcije in imunosupresijo (Bracarense in sod., 2017). Pri različnih patoloških spremembah tkiv je možno z morfometrijo oceniti njihovo funkcionalno oslabelost (Reid, 1980). Sicer normalno zmanjšanje organa, povezano s starostjo, kot je to značilno za timus, je potrebno ločiti od zmanjšanja organa zaradi neprimerne prehrane, stresa ali toksičnih vplivov, kar pri timusu privede do atrofije. Prve spremembe se kažejo v povečanem številu celic v apoptozi in v številu makrofagov v korteksu timusa. Zmanjšanje korteksa in povečanje sredice timusa so znaki atrofije timusa (Pears, 2006b). Tudi Chaytor in sod. (2011) zaključujejo, da lahko pride pri živalih po zaužitju DON do poškodb organov ali zaviranja imunosti, kar pa lahko pripelje do povečane pojavnosti bolezni skupaj z zmanjšano rastjo in konzumacijo krme. Ti učinki skupaj povzročajo precejšnje ekonomske izgube pri prašičerejcih.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

Raziskovalno delo je nadaljevanje raziskave, v kateri so pri brejih mladicah spremljali učinek krme, naravno kontaminirane z DON (Jakovac-Strajn, 2008). Izvedbo poskusa je odobrila Veterinarska uprava Republike Slovenije. Dovoljenje št. 323-02-170/2002.

3.1.1 Živali

Dvajset plemenskih mladic (Landras x Large White), ki so bile breje 89 dni (±2 dni), so bile naključno deljene v dve skupini: kontrolno in poskusno. Njihova starost je bila v povprečju 315 dni, masa pa 191,7 ± 12,3 kg. Poskus je trajal 54 dni (± 1 dan) v enakih razmerah za obe skupini, razlika je bila le v vsebnosti mikotoksinov v krmi. Mladice so bile v poskusu zadnje 4 tedne pred porodi, celo obdobje laktacije (21 dni ± 1 dan) in v obdobju od zaključka laktacije (odstavitev pujskov) do ponovne osemenitve (5-8 dni) (Jakovac-Strajn, 2008).

3.1.2 Krma

Za kontrolno in poskusno skupino brejih mladic so pripravili krmno mešanico za breje in doječe svinje, ki je ustrezala vsem prehranskim zahtevam za breje svinje (NRC, 1998). Prehranska vrednost in sestava krme sta bili za obe skupini enaki. Krma je bila sestavljena iz 50 % koruze, 19 % sojinih tropin, 8 % ječmena, 7 % pesnih rezancev, 4,5 % sončničnega olja, 3 % pšeničnega krmila, 3 % dehidrirane lucerne, 3 % ribje moke, 0,5 % melase in 2 % vitaminsko mineralne mešanice. Analize so pokazale, da sta bili, upoštevajoč potrebe živali, krmni mešanici za obe skupini živali dobro usklajeni glede hranilnih snovi in mineralov ter vsebnosti metabolne energije, po higienski kakovosti pa neoporečni (Tabela 1) (Jakovac-Strajn, 2008).

Tabela 1: Kemijska in mikrobiološka analiza krmnih mešanic za kontrolno in poskusno skupino mladic.

Table 1: Chemical and microbiological analysis of complete feed for the control and experimental groups of gilts.

Določitev (enota)	**Krma za kontrolno skupino**	**Krma za poskusno skupino**
suha snov (g/kg)	889,7	889,8
vlaga (g/kg)	110,3	110,2
surove beljakovine (g/kg)	162,5	162,5
surove vlaknine (g/kg)	53,0	49,4
surove maščobe (g/kg)	74,0	72,0
pepel (g/kg)	72,1	68,2
BES (g/kg)	526,9	545,4
škrob (g/kg)	370,0	370,0
kalcij (g/kg)	15,0	12,5
fosfor (g/kg)	7,9	7,5
kalij (g/kg)	6,4	7,0
magnezij (g/kg)	2,1	2,0
mangan (mg/kg)	67,9	73,5
baker (mg/kg)	18,9	19,5
cink (mg/kg)	116,7	104,7
železo (mg/kg)	489,0	484,2
natrij (g/kg)	1,9	2,1
skupno število mezofilnih bakterij (v 1000/g)	1500,0	1400,0
kvasovke (v 1000/g)	1,0	2,0
skupno število plesni (v 1000/g)	4,0 (*Fusarium spp.*)	0,0
ocena ME (MJ/kg SS)	13,4	13,5

Legenda: BES - brezdušične ekstraktivne snovi

ME - metabolna energija, izračunana po DLG-Futterwerttabellen - Schweine (1991)

Pri pripravi krme za poskusno skupino živali so uporabili koruzo, ki je naravno vsebovala mikotoksin DON. Vrednosti preostalih mikotoksinov (DAS, T-2, aflatoksin B_1, zearalenon, ohratoksin A) so bile pod mejo detekcije. Krmni mešanici za obe skupini mladic so analizirali na vsebnost naslednjih mikotoksinov: DON, zearalenona, aflatoksina B_1, ohratoksina A, acetil DON, nivalenola, fusarenona X, DAS, HT-2 toksina, T-2 toksina in fumonizinov B_1, B_2 in B_3. Preiskave so bile opravljene na Inštitutu za higieno in patologijo prehrane živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani in v laboratorijih Romer® Labs Inc. Union ZDA in

Herzogenburgu v Avstriji. Koncentracijo fuzarne kisline v vzorcih so določili v raziskovalnem laboratoriju Univerze v Guelphu v Kanadi. Krma za poskusno skupino živali je tako vsebovala 5,08 mg/kg mikotoksina DON in 0,09 mg/kg ZEA ter 21,61 mg/kg fuzarne kisline. Tudi v krmi za kontrolno skupino živali je bil DON, in sicer v koncentraciji 0,26 mg/kg (Tabela 2). Vrednosti drugih mikotoksinov so bile pod mejo detekcije (Jakovac-Strajn, 2008).

Tabela 2: Koncentracija mikotoksinov (mg/kg) v krmnih mešanicah za kontrolno in poskusno skupino mladic.

Table 2: The concentration of mycotoxins (mg/kg) in complete feed for the control and experimental groups of gilts.

Mikotoksini	Krma za kontrolno skupino (mg/kg)	Krma za poskusno skupino (mg/kg)
DON	0,26	5,08
acetil-DON	< 0,05	< 0,05
nivalenol	< 0,05	< 0,05
fuzarenon X	< 0,05	< 0,05
DAS	< 0,03	< 0,03
HT - 2	< 0,03	< 0,03
T - 2	< 0,03	< 0,03
fumonizin B_1	< 0,10	< 0,10
fumonizin B_2	< 0,10	< 0,10
fumonizin B_3	< 0,10	< 0,10
aflatoksin B_1	< 0,005	< 0,005
zearalenon	< 0,02	0,09
ohratoksin A	< 0,20	< 0,20
fuzarna kislina	< 0,77	21,61

3.1.3 Limfatični organi

Mladice so bile žrtvovane 5-8 dni po odstavitvi pujskov, prav tako je bil v prvem tednu starosti žrtvovan po en klinično zdrav pujsek iz vsakega gnezda. V številu in masi pujskov

med skupinama ni bilo razlik. Porodna masa pujskov je bila približno 1,3 kg, na koncu pa je bilo v obeh skupinah odstavljeno enako povprečno število pujskov na svinjo (8,6) (Tabela 3).

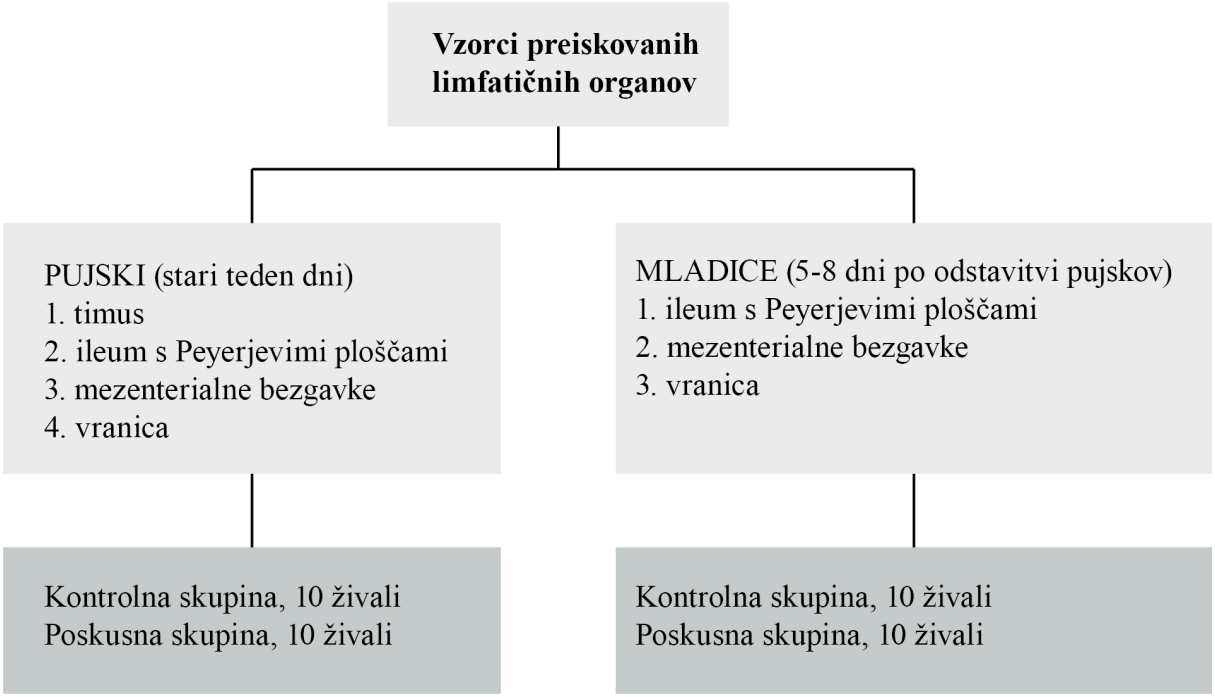
Tabela 3: Povprečne mase pujskov ± SD od poroda do odstavitve v kontrolni in poskusni skupini.

Table 3: Average weight of the piglets ± SD during the experiment in the control and experimental groups.

Masa pujskov (kg)	**Skupina**		***P***
	Kontrolna $\bar{X}$ (SD)	**Poskusna** $\bar{X}$ (SD)	
porodna	1,3 (0,1)	1,4 (0,2)	*0,200*
pri starosti 10 dni	3,3 (0,4)	3,0 (0,4)	*0,214*
pri starosti 18 dni	5,3 (0,6)	4,7 (0,7)	*0,063*

Legenda: $\bar{X}$ - povprečna vrednost v skupini
SD - standardni odklon
P - statistična značilnost (P < 0,05)

Pri vseh živalih (mladice in pujski) so bili odvzeti vzorci ileuma s Peyerjevimi ploščami, mezenterialne bezgavke in vranica, pri pujskih pa tudi timus. Vzorce limfatičnih organov smo fiksirali v 10 % puferiranem formalinu in rutinsko vklopili v parafinske bloke, pri čemer smo uporabili protokol Inštituta za patologijo, divjad, ribe in čebele (IPDRČ) Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani (Slika 2).

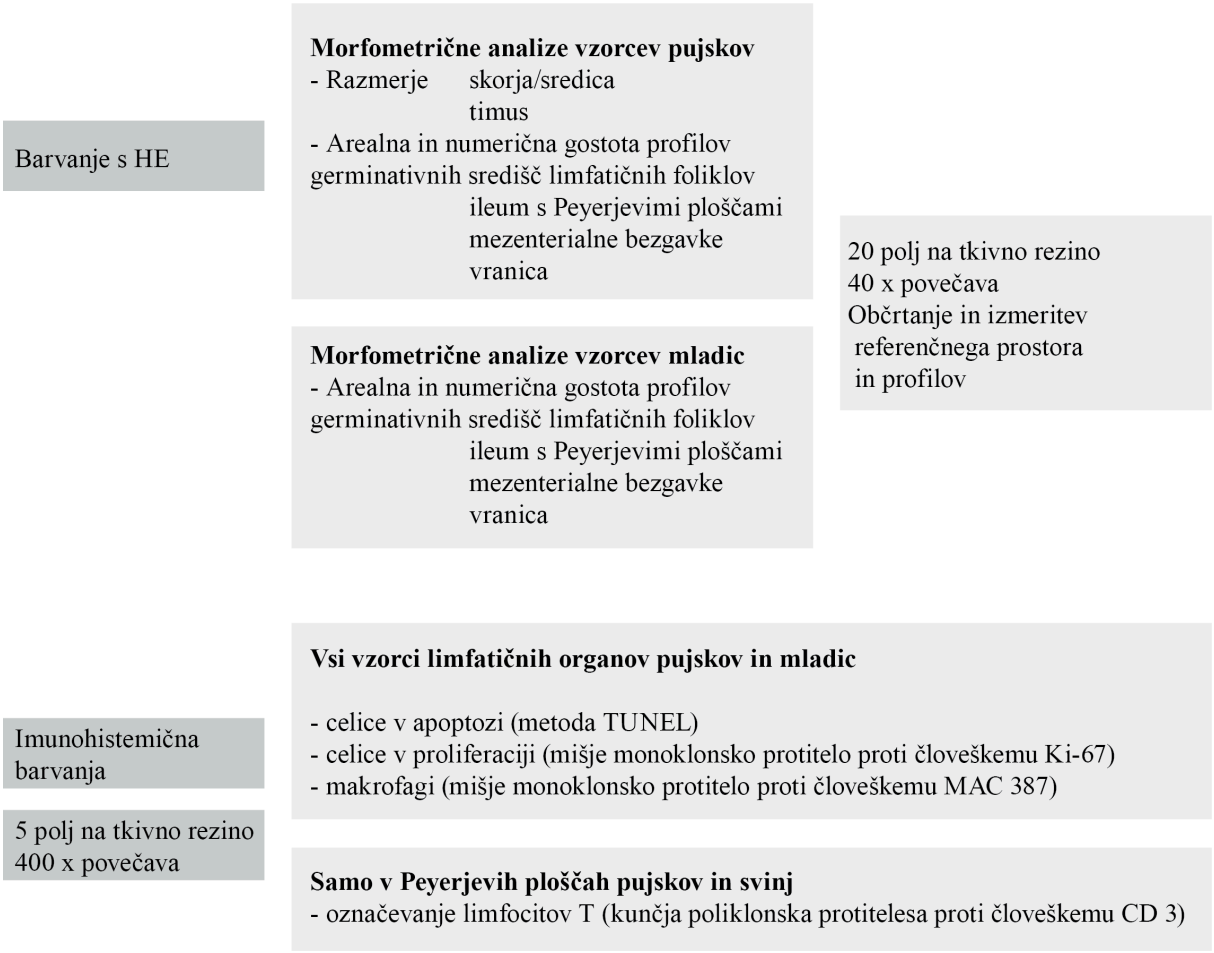


Slika 2: Shema odvzetih vzorcev limfatičnih organov.

Figure 2: Scheme of taken samples of lymphatic organs.

3.2 METODE

V nalogi smo na vzorcih limfatičnih organov uporabili različne tehnike morfometrične analize in imunohistokemičnih barvanj. Uporabljene metode so shematično prikazane na Sliki 3. Shema odvzetih vzorcev limfatičnih organov je prikazana na Sliki 2.



Slika 3: Shema morfometričnih analiz in imunohistikemičnih barvanj na vzorcih tkiv limfatičnih organov.

Figure 3: Scheme of the morphometric analyzes and immunohistochemical staining on tissue samples of the lymphatic organs.

3.2.1 Barvanje tkivnih rezin s hematoksilinom in eozinom (HE)

Za določanje razmerja med skorjo in sredico v timusu ter arealne in numerične gostote profilov germinativnih središč limfatičnih foliklov v drugih limfatičnih organih smo uporabili tkivne rezine, debeline 4 µm, obarvane s hematoksilinom in eozinom (HE). Te smo odrezali z

drsnim mikrotomom (Leica®) in nanesli na predmetna stekelca. V aparaturi Varistain (Shandon®) smo jih najprej deparafinirali v ksilolu in padajoči vrsti alkoholov. Nato smo jih obarvali s HE in končno dehidrirali v naraščajoči vrsti alkoholov ter postopek barvanja zaključili z bistrenjem v ksilolu. Pobarvane tkivne rezine smo pokrili s sintetično smolo in pokrovnim stekelcem. Barvanje smo izvedli po protokolu, ki ga uporabljajo na IPDRČ.

3.2.2 Morfometrična analiza

Določali smo arealno in numerično gostoto profilov germinativnih središč limfatičnih foliklov (v nadaljnjem besedilu bomo uporabljali: arealna in numerična gostota germinativnih središč limfatičnih foliklov) in izmerili površino ter določili razmerje med skorjo in sredico timusa.

Za analizo smo uporabili slike tkivnih rezin, obarvanih s HE in fotografiranih z digitalno kamero DS-U2 (Nikon), nameščeno na mikroskopu Microphot FXA (Nikon). Izbrane parametre smo analizirali z računalniškim programom NIS-Elements BR (Nikon).

Na tkivnih rezinah timusa, ileuma s Peyerjevimi ploščami, mezenterialnih bezgavk in vranice smo najprej opravili preliminarne meritve (Kališnik, 2002). Na vsaki tkivni rezini smo pod 40-kratno povečavo zajeli slike 10 polj. Te smo zajemali na naključnih mestih in jih nato morfometrično analizirali. Na osnovi rezultatov preliminarnih meritev smo izračunali velikost vzorca za vsakega od pregledanih organov in tako določili, da bomo uporabljali 20 polj na tkivno rezino (za arealno in numerično gostoto germinativnih središč limfatičnih foliklov ter pri razmerju površine skorje in sredice timusa). Podobne preliminarne meritve, vendar pri 400-kratni povečavi, smo naredili tudi za štetje celic v apoptozi, celične proliferacije, makrofagov in limfocitov T. Tako smo določili, da bomo šteli na 5 naključno izbranih poljih.

Na tkivni rezini ileuma s Peyerjevimi ploščami, vranice in mezenterialnih bezgavk smo pri 40-kratni povečavi naredili 20 slik na za organ značilnih mestih. Na vsaki sliki smo občrtali in s tem izmerili površino referenčnega prostora in profilov vseh germinativnih središč limfatičnih foliklov. Kot referenčni prostor smo določili vse tkivo pregledanega organa, in sicer parenhim in njegovo stromo.

Meritve arealne gostote germinativnih središč limfatičnih foliklov

Arealno gostoto germinativnih središč limfatičnih foliklov (AG) smo na posameznem polju določili tako, da smo izračunali razmerje med skupno površino profilov vseh germinativnih središč in površino referenčnega prostora (μm^2).

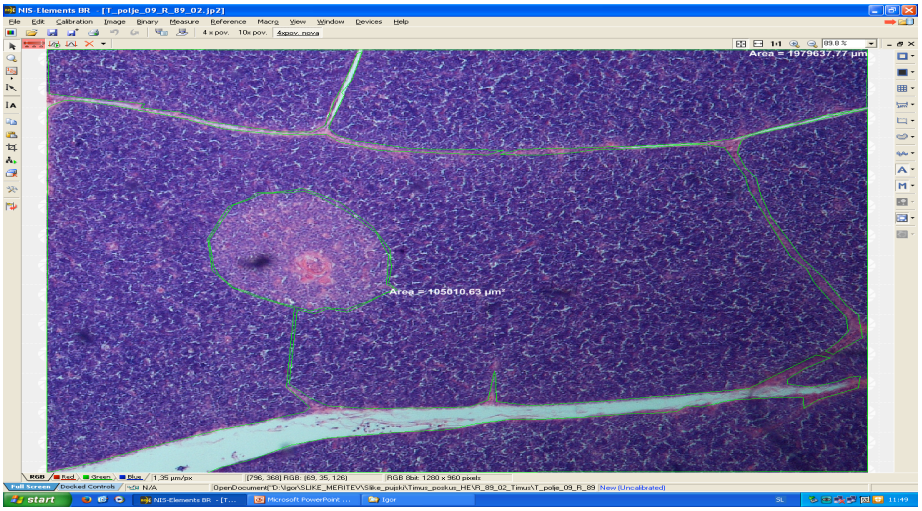
Meritve numerične gostote germinativnih središč limfatičnih foliklov

Numerično gostoto germinativnih središč limfatičnih foliklov (NG) smo izrazili kot število profilov germinativnih središč na površino referenčnega prostora.

Tako AG kot NG smo, zaradi lažje primerjave med skupinama, preračunali na skupno površino referenčnega prostora (2000000 μm^2).

Določitev relativnega razmerja med skorjo in sredico timusa

Na tkivnih rezinah timusov smo na 20 vidnih poljih 40-kratne povečave občrtali skorjo in sredico, izmerili njuno površino ter izračunali razmerje med njima. To smo v tabelah izrazili v odstotkih.



Slika 4: Slika zaslona pri merjenju površine za določitev razmerja med skorjo in sredico timusa z računalniškim programom NIS-Elements BR (Nikon), x 40.

Figure 4: Picture of the screen when measuring the surface to determine the relative ratio between the cortex and the medulla of the thymus, with the NIS-Elements BR (Nikon) computer program, x 40.

3.2.3 Ugotavljanje deleža celic v apoptozi

Delež apoptoze v limfatičnih organih smo ugotavljali na parafinskih tkivnih rezinah z metodo TUNEL in testom ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon). Delež celic v apoptozi smo določili s štetjem TUNEL-pozitivnih celic na petih naključno izbranih poljih reprezentativnih delov limfatičnih organov (Slika 2), zajetih pod 400-kratno povečavo in analiziranih s pomočjo računalniškega programa NIS-Elements BR (Nikon). Iz tega smo določili tudi povprečno število TUNEL-pozitivnih celic na eno polje reprezentativnih delov limfatičnih organov, kar smo nato uporabili pri statistični obdelavi.

Postopek označevanja celic v apoptozi

Postopek priprave tkivnih rezin za ugotavljanje apoptoze:

1. Tkivne rezine smo deparafinirali.
2. Tkivne rezine smo najprej za 5 minut prenesli v izpiralni pufer (PBS), nato za 5 minut v destilirano vodo in še enkrat za 5 minut v izpiralni pufer (PBS).
3. Sveže pripravljeno proteinazo K (Sigma) s koncentracijo 20 µg/ml v PBS (ogreto na 37 ºC) smo dodali neposredno na rezino in inkubirali 20 minut pri 37 ºC.
4. Rezine smo sprali 2x po 5 minut v destilirani vodi.
5. Za inaktivacijo endogene peroksidaze smo rezine inkubirali v 3 % vodikovem peroksidu v PBS, to je 5 minut pri sobni temperaturi. Nato smo jih spirali 2x po 5 minut v PBS.

   Tkivni rezini za pozitivno kontrolo smo dodali še DNase pufra (Promega) in inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi. Nato smo pufer odlili in dodali DNase (Promega) ter rezine inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. Nato smo jih spirali 3x po 5 minut v destilirani vodi. Postopek za pozitivno kontrolo smo od tu naprej nadaljevali v ločenih posodah.

6. Presežek tekočine smo previdno odlili in osušili okolico rezin ter nanjo dodali ekvilibracijski pufer (Chemicon) in inkubirali najmanj 10 sekund pri sobni temperaturi.

7. Previdno smo odlili odvečno tekočino in osušili okolico rezine. Nanjo smo dodali »Working strength TdT enzyme« (Chemicon), pripravljen iz 70 % Reaction buffer RB in 30 %: TdT encim - TdTE). Negativno kontrolo smo inkubirali brez dodatka TdT encima, le v ekvilibracijskim pufru. Rezine smo pod krovniki inkubirali 1 uro v vlažni komori na 37 ºC.

8. Krovnike smo odstranili in rezine inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi v »Working strength stop/wash« pufru (Chemicon).

9. Rezine smo sprali 3x po 1 minuto v PBS.

10. Previdno smo odlili odvečno tekočino in osušili okolico rezine. Neposredno nanjo smo dodali »Anti-digoxignenin conjugate« (Chemicon), ogret na sobno temperaturo. Rezine smo pod krovniki inkubirali 30 minut v vlažni komori, to je pri sobni temperaturi.

11. Krovnike smo nato odstranili in rezine spirali 4x po 2 minuti v PBS.

12. Odvečno tekočino smo odlili in osušili okolico rezine. Te smo nato inkubirali v delovni raztopini barvnega substrata s 3-diaminobenzidinom (DAB), to je 10 minut. Raztopino barvnega substrata smo pripravili pred uporabo tako, da smo v pufer (Substrate Buffer – steklenička B) iz kita DAKO REAL™ EnVision™ Detection System Peroxidase/DAB +, Rabbit/Mouse (DAKO, kat. št. K5007) dodali kromogen iz istega kita (DAB + Chromogen – steklenička C) v razmerju 1 ml pufra in 20 µl kromogena.

13. Rezine smo nato spirali z destilirano vodo in jih kontrastirali s hematoksilinom.

14. Rezine smo ponovno sprali z destilirano vodo.

15. Postopek smo zaključili z dehidracijo rezin v naraščajoči vrsti alkoholov, bistrenjem v ksilolu in pokrivanjem s sintetično smolo.

3.2.4 Imunohistokemično označevanje celične proliferacije, makrofagov in limfocitov T

Imunohistokemično označevanje celične proliferacije, makrofagov in limfocitov T smo izvedli ročno na 4 µm debelih parafinskih tkivnih rezinah limfatičnih organov (Slika 2).

Postopek imunohistokemičnega označevanja:

1. Tkivne rezine smo deparafinirali.
2. Nato je sledilo razkrivanje antigenov v mikrovalovni pečici, v EDTA pufru (pH 9,0). Na osnovi predhodne optimizacije postopka razkrivanja antigena smo uporabili naslednje čase razkrivanja antigena:

    a) 10 minut pri postopku označevanja celic v proliferaciji,

    b) 15 minut pri postopku označevanja makrofagov,

    c) 20 minut pri postopku označevanja T-limfocitov.
3. Rezine smo hladili v EDTA-pufru, in sicer do sobne temperature.
4. Rezine smo za 5 minut prenesli v izpiralni pufer (TBST).
5. Nato smo rezine inkubirali s primarnimi protitelesi, razredčenimi v govejem serumskem albuminu (angl. bovine serum albumin, BSA). Na osnovi predhodne optimizacije postopka smo:

    a) za označevanje celic v proliferaciji smo uporabili mišja monoklonska protitela proti človeškemu Ki-67 (DAKO), klon MIB-1 (DAKO, kat. št. M7240), v razredčitvi 1:75, inkubacija eno uro, na sobni temperaturi, v vlažni komori.

    b) za označevanje makrofagov smo uporabili mišje monoklonsko protitelo proti človeškemu MAC 387 (DAKO, kat. št. M0747), v

razredčitvi 1:100, inkubacija eno uro, na sobni temperaturi, v vlažni komori.

c) za označevanje limfocitov T smo uporabili kunčja poliklonska protitelesa proti človeškemu CD 3 (DAKO, kat. št. A0452), razredčina 1:150, inkubacija eno uro, na sobni temperaturi, v vlažni komori.

6. Rezine smo 5 minut spirali v izpiralnem pufru (TBST).

7. Endogeno peroksidazo smo inhibirali 30 minut v Peroxidase-Blocking Solution, Dako REAL™ (DAKO, kataloška oznaka S2023).

8. Rezine smo 5 minut spirali v izpiralnem pufru (TBST).
9. Nato smo rezine 30 minut inkubirali v raztopini sekundarnih protiteles, konjugiranih s polimerom, označenim s hrenovo peroksidazo, iz vizualizacijskega kita DAKO REAL™ EnVision™ Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (DAKO, kat. št. K5007) (steklenička A), v vlažni komori, na sobni temperaturi.

10. Rezine smo 5 minut spirali v izpiralnem pufru (TBST).

11. Rezine smo inkubirali v delovni raztopini barvnega substrata s 3-diaminobenzidinom (DAB). Raztopino barvnega substrata smo pripravili pred uporabo tako, da smo v pufer iz kita (Substrate Buffer – steklenička B) dodali kromogen iz kita (DAB + Chromogen – steklenička C) v razmerju 1 ml pufra in 20 µl kromogena. Tkivne rezine smo inkubirali pri sobni temperaturi, 5 minut (pri postopku označevanja celic v proliferaciji in limfocitov T) ali 7 minut (pri postopku označevanja makrofagov).

12. Rezine smo spirali z destilirano vodo in jih nato še kontrastirali s HE.

13. Rezine smo ponovno spirali z destilirano vodo.

14. Postopek označevanja smo zaključili z dehidracijo v naraščajoči vrsti alkoholov, z bistrenjem v ksilolu in s pokrivanjem s sintetično smolo.

Pozitivna reakcija je pri imunohistokemičnemu postopku, kjer uporabimo DAB kot barvni substrat, vidna kot rjav reakcijski produkt. Jedra drugih celic se po kontrastiranju s HE obarvajo nežno modro.

3.2.5 Analiza imunohistokemično označenih tkivnih rezin

Meritve na imunohistokemično označenih tkivnih rezinah smo naredili s pomočjo digitalne kamere DS-U2 (Nikon), mikroskopa Microphot FXA (Nikon) in računalniškega programa NIS-Elements BR (Nikon).

Določitev proliferacijskega indeksa

Proliferacijski indeks smo izrazili kot število Ki-67 pozitivnih jeder na 1000 preštetih celičnih jeder.

Določitev števila makrofagov in limfocitov T

Število makrofagov in limfocitov T smo določili s štetjem imunohistokemično pozitivnih celic za specifične markerje. Limfocite T smo lahko prešteli le v Peyerjevih ploščah ileuma pujskov in svinj, saj pri drugih reprezentativnih delih limfatičnih organih limfocitov T zaradi prevelike gostote ni bilo mogoče prešteti.

V raziskavi uporabljeni vzorci limfatičnih organov in metode so predstavljeni v Tabeli 4.

Tabela 4: V raziskavi uporabljeni vzorci limfatičnih organov in metode.

Table 4: Samples of the lymphatic organs and methods used in the study.

Organ	Test	Pujski			Mladice		
Timus	Apoptoza	sk	sr		/		
	Makrofagi	sk	sr		/		
	Proliferacija	sk	sr		/		
	Razmerje	sk	sr		/		
Bezgavke	Apoptoza	gs	sr	if	gs	sr	if
	Makrofagi	gs	sr	if	gs	sr	if
	Proliferacija	gs	sr	if	gs	sr	if
	AG	gs			gs		
	NG	gs			gs		
Peyerjeve plošče	Apoptoza	gs	ngs		gs	ngs	
	Makrofagi	gs	ngs		gs	ngs	
	Proliferacija	gs	ngs		gs	ngs	
	Limfociti T	gs			gs		
	AG	gs			gs		
	NG	gs			gs		
Vranica	Apoptoza	gs	rp		gs	rp	
	Makrofagi	gs	rp		gs	rp	
	Proliferacija	gs	rp		gs	rp	
	AG	gs			gs		
	NG	gs			gs		

AG – arealna gostota; NG – numerična gostota; gs – germinativno središče; ngs – nad germinativnim središčem; sk – skorja; sr – sredica; if – interfolikularno; rp – rdeča pulpa;

3.2.6 Statistične metode

Rezultate smo statistično obdelali z računalniškim programom SPSS (Statistical Package for Social Sciencies, Version 12, November 2003). Razlike med kontrolno in poskusno skupino smo ugotavljali s parnim t-testom. Zaradi ugotovitve, da se parametri ponekod ne porazdeljujejo normalno, in zaradi majhnega števila živali, od katerih smo vzeli vzorce (N 2x10), smo celotno analizo ponovili še z uporabo neparametričnega testa (Mann-Whitney U). Pri analizi rezultatov smo primerjali tako rezultate parametričnih kot neprametričnih testov. Pri predstavitvi rezultatov smo se opirali na vrednosti neparametričnega testa. Primerjali smo rezultate meritev med kontrolno in poskusno skupino tako arealne in numerične gostote germinativnih središč limfnih foliklov, apoptoze, celične proliferacije, števila makrofagov in limfocitov T.

Za določitev korelacije med krmo in opazovanimi parametri smo uporabili parametrični Pearsonov koeficient korelacije in neparametrični Spearmanov koeficient korelacije. Ker smo v celotni nalogi upoštevali predvsem rezultate neparametričnih testov, smo tudi tu upoštevali slednjega. S Spearmanovim koeficientom korelacije smo preverili, ali med opazovanimi spremenljivkami (konzumacija krme in spremenljivkami - apoptoza, proliferacija, makrofagi, limfociti T (CD3), arealna in numerična gostota germinativnih središč limfnih foliklov) obstaja statistično značilna povezanost. Uporabili smo statistični program SPSS (Statistical Package for Social Sciencies, Version 17).

Razlike pri statističnih analizah smo opredelili kot značilne, če je bila vrednost P manjša kot 0,05 ($P < 0,05$).

4 REZULTATI

V tem poglavju so predstavljeni rezultati raziskave o imunskem odzivu v limfatičnih organih mladic, ki so konzumirale krmo z mikotoksinom DON, in njihovih teden dni starih pujskov.

4.1 PUJSKI

4.1.1 Timus

4.1.1.1 Apoptoza

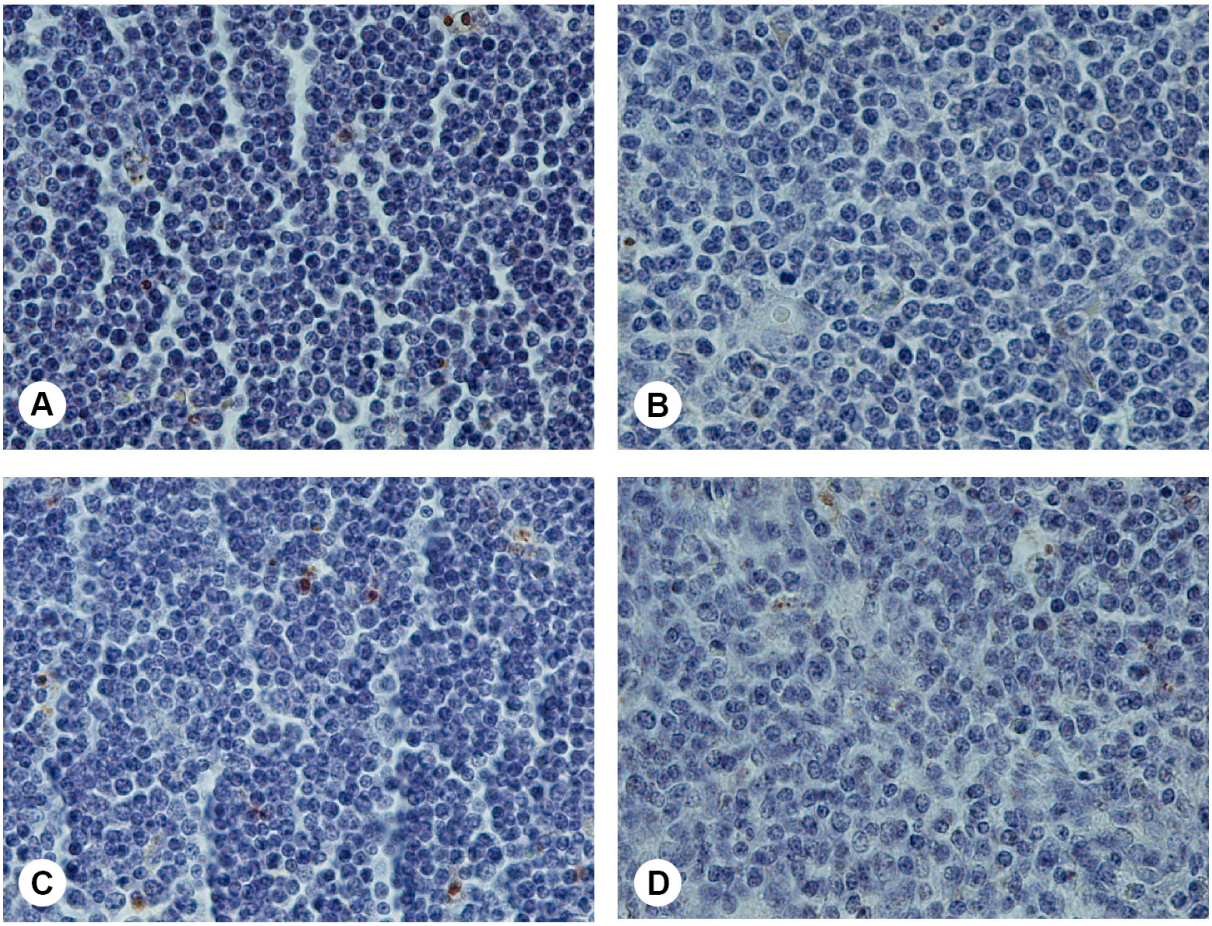
Apoptozo celic smo dokazali tako v skorji kot v sredici timusa pujskov (Slika 4). Povprečno število apoptotičnih celic je bilo značilno večje (skorja, P = 0,010; sredica P = 0,001) v poskusni skupini v primerjavi s kontrolno skupino. Večje povprečno število TUNEL-pozitivnih celic je bilo ugotovljeno tako v sredici kot v skorji timusa poskusne skupine (Tabela 5, Slika 5).

Tabela 5: Povprečno število TUNEL-pozitivnih celic v skorji in v sredici timusov pujskov kontrolne in poskusne skupine (5 naključno izbranih polj, x 400).

Table 5: The average number of TUNEL-positive cells in the thymus cortex and medulla of piglets from the control and experimental groups (5 randomly selected fields, x 400).

Mesto meritve/ skupina	Število pujskov	Median	Minimum	Maksimum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
skorja/ kontrolna	10	7,70	5,6	15,4	6,25	10,30	16,00	0,010
skorja/ poskusna	10	11,50	8,8	15,2	10,30	13,95		
sredica/ kontrolna	10	3,10	1,6	6,6	2,95	4,05	6,50	0,001
sredica/ poskusna	10	7,60	5,8	9,2	5,80	8,10		

P - statistična značilnost (P < 0,05)



Slika 5: Apoptoza celic v timusu pujskov. A: skorja/kontrolna skupina; B: sredica/kontrolna skupina; C: skorja/poskusna skupina; D: sredica/poskusna skupina. Metoda TUNEL, x 400.

Figure 5: Cell apoptosis in thymus piglets. A: cortex/control group; B: medulla/control group; C: cortex/experimental group; D: medulla/experimental group. TUNEL method, x 400.

4.1.1.2 Relativno razmerje površine med skorjo in sredico timusa pujskov

Pujski mladic v poskusni skupini so imeli v primerjavi s kontrolno skupino, statistično značilno (skorja, P = 0,023; sredica, P = 0,023) spremenjeno razmerje med skorjo in sredico timusa. V poskusni skupini je bila površina skorje manjša in površina sredice večja v primerjavi s kontrolno skupino (Tabela 6).

Tabela 6: Relativno razmerje med skorjo in sredico timusa pujskov kontrolne in poskusne skupine, izražena v % (20 naključno izbranih polj, x 40).

Table 6: The relative ratio of the thymus cortex and medulla in the piglets of the control and the experimental groups, expressed in % (20 randomly selected fields, x 40).

Mesto meritve v timusu/ skupina	Število pujskov	Median	Minimum	Maksimum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
skorja/ kontrolna	10	77,00	71,41	83,14	73,68	79,63	20,00	0,023
skorja/ poskusna	10	71,93	63,89	83,21	66,49	74,80		
sredica/ kontrolna	10	23,00	16,86	28,59	20,37	26,32	20,00	0,023
sredica/ poskusna	10	28,07	16,79	36,11	25,20	33,51		

P - statistična značilnost (P < 0,05)

4.1.1.3 Makrofagi

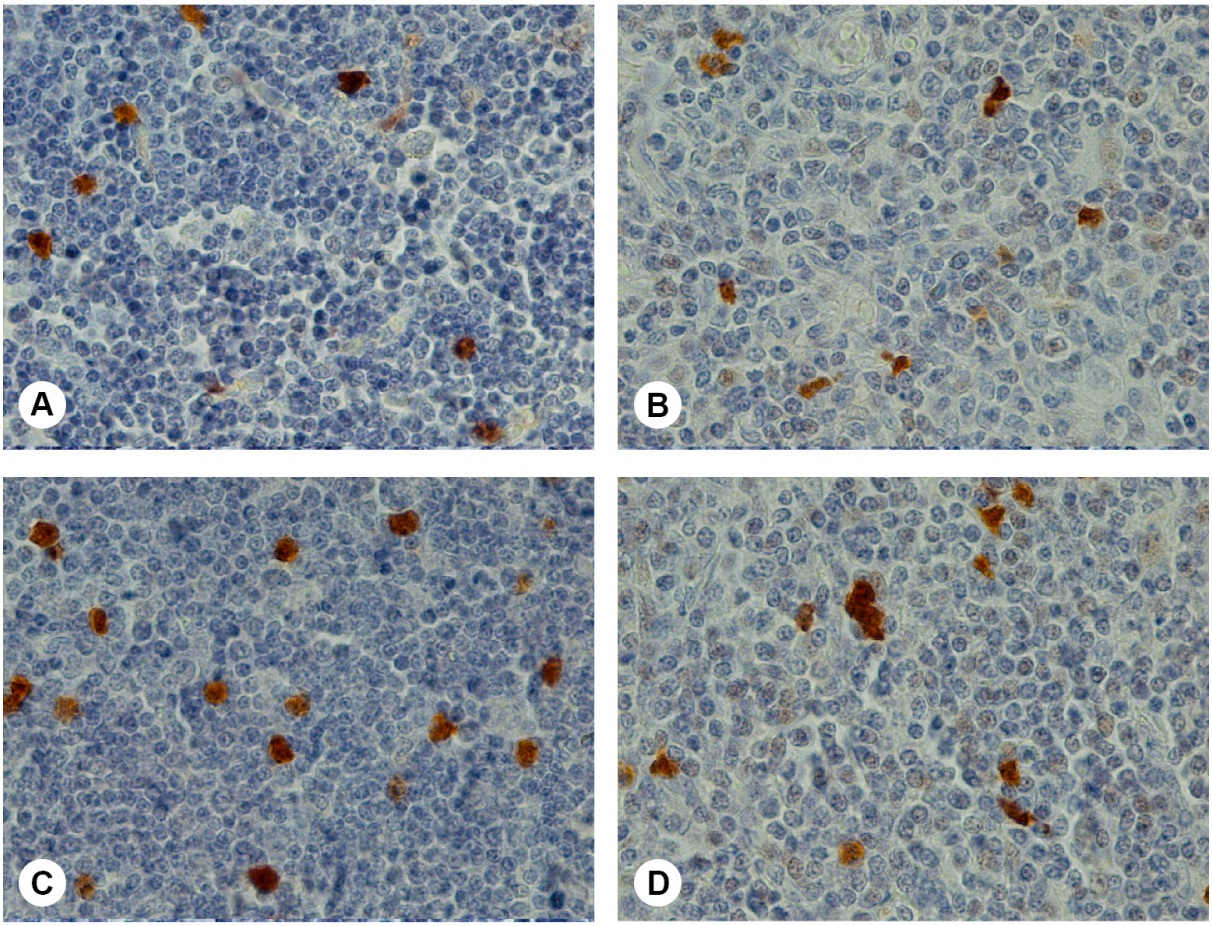
V skorji in sredici timusa kontrolne in poskusne skupine je bilo povprečno število makrofagov statistično enako (skorja, P = 0,112; sredica, P = 0,596) (Tabela 7, Slika 6).

Tabela 7: Povprečno število makrofagov v timusu pujskov kontrolne in poskusne skupine (5 naključno izbranih vidnih polj, x 400).

Table 7: The average number of macrophages in thymus of piglets from the control and experimental groups (5 randomly selected fields, x 400).

Mesto meritve v timusu/ skupina	Število pujskov	Median	Minimum	Maksimum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
skorja/ kontrolna	10	18,20	12,8	27,0	13,75	22,25	29,00	0,112
skorja/ poskusna	10	23,90	11,4	35,2	15,65	27,35		
sredica/ kontrolna	10	10,30	7,8	13,8	9,40	11,10	43,00	0,596
sredica/ poskusna	10	9,80	6,4	12,4	7,35	11,65		

P - statistična značilnost (P < 0,05)



Slika 6: Imunohistokemičen prikaz makrofagov v timusu pujskov. A: skorja/kontrolna skupina; B: sredica/kontrolna skupina; C: skorja/poskusna skupina; D: sredica/poskusna skupina. Imunohistokemično barvanje z uporabo monoklonskih protiteles MAC 387 (DAKO). Kontrastirano s hematoksilinom, x 400.

Figure 6: Immunohistochemical analysis of macrophages in piglets thymus. A: cortex/control group; B: medulla/control group; C: cortex/experimental group; D: medulla/experimental group. Immunohistochemical staining using monoclonal antibodies MAC 387 (DAKO). Contrasted with hematoxylin, x 400.

4.1.1.4 Proliferacijski indeks

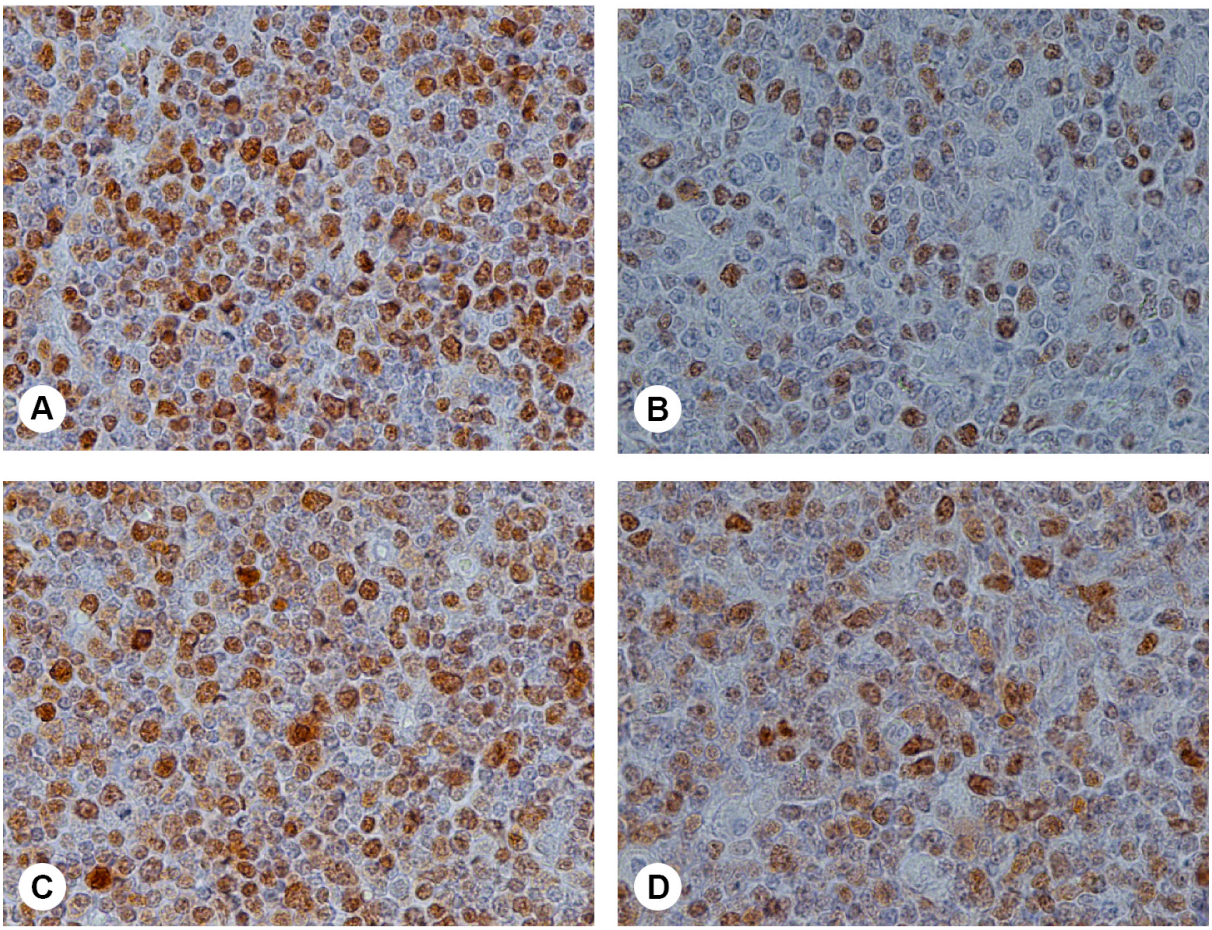
Proliferacijski indeks je bil statistično večji (skorja, P = 0,001; sredica, P < 0,001) pri pujskih mladic poskusne skupine. Število celic v proliferaciji je bilo večje v skorji in v sredici timusa pujskov poskusne skupine (Tabela 8, Slika 7).

Tabela 8: Število celic v proliferaciji na 1000 preštetih celic v timusu pujskov kontrolne in poskusne skupine (5 naključno izbranih vidnih polj, x 400).

Table 8: The number of cells in proliferation of 1000 counted cells in thymus of piglets from the control and experimental groups (5 randomly selected fields, x 400).

Mesto meritve/ skupina	Število pujskov	Median	Minimum	Maksimum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
skorja/ kontrolna	10	323,50	243,0	378,0	264,50	355,50	5,00	0,001
skorja/ poskusna	10	436,00	319,0	577,0	388,00	459,25		
sredica/ kontrolna	10	115,50	95,0	152,0	101,75	147,75	0,00	<0,001
sredica/ poskusna	10	211,50	185,0	388,0	194,50	248,75		

P - statistična značilnost (P < 0,05)



Slika 7: Imunohistokemičen prikaz proliferacije celic v timusu pujskov. A: skorja/kontrolna skupina; B: sredica/kontrolna skupina; C: skorja/poskusna skupina; D: sredica/poskusna skupina. Imunohistokemično barvanje z uporabo monoklonskih protiteles Ki-67 (DAKO). Kontrastirano s hematoksilinom, x 400.

Figure 7: Immunohistochemical analysis of cell proliferation in piglets thymus. A: cortex/control group; B: medulla/control group; C: cortex/experimental group; D: medulla/experimental group. Immunohistochemical staining using a monoclonal antibodies Ki-67 (DAKO. Contrasted with hematoxylin, x 400.

4.1.2 Mezenterialne bezgavke

4.1.2.1 Apoptoza

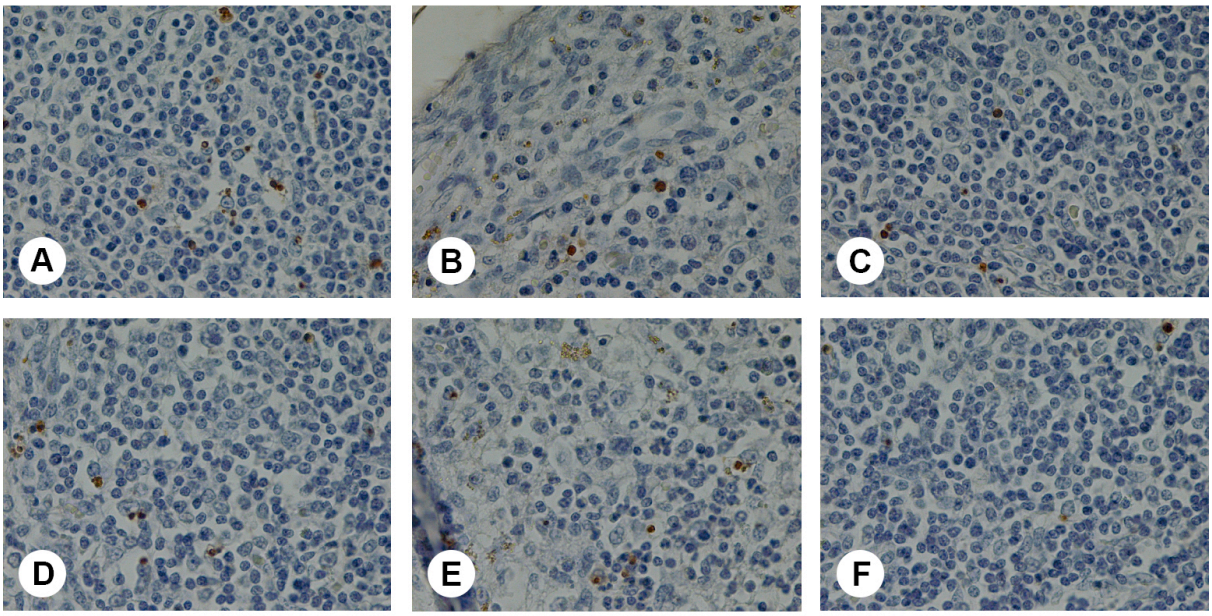
Z metodo TUNEL smo dokazali apoptozo celic v mezenterialnih bezgavkah pujskov. Ugotovili smo, da je povprečno število apoptotičnih celic v različnih področjih mezenterialnih bezgavk pujskov kontrolne in poskusne skupine statistično enako. (germinativno središče limfatičnega folikla, P = 0,229; interfolikularno področje skorje, P = 0,245; sredica bezgavke, P = 0,054) (Tabela 9, Slika 8).

Tabela 9: Povprečno število TUNEL-pozitivnih celic v mezenterialnih bezgavkah pujskov kontrolne in poskusne skupine (5 naključno izbranih polj, x 400).

Table 9: The average number of TUNEL-positive cells in mesenteric lymph nodes of piglets from the control and experimental groups (5 randomly selected fields, x 400).

Mesto meritve/ skupina	Število pujskov	Median	Minimum	Maksimum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
gs limfatičnega folikla/ kontrolna	8	13,10	6,6	18,2	7,25	17,10	23,50	0,229
gs limfatičnega folikla/ poskusna	9	8,20	1,8	19,6	5,30	11,50		
sredica/ kontrolna	8	3,10	2,2	4,4	2,35	3,40	24,00	0,245
sredica/ poskusna	9	3,40	2,4	4,4	3,00	4,10		
interfolikularno področje/ kontrolna	8	4,60	3,4	6,8	3,45	5,80	16,00	0,054
interfolikularno področje/ poskusna	9	6,60	1,4	10,8	5,30	8,60		

gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)



Slika 8: Apoptoza celic v mezenterialnih bezgavkah pujskov. A: germinativno središče limfatičnega folikla/kontrolna skupina; B: sredica/kontrolna skupina; C: interfolikularno področje/kontrolna skupina; D: germinativno središče limfatičnega folikla/poskusna skupine; E: sredica/ poskusna skupine; F: interfolikularno področje/poskusna skupine. Metoda TUNEL, x 400.

Figure 8. Cell apoptosis in the mesenteric lymph nodes of piglets. A: germinativ center of lymphatic follicle/control group; B: medulla/control group; C: interfolicullar area/control group; D: germinativ center of lymphatic follicle/experimental group; E: medulla/experimental group; F: interfolicullar area/experimental group. TUNEL method, x 400.

4.1.2.2 Makrofagi

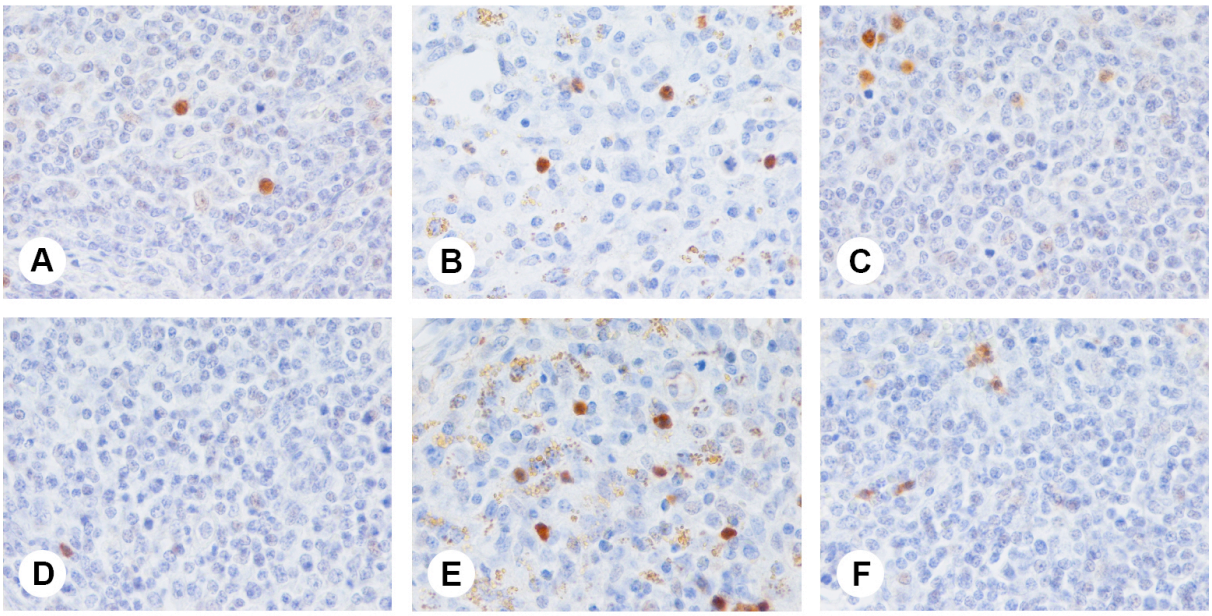
Povprečno število makrofagov v germinativnih središčih limfatičnih foliklih mezenterialnih bezgavk pujskov je bilo statistično manjše (P = 0,001) v poskusni skupni. V interfolikularnih področjih je bilo povprečno število makrofagov v poskusni skupini prav tako manjše v primerjavi s kontrolno skupino, vendar statistično neznačilno (P = 0,385). Statistično večje (P = 0,004) pa je bilo povprečno število makrofagov v sredici mezenterialnih bezgavk pujskov poskusne skupine (Tabela 10, Slika 9).

Tabela 10: Povprečno število makrofagov v mezenterialnih bezgavkah pujskov kontrolne in poskusne skupine (5 naključno izbranih vidnih polj, x 400).

Table 10: The average number of macrophages in mesenteric lymph nodes of piglets from the control and experimental groups (5 randomly selected fields, x 400).

Mesto meritve/ skupina	Število pujskov	Media	Minimum	Maksimum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
gs limfatičnega folikla/ kontrolna	8	1,60	1,0	3,4	1,45	2,30	3,00	0,001
gs limfatičnega folikla/ poskusna	9	0,80	0,0	1,4	0,40	1,00		
sredica/ kontrolna	8	4,60	3,2	11,0	4,25	7,95	6,00	0,004
sredica/ poskusna	9	12,80	5,8	17,6	8,30	16,10		
interfolikularno področje/ kontrolna	8	5,70	3,8	10,6	4,45	7,45	27,00	0,385
interfolikularno področje/ poskusna	9	4,00	1,4	11,0	3,00	7,40		

gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)



Slika 9: Imunohistokemičen prikaz makrofagov v mezenterialnih bezgavkah pujskov. A: germinativno središče limfatičnega folikla/kontrolna skupina; B: sredica/kontrolna skupina; C: interfolikularno področje/kontrolna skupina; D: germinativno središče limfatičnega folikla/poskusna skupine; E: sredica/ poskusna skupine; F: interfolikularno področje/poskusna skupine. Imunohistokemično barvanje z uporabo monoklonskih protiteles MAC 387 (DAKO). Kontrastirano s hematoksilinom, x 400.

Figure 9: Immunohistochemical analysis of macrophages in the mesenteric lymph nodes of piglets. A: germinative center of lymphatic follicle/control group; B: medulla/control group; C: interfolicullar area/control group; D: germinative center of lymphatic follicle/experimental group; E: medulla/experimental group; F: interfolicullar area/experimental group. Immunohistochemical staining using monoclonal antibodies MAC 387 (DAKO). Contrasted with hematoxylin, x 400.

4.1.2.3 Proliferacijski indeks

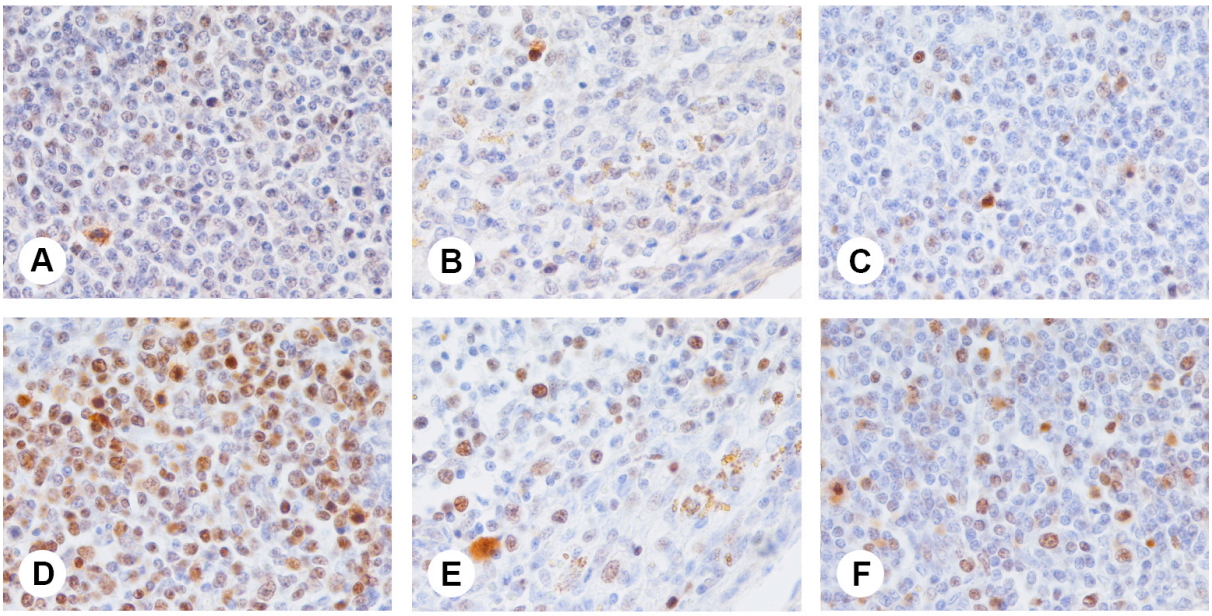
Proliferacijski indeks je bil statistično značilno večji v interfolikularnih področjih (P = 0,003) in v sredici (P = 0,001) mezenterialnih bezgavk pujskov poskusne skupine. Med kontrolno in poskusno skupino ni bilo statistično značilnih razlik glede proliferacije v področju germinativnih središč limfatičnih foliklov (P = 0,135) mezenterialnih bezgavk (Tabela 11, Slika 10).

Tabela 11: Število celic v proliferaciji na 1000 preštetih celic v mezenterialnih bezgavkah pujskov kontrolne in poskusne skupine (5 naključno izbranih vidnih polj, x 400).

Table 11: The number of cells in proliferation of 1000 counted cells in mesenteric lymph nodes of piglets from the control and experimental groups (5 randomly selected fields, x 400).

Mesto meritve/ skupina	Število pujskov	Median	Minimum	Maksimum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
gs limfatičnega folikla/ kontrolna	8	68,50	26,0	153,0	30,50	85,00	20,50	0,135
gs limfatičnega folikla/ poskusna	9	95,00	57,0	153,0	67,00	117,00		
sredica/ kontrolna	8	5,50	4,0	18,0	5,00	9,25	0,00	0,001
sredica/ poskusna	9	30,00	19,0	47,0	23,00	38,00		
interfolikularno področje/ kontrolna	8	18,50	7,0	59,0	10,25	25,50	5,00	0,003
interfolikularno področje/ poskusna	9	55,00	41,0	105,0	49,00	68,50		

gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)



Slika 10: Imunohistokemičen prikaz proliferacije celic v mezenterialnih bezgavkah pujskov. A: germinativno središče limfatičnega folikla/kontrolna skupina; B: sredica/kontrolna skupina; C: interfolikularno področje/kontrolna skupina; D: germinativno središče limfatičnega folikla/poskusna skupine; E: sredica/ poskusna skupine; F: interfolikularno področje/poskusna skupine. Imunohistokemično barvanje z uporabo monoklonskih protiteles Ki-67 (DAKO). Kontrastirano s hematoksilinom, x 400.

Figure 10: Immunohistochemical analysis of cell proliferation in the mesenteric lymph nodes of piglets. A: germinative center of lymphatic follicle/control group; B: medulla/control group; C: interfolicullar area/control group; D: germinative center of lymphatic follicle/experimental group; E: medulla/experimental group; F: interfolicullar area/experimental group. Immunohistochemical staining using a monoclonal antibodies Ki-67 (DAKO. Contrasted with hematoxylin, x 400.

4.1.2.4 Arealna in numerična gostota

Povprečna arealna in numerična gostota germinativnih središč limfatičnih foliklov v mezenterialnih bezgavkah pujskov sta bili v poskusni skupini statistično značilno manjši (AG, P = 0,016; NG, P = 0,007) v primerjavi s kontrolno skupino (Tabela 12).

Tabela 12: Povprečna arealna in numerična gostota germinativnih središč limfatičnih foliklov v mezenterialnih bezgavkah pujskov kontrolne in poskusne skupine (20 naključno izbranih polj, x 40).

Table 12: The average areal and numerical densities of germinal centers of the lymphatic follicles in the mesenteric lymph nodes of piglets from the control and experimental groups (20 randomly selected fields, x 40).

AG, NG/skupina	Število pujskov	Median	Minimum	Maximum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
AG gs/ kontrolna	8	262558,30	193592,20	403210,80	251969,50	302252,90	11,0	0,016
AG gs/ poskusna	9	160030,00	108135,00	332817,00	130773,00	245880,00		
NG gs/ kontrolna	8	8,60	6,40	13,20	8,20	8,90	8,0	0,007
NG gs/ poskusna	9	7,00	4,00	8,00	6,00	8,00		

AG – arealna gostota; NG – numerična gostota; gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)

4.1.3 Peyerjeve plošče ileuma

4.1.3.1 Apoptoza

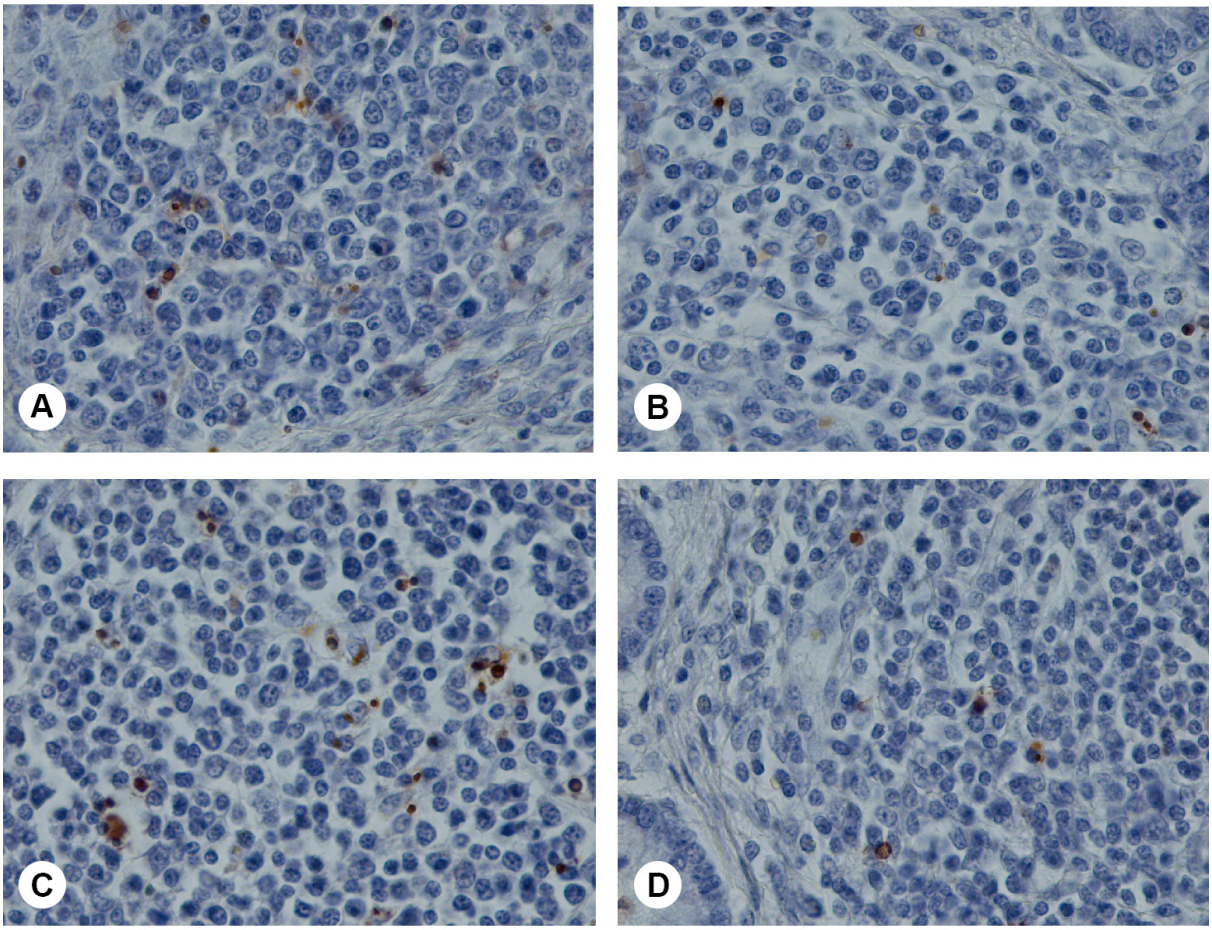
Apoptozo celic smo dokazali v germinativnih središčih limfatičnih foliklov in v področjih nad germinativnimi središči limfatičnih foliklov v Peyerjevih ploščah ileuma pujskov. V primerjavi poskusne in kontrolne skupine povprečno število apoptotičnih celic ni bilo statistično značilno manjše (germinativno središče limfatičnega folikla, P = 0,405; področje nad germinativnimi središči limfatičnih foliklov, P = 0,064) (Tabela 13, Slika 11).

Tabela 13: Povprečno število TUNEL-pozitivnih celic v Peyerjevih ploščah ileuma pujskov kontrolne in poskusne skupine (5 naključno izbranih polj, x 400).

Table 13: The average number of TUNEL-positive cells in the ileum Peyer's patches of piglets from the control and experimental groups (5 randomly selected fields, x 400).

Mesto meritve/skupina	Število pujskov	Median	Minimum	Maksimum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
gs limfatičnega folikla/ kontrolna	10	32,20	19,8	43,4	27,00	37,15	39,00	0,405
gs limfatičnega folikla/ poskusna	10	30,00	18,8	38,8	23,30	34,45		
področje nad gs limfatičnega folikla/ kontrolna	10	10,10	5,6	13,8	9,05	12,25	25,50	0,064
področje nad gs limfatičnega folikla/ poskusna	10	8,60	4,4	11,6	5,85	10,40		

gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)



Slika 11: Apoptoza celic v Peyerjevih ploščah ileuma pujskov. A: germinativno središče limfatičnega folikla/kontrolna skupina; B: področje nad germinativnim središčem limfatičnega folikla/kontrolna skupina; C: germinativno središče limfatičnega folikla/poskusna skupina; D: področje nad germinativnim središčem limfatičnega folikla/poskusna skupina. Metoda TUNEL, x 400.

Figure 11. Cell apoptosis in the ileum Peyer's patches of piglets. A: germinative center of lymphatic follicle/control group; B: an area above the germinative center of lymphatic follicle/control group; C: germinative center of lymphatic follicle/experimental group; D: an area above the germinative center of lymphatic follicle/experimental group. TUNEL method, x 400.

4.1.3.2 Makrofagi

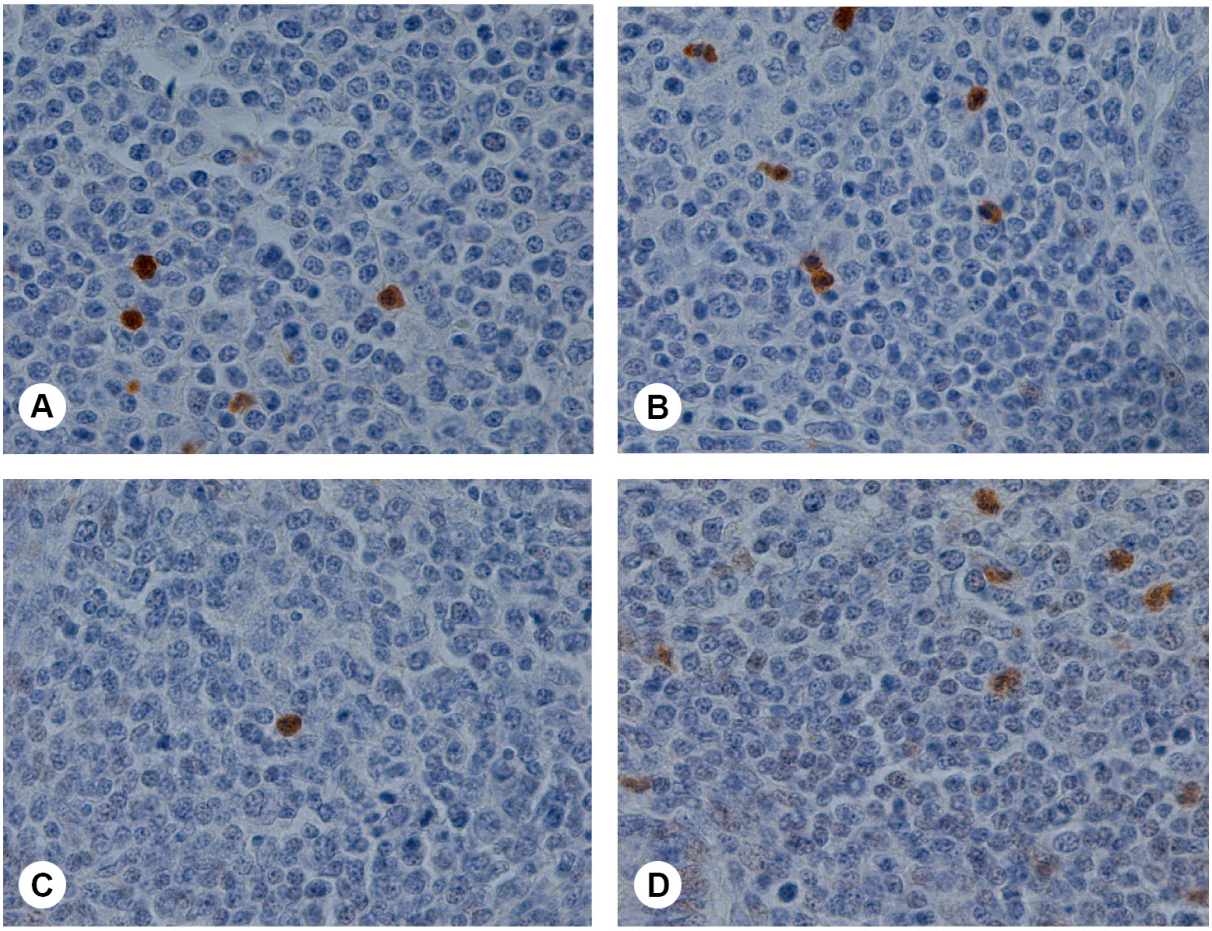
Povprečno število makrofagov v Peyerjevih ploščah ileuma pujskov je bilo v poskusni skupini manjše v germinativnih središčih limfatičnih foliklov (P = 0,344), večje pa v področju nad germinativnimi središči limfatičnih foliklov (P = 0,256) Peyerjevih plošč, vendar razlike niso statistično značilne (Tabela 14, Slika 12).

Tabela 14: Povprečno število makrofagov v Peyerjevih ploščah ileuma pujskov kontrolne in poskusne skupine (5 naključno izbranih vidnih polj, x 400).

Table 14: The average number of macrophages in the ileum Peyer's patches of piglets from the control and experimental groups (5randomly selected fields, x 400).

Mesto meritve/skupina	Število pujskov	Median	Minimum	Maksimum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
gs limfatičnega folikla/ kontrolna	10	3,60	0,4	8,2	2,20	6,40	37,50	0,344
gs limfatičnega folikla/ poskusna	10	2,50	1,4	6,6	1,90	4,30		
področje nad gs limfatičnega folikla/ kontrolna	10	8,20	1,6	19,0	5,75	16,40	35,00	0,256
področje nad gs limfatičnega folikla/ poskusna	10	14,30	4,2	25,8	7,45	17,55		

gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)



Slika 12: Imunohistokemičen prikaz makrofagov v Peyerjevih ploščah ileuma pujskov. A: germinativno središče limfatičnega folikla/kontrolna skupina; B: področje nad germinativnim središčem limfatičnega folikla/kontrolna skupina; C: germinativno središče limfatičnega folikla/poskusna skupina; D: področje nad germinativnim središčem limfatičnega folikla/poskusna skupina. Imunohistokemično barvanje z uporabo monoklonskih protiteles MAC 387 (DAKO). Kontrastirano s hematoksilinom, x 400.

Figure 12: Immunohistochemical analysis of macrophages in ileum Peyer's patches of piglets. A: germinative center of lymphatic follicle/control group; B: an area above the germinative center of lymphatic follicle/control group; C: germinative center of lymphatic follicle/experimental group; D: an area above the germinative center of lymphatic follicle/experimental group. Immunohistochemical staining using monoclonal antibodies MAC 387 (DAKO). Contrasted with hematoxylin, x 400.

4.1.3.3 Proliferacijski indeks

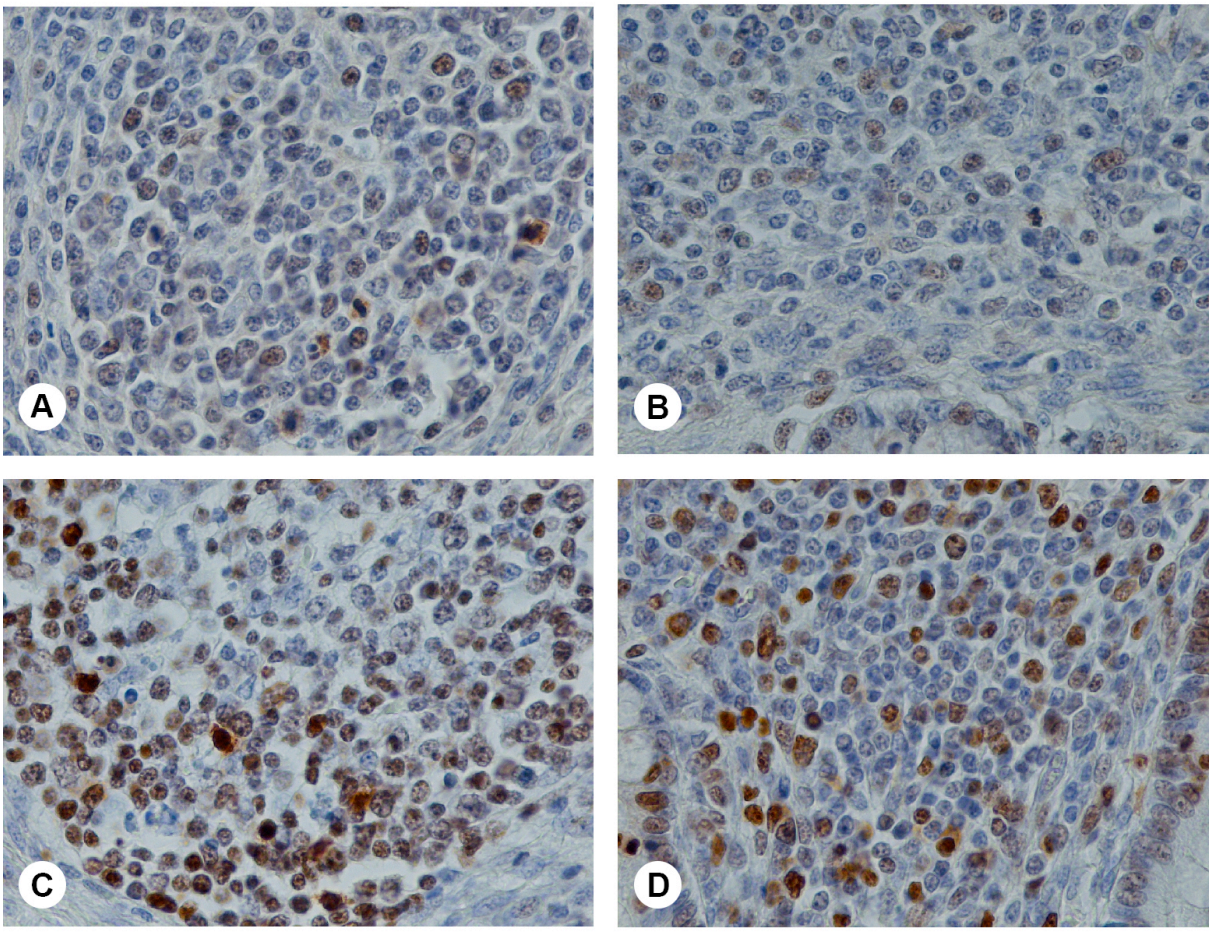
V Peyerjevih ploščah ileuma pujskov poskusne skupine je bil proliferacijski indeks statistično značilno večji, če ga primerjamo s kontrolno skupino. Večje število celic v proliferaciji je bilo ugotovljeno v germinativnih središčih limfatičnih foliklov (P < 0,001) in v področju nad germinativnimi središči limfatičnih foliklov (P < 0,001) Peyerjevih plošč poskusne skupine (Tabela 15, Slika 13).

Tabela 15: Število celic v proliferaciji na 1000 preštetih celic v Peyerjevih ploščah ileuma pujskov kontrolne in poskusne skupine (5 naključno izbranih vidnih polj, x 400).

Table 15: The number of cells in proliferation of 1000 counted cells in the ileum Peyer's patches of piglets from the control and experimental groups (5 randomly selected fields, x 400).

Mesto meritve/ skupina	Število pujskov	Median	Minimum	Maksimum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
gs limfatičnega folikla/ kontrolna	10	120,00	98,0	169,0	106,25	151,50	0,00	<0,001
gs limfatičnega folikla/ poskusna	10	272,50	190,0	574,0	214,50	381,75		
področje nad gs limfatičnega folikla/ kontrolna	10	51,00	38,0	65,0	40,00	60,50	0,00	<0,001
področje nad gs limfatičnega folikla/ poskusna	10	127,00	93,0	249,0	99,25	156,75		

gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)



Slika 13: Imunohistokemičen prikaz proliferacije celic v Peyerjevih ploščah ileuma pujskov. A: germinativno središče limfatičnega folikla/kontrolna skupina; B: področje nad germinativnim središčem limfatičnega folikla/kontrolna skupina; C: germinativno središče limfatičnega folikla/poskusna skupina; D: področje nad germinativnim središčem limfatičnega folikla/poskusna skupina. Imunohistokemično barvanje z uporabo monoklonskih protiteles Ki-67 (DAKO). Kontrastirano s hematoksilinom, x 400.

Figure 13: Immunohistochemical analysis of cell proliferation in ileum Peyer's patches of piglets. A: germinative center of lymphatic follicle/control group; B: an area above the germinative center of lymphatic follicle/control group; C: germinative center of lymphatic follicle/experimental group; D: an area above the germinative center of lymphatic follicle/experimental group. Immunohistochemical staining using a monoclonal antibodies Ki-67 (DAKO. Contrasted with hematoxylin, x 400.

4.1.3.4 Limfociti T

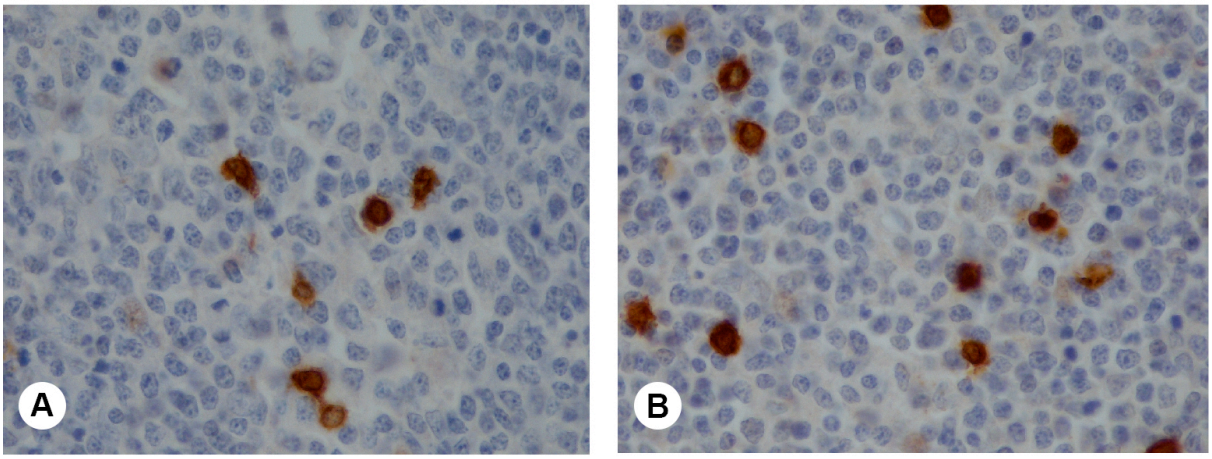
V germinativnih središčih limfatičnih foliklov Peyerjevih plošč ileuma pujskov je bilo povprečno število limfocitov T večje v poskusni skupini v primerjavi s kontrolno, vendar razlike niso statistično značilne (P = 0,069) (Tabela 16, Slika 14).

Tabela 16: Povprečno število limfocitov T v Peyerjevih ploščah ileuma pujskov kontrolne in poskusne skupine (5 naključno izbranih vidnih polj, x 400).

Table 16: The average number of lymphocytes T in the ileum Peyer's patches of piglets from the control and experimental groups (5 randomly selected fields, x 400).

Mesto meritve/skupina	Število pujskov	Median	Minimum	Maksimum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
gs limfatičnega folikla/ kontrolna	10	8,40	4,4	10,2	7,550	9,40	26,00	0,069
gs limfatičnega folikla/ poskusna	10	9,90	7,2	12,8	8,350	12,05		

gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)



Slika 14: Imunohistokemičen prikaz limfocitov T v Peyerjevih ploščah ileuma pujskov. A: germinativno središče limfatičnega folikla/kontrolna skupina; B: germinativno središče limfatičnega folikla/poskusna skupina. Imunohistokemično barvanje z uporabo poliklonskih protiteles CD 3 (DAKO). Kontrastirano s hematoksilinom, x 400.

Figure 14. Immunohistochemical analysis of lymphocytes T in ileum Peyer's patches of piglets. A: germinative center of lymphatic follicle/control group; B: germinative center of lymphatic follicle/experimental group. Immunohistochemical staining using policlonal antibodies CD3 (DAKO). Contrasted with hematoxylin, x 400.

4.1.3.5 Arealna in numerična gostota

Povprečna arealna in numerična gostota germinativnih središč limfatičnih foliklov Peyerjevih plošč pujskov sta bili v poskusni skupini manjši kot v kontrolni skupini. Statistično značilna razlika je bila izračunana le za arealno gostoto limfatičnih foliklov (AG, P = 0,028; NG, P = 0,059) (Tabela 17).

Tabela 17: Povprečna arealna in numerična gostota germinativnih središč limfatičnih foliklov v Peyerjevih ploščah ileuma pujskov kontrolne in poskusne skupine (20 naključno izbranih polj, x 40).

Table 17: The average areal and numerical density of germinal centers of the lymphatic follicles in the ileum Peyer's patches of piglets from the control and experimental groups (20 randomly selected fields, x 40).

AG, NG/ skupina	Število pujskov	Median	Minimum	Maximum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
AG gs/ kontrolna	10	540581,50	423456,00	631841,00	460681,00	603912,00	21,0	0,028
AG gs/ poskusna	10	446446,00	287344,00	719631,00	357206,50	492193,25		
NG gs/ kontrolna	10	9,00	8,00	11,00	8,00	9,50	26,0	0,059
NG gs/ poskusna	10	8,00	7,00	10,00	7,00	9,00		

AG – arealna gostota; NG – numerična gostota; gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)

4.1.4 Vranica

4.1.4.1 Apoptoza

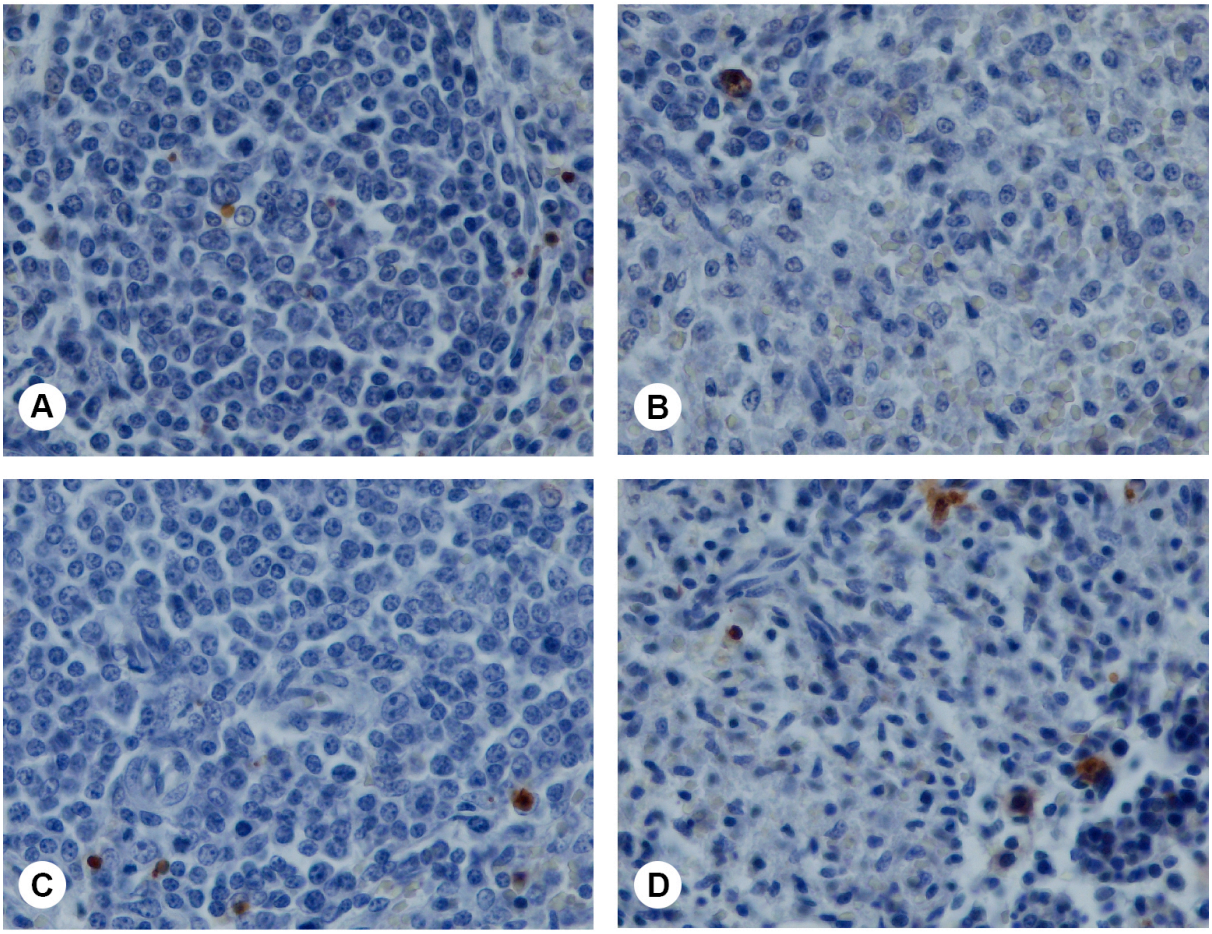
Povprečno število TUNEL-pozitivnih celic v vranici pujskov je bilo v poskusni skupini statistično značilno večje (germinativno središče limfatičnega folikla, P = 0,001; rdeča pulpa, P < 0,001) kot v kontrolni skupini. Večje povprečno število TUNEL-pozitivnih celic je bilo tako v germinativnih središčih limfatičnih foliklov kot v rdeči pulpi poskusne skupine (Tabela 18, Slika 15).

Tabela 18: Povprečno število TUNEL-pozitivnih celic v vranicah pujskov kontrolne in poskusne skupine (5 naključno izbranih polj, x 400).

Table 18: The average number of TUNEL-positive cells in the spleen of piglets from the control and experimental groups (5 randomly selected fields, x 400).

Mesto meritve/skupina	Število pujskov	Median	Minimum	Maksimum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
gs limfatičnega folikla/ kontrolna	10	4,30	1,2	5,6	3,00	4,55	8,00	0,001
gs limfatičnega folikla/ poskusna	10	8,40	2,8	11,8	6,35	10,35		
rdeča pulpa/ kontrolna	10	1,80	1,4	3,8	1,40	3,05	4,00	<0,001
rdeča pulpa/ poskusna	10	6,30	2,4	7,8	4,60	7,00		

gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)



Slika 15: Apoptoza celic v vranici pujskov. A: germinativno središče limfatičnega folikla/kontrolna skupina; B: rdeča pulpa/kontrolna skupina; C: germinativno središče limfatičnega folikla/poskusna skupina; D: rdeča pulpa/poskusna skupina. Metoda TUNEL, x 400.

Figure 15: Cell apoptosis in the spleen of piglets. A: germinative center of the lymphatic follicle/control group; B: red pulp/control group; C: germinative center of the lymphatic follicle/experimental group; D: red pulp/experimental group. TUNEL method, x 400.

4.1.4.2 Makrofagi

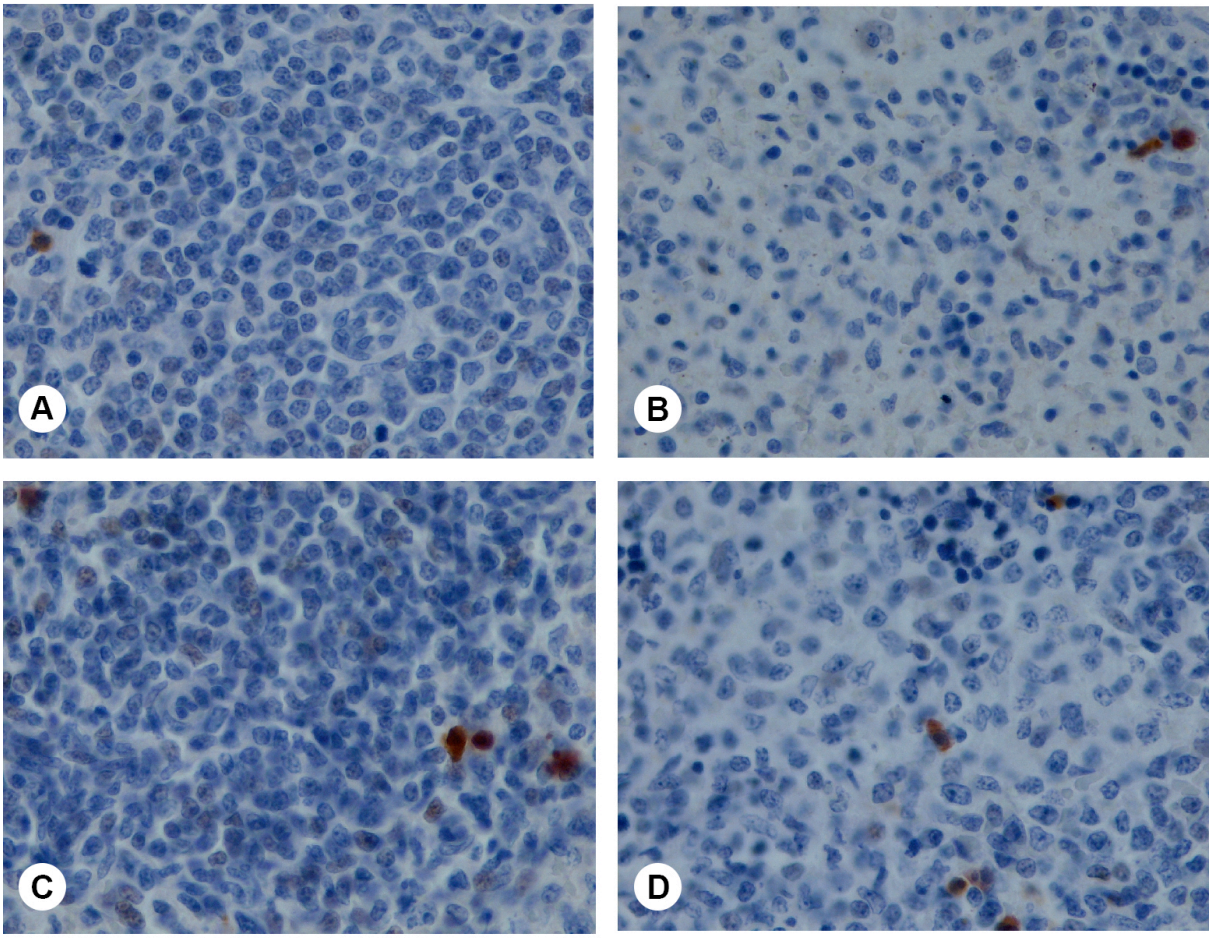
Povprečno število makrofagov v vranici pujskov je bilo v poskusni skupini večje, to je v germinativnih središčih limfatičnih foliklov in v rdeči pulpi, če ga primerjamo s kontrolno skupino. Razlike v povprečnem številu makrofagov v vranici pujskov med skupinama so bile statistično značilne (germinativno središče limfatičnega folikla, P < 0,001; rdeča pulpa, P = 0,002) (Tabela 19, Slika 16).

Tabela 19: Povprečno število makrofagov v vranici pujskov kontrolne in poskusne skupine (5 naključno izbranih vidnih polj, x 400).

Table 19: The average number of macrophages in the spleen of piglets from the control and experimental groups (5 randomly selected fields, x 400).

Mesto meritve/skupina	Število pujskov	Median	Minimum	Maksimum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
gs limfatičnega folikla/ kontrolna	10	1,00	0,8	1,6	0,80	1,25	1,00	<0,001
gs limfatičnega folikla/ poskusna	10	3,30	1,6	6,0	2,20	4,35		
rdeča pulpa/ kontrolna	10	2,00	1,2	4,0	1,70	2,60	9,50	0,002
rdeča pulpa/ poskusna	10	3,70	2,2	5,4	2,90	4,45		

gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)



Slika 16: Imunohistokemičen prikaz makrofagov v vranici pujskov. A: germinativno središče limfatičnega folikla/kontrolna skupina; B: rdeča pulpa/kontrolna skupina; C: germinativno središče limfatičnega folikla/poskusna skupina; D: rdeča pulpa/poskusna skupina. Imunohistokemično barvanje z uporabo monoklonskih protiteles MAC 387 (DAKO). Kontrastirano s hematoksilinom, x 400.

Figure 16: Immunohistochemical analysis of macrophages in the spleen of piglets. A: germinative center of the lymphatic follicle/control group; B: red pulp/control group; C: germinative center of the lymphatic follicle/experimental group; D: red pulp/experimental group. Immunohistochemical staining using monoclonal antibodies MAC 387 (DAKO). Contrasted with hematoxylin, x 400.

4.1.4.3 Proliferacijski indeks

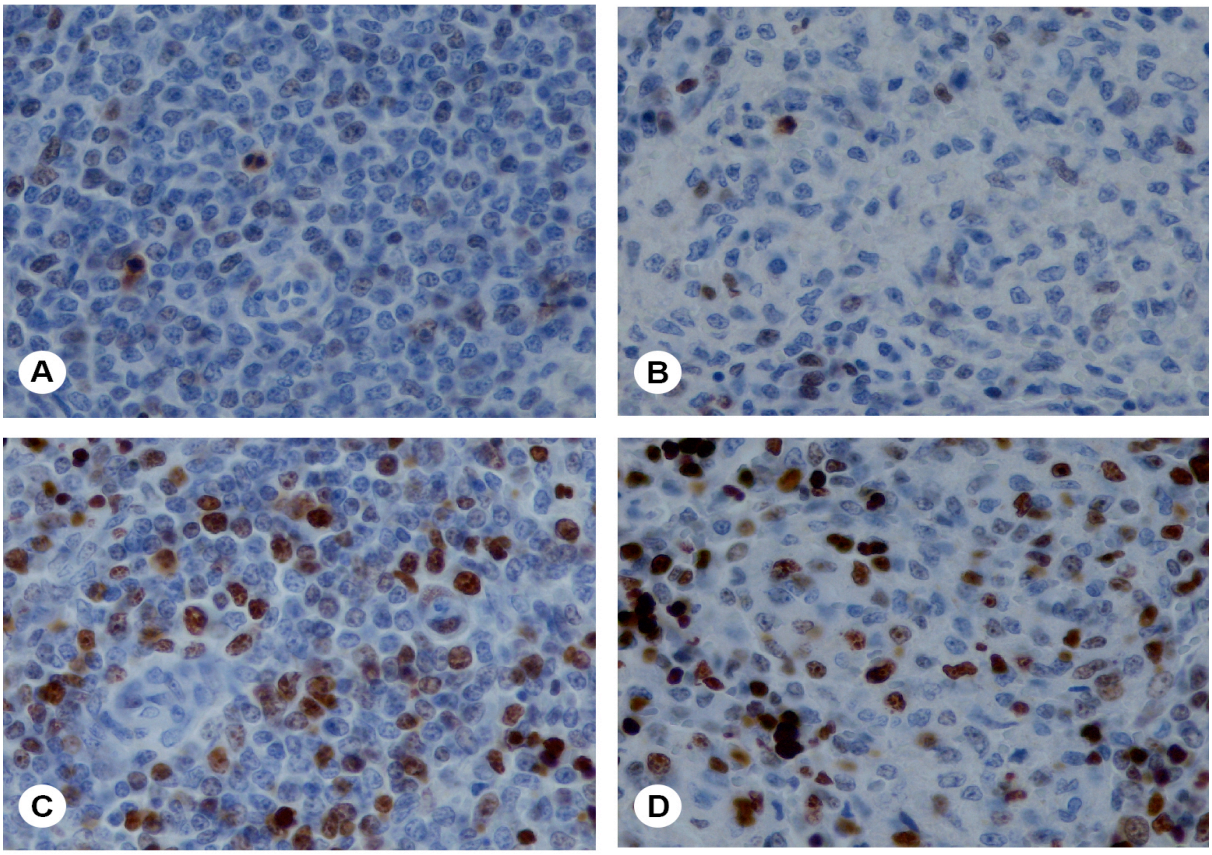
V vranici pujskov poskusne skupine, je bil proliferacijski indeks statistično značilno večji kot v kontrolni skupini (germinativno središče limfatičnega folikla, P = 0,001; rdeča pulpa, P < 0,001). Večje število celic v proliferaciji je bilo ugotovljeno v germinativnih središčih limfatičnih foliklov in v rdeči pulpi vranice pujskov poskusne skupine (Tabela 20, Slika 17).

Tabela 20: Število celic v proliferaciji na 1000 preštetih celic v vranici pujskov kontrolne in poskusne skupine (5 naključno izbranih vidnih polj, x 400).

Table 20: The number of cells in proliferation of 1000 counted cells in the spleen of piglets from the control and experimental groups (5 randomly selected fields, x 400).

Mesto meritve/ skupina	Število pujskov	Median	Minimum	Maksimum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
gs limfatičnega folikla/ kontrolna	10	65,50	28,0	106,0	52,50	94,25	5,00	0,001
gs limfatičnega folikla/ poskusna	10	140,00	95,0	342,0	104,50	210,25		
rdeča pulpa/ kontrolna	10	29,00	13,0	59,0	14,75	43,25	1,00	<0,001
rdeča pulpa/ poskusna	10	99,00	57,0	272,0	65,75	142,75		

gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)



Slika 17: Imunohistokemičen prikaz proliferacije celic v vranici pujskov. A: germinativno središče limfatičnega folikla/kontrolna skupina; B: rdeča pulpa/kontrolna skupina; C: germinativno središče limfatičnega folikla/poskusna skupina; D: rdeča pulpa/poskusna skupina. Imunohistokemično barvanje z uporabo monoklonskih protiteles Ki-67 (DAKO). Kontrastirano s hematoksilinom, x 400.

Figure 17: Immunohistochemical analysis of cell proliferation in the spleen of piglets. A: germinative center of the lymphatic follicle/control group; B: red pulp/control group; C: germinative center of the lymphatic follicle/experimental group; D: red pulp/experimental group. Immunohistochemical staining using a monoclonal antibodies Ki-67 (DAKO). Contrasted with hematoxylin, x 400.

4.1.4.4 Arealna in numerična gostota

Povprečna arealna in numerična gostota profilov germinativnih središč limfatičnih foliklov v vranici pujskov sta bili statistično značilno večji (AG, P < 0,001; NG, P < 0,001) v poskusni skupini kot v kontrolni skupini (Tabela 21).

Tabela 21: Povprečna arealna in numerična gostota germinativnih središč limfatičnih foliklov v vranici pujskov kontrolne in poskusne skupine (20 naključno izbranih polj, x 40).

Table 21: The average areal and numerical densities of germinal centers of the lymphatic follicles in the spleen of piglets from the control and experimental groups (20 randomly selected fields, x 40).

AG, NG/ skupina	Število pujskov	Median	Minimum	Maximum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
AG gs/ kontrolna	10	15171,25	6448,63	23432,08	7284,16	19916,48	0,0	<0,001
AG gs/ poskusna	10	49761,34	28775,47	1831226,96	39750,68	69479,09		
NG gs/ kontrolna	10	2,55	1,66	4,04	2,28	3,68	0,0	<0,001
NG gs/ poskusna	10	8,03	5,61	9,55	5,87	8,98		

AG – arealna gostota; NG – numerična gostota; gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)

4.2 PLEMENSKE MLADICE

4.2.1 Mezenterialne bezgavke

4.2.1.1 Apoptoza

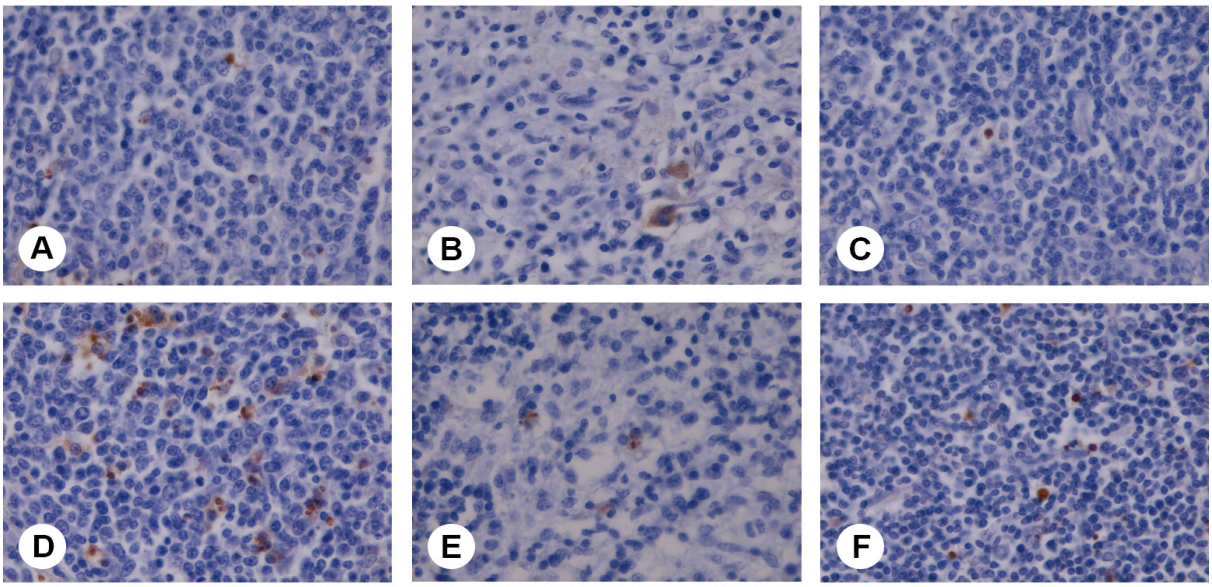
Povprečno število apoptotičnih celic v mezenterialnih bezgavkah mladic je bilo statistično značilno večje (germinativno središče limfatičnega folikla, P<0,001; sredica, P<0,001; interfolikularno področje, P<0,001) v poskusni skupini. Višje povprečno število TUNEL-pozitivnih celic je bilo ugotovljeno v vseh treh delih analiziranih področij mezenterialnih bezgavk poskusne skupine (Tabela 22, Slika 18).

Tabela 22: Povprečno število TUNEL-pozitivnih celic v mezenterialnih bezgavk mladic kontrolne in poskusne skupine (5 naključno izbranih polj, x 400).

Table 22: The average number of total TUNEL-positive cells in the mesenteric lymph nodes of gilts from the control and experimental groups (5 randomly selected fields, x 400).

Mesto meritve/ skupina	Število mladic	Median	Minimum	Maksimum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
gs limfatičnega folikla/ kontrolna	10	11,30	6,00	22,40	7,25	17,85	0,00	<0,001
gs limfatičnega folikla/ poskusna	10	30,30	25,20	44,60	28,70	35,35		
sredica/ kontrolna	10	1,20	0,80	2,20	1,00	1,50	0,00	<0,001
sredica/ poskusna	10	4,40	2,80	6,00	3,75	5,05		
interfolikularno področje/ kontrolna	10	3,60	1,80	5,00	2,10	4,70	0,00	<0,001
interfolikularno področje/ poskusna	10	10,10	6,00	13,20	8,60	12,15		

gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)



Slika 18: Apoptoza celic v mezenterialnih bezgavkah mladic. A: germinativno središče limfatičnega folikla/kontrolna skupina; B: sredica/kontrolna skupina; C: interfolikularno področje/kontrolna skupina; D: germinativno središče limfatičnega folikla/poskusna skupina; E: sredica/poskusna skupina; F: interfolikularno področje/poskusna skupina. Metoda TUNEL, x 400.

Figure 18: Cell apoptosis in the mesenteric lymph nodes of gilts. A: germinative center of lymphatic follicle/control group; B: medulla/control group; C: interfolicullar area/control group; D: germinative center of lymphatic follicle/experimental group; E: medulla/experimental group; F: interfolicullar area/experimental group. TUNEL method, x 400.

4.2.1.2 Makrofagi

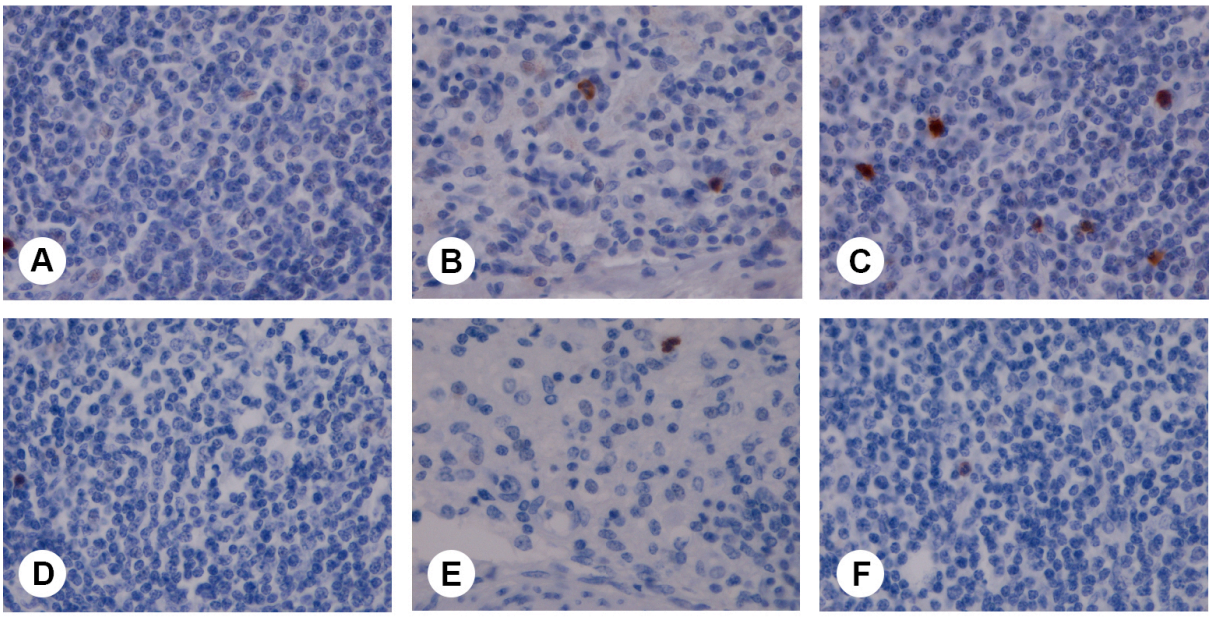
Povprečno število makrofagov v mezenterialnih bezgavkah mladic je bilo v poskusni skupini manjše kot v kontrolni skupini. Razlike v povprečnem številu makrofagov v vseh treh analiziranih področjih mezenterialnih bezgavk so bile med skupinama statistično značilne (germinativno središče limfatičnega folikla P<0,001; sredica, P=0,007; interfolikularno področje, P=0,006) (Tabela 23, Slika 19).

Tabela 23: Povprečno število makrofagov v mezenterialnih bezgavkah mladic kontrolne in poskusne skupine (5 naključno izbranih vidnih polj, x 400).

Table 23: The average number of macrophages in the mesenteric lymph nodes of gilts from the control and experimental groups (5 randomly selected fields, x 400).

Mesto meritve/ skupina	Število mladic	Median	Minimum	Maksimum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
gs limfatičnega folikla/ kontrolna	10	0,60	0,40	1,20	0,40	0,90	4,50	<0,001
gs limfatičnega folikla/ poskusna	10	0,20	0,00	0,40	0,00	0,40		
sredica/ kontrolna	10	2,60	1,60	4,80	2,00	4,05	14,50	0,007
sredica/ poskusna	10	1,70	1,00	2,80	1,40	2,05		
interfolikularno področje/ kontrolna	10	6,30	4,60	14,80	5,10	8,25	14,00	0,006
interfolikularno področje/ poskusna	10	2,60	1,00	10,20	1,55	5,30		

gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)



Slika 19: Imunohistokemičen prikaz makrofagov v mezenterialnih bezgavkah mladic. A: germinativno središče limfatičnega folikla/kontrolna skupina; B: sredica/kontrolna skupina; C: interfolikularno področje/kontrolna skupina; D: germinativno središče limfatičnega folikla/poskusna skupina; E: sredica/ poskusna skupina; F: interfolikularno področje/poskusna skupina. Imunohistokemično barvanje z uporabo monoklonskih protiteles MAC 387 (DAKO). Kontrastirano s hematoksilinom, x 400.

Figure 19: Immunohistochemical analysis of macrophages in the mesenteric lymph nodes of gilts. A: germinative center of lymphatic follicle/control group; B: medulla/control group; C: interfolicullar area/control group; D: germinative center of lymphatic follicle/experimental group; E: medulla/experimental group; F: interfolicullar area/experimental group. Immunohistochemical staining using monoclonal antibodies MAC 387 (DAKO). Contrasted with hematoxylin, x 400.

4.2.1.3 Proliferacijski indeks

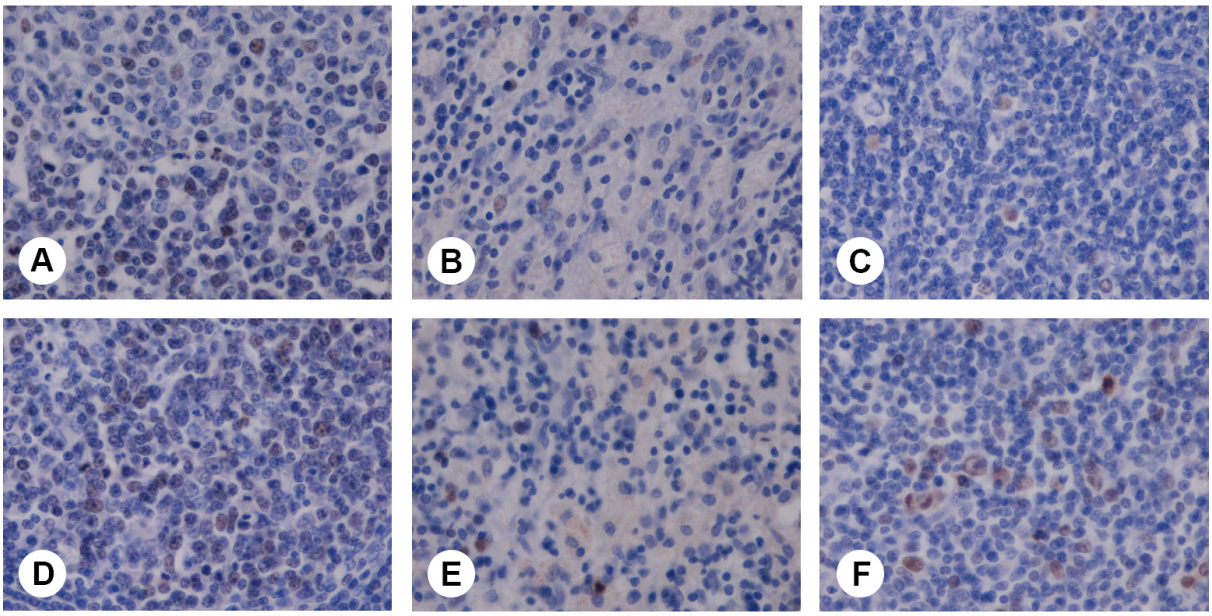
V mezenterialnih bezgavkah mladic poskusne skupine je bil proliferacijski indeks statistično značilno večji kot v kontrolni skupini (germinativno središče limfatičnega folikla, P < 0,001; sredica, P < 0,001; interfolikularno področje, P < 0,001). Večje število celic v proliferaciji je bilo ugotovljeno v vseh treh analiziranih delih mezenterialnih bezgavk poskusne skupine (Tabela 24, Slika 20).

Tabela 24: Število celic v proliferaciji na 1000 preštetih celic v mezenterialnih bezgavkah mladic kontrolne in poskusne skupine (5 naključno izbranih vidnih polj, x 400).

Table 24: The number of cells in proliferation of 1000 counted cells in the mesenteric lymph nodes of gilts from the control and experimental groups (5 randomly selected fields, x 400).

Mesto meritve/ skupina	Število mladic	Median	Minimum	Maksimum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
gs limfatičnega folikla/ kontrolna	10	59,00	48,00	101,00	57,00	70,25	0,00	<0,001
gs limfatičnega folikla/ poskusna	10	155,00	123,00	225,00	147,00	196,00		
sredica/ kontrolna	10	7,00	2,00	10,00	2,75	8,25	0,00	<0,001
sredica/ poskusna	10	20,00	14,00	37,00	17,00	26,75		
interfolikularno področje/ kontrolna	10	17,50	8,00	29,00	10,25	26,25	0,00	<0,001
interfolikularno področje/ poskusna	10	46,50	36,00	70,00	39,00	51,00		

gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)



Slika 20: Imunohistokemičen prikaz proliferacije celic v mezenterialnih bezgavkah mladic. A: germinativno središče limfatičnega folikla/kontrolna skupina; B: sredica/kontrolna skupina; C: interfolikularno področje/kontrolna skupina; D: germinativno središče limfatičnega folikla/poskusna skupina; E: sredica/ poskusna skupina; F: interfolikularno področje/poskusna skupina. Imunohistokemično barvanje z uporabo monoklonskih protiteles Ki-67 (DAKO). Kontrastirano s hematoksilinom, x 400.

Figure 20: Immunohistochemical analysis of cell proliferation in the mesenteric lymph nodes of gilts. A: germinative center of lymphatic follicle/control group; B: medulla/control group; C: interfolicullar area/control group; D: germinative center of lymphatic follicle/experimental group; E: medulla/experimental group; F: interfolicullar area/experimental group. Immunohistochemical staining with a monoclonal antibody against the human Ki-67 antigen (DAKO). Contrasted with hematoxylin, x 400.

4.2.1.4 Arealna in numerična gostota

Povprečna arealna in numerična gostota germinativnih središč limfatičnih foliklov v mezenterialnih bezgavkah mladic se med poskusno in kontrolno skupino nista statistično značilno razlikovali (AG, P = 0,059; NG, P = 0,762) (Tabela 25).

Tabela 25: Povprečna arealna in numerična gostota germinativnih središč limfatičnih foliklov v mezenterialnih bezgavkah mladic kontrolne in poskusne skupine (20 naključno izbranih polj, x 40).

Table 25: The average areal and numerical densities of germinal centers of the lymphatic follicles in the mesenteric lymph nodes of gilts from the control and experimental groups (20 randomly selected fields, x 40).

AG, NG/ skupina	Število mladic	Median	Minimum	Maximum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
AG gs/ kontrolna	10	322113,00	161464,00	490106,00	280540,25	457705,50	25,0	0,059
AG gs/ poskusna	10	272474,50	177695,00	383974,00	246708,00	317310,00		
NG gs/ kontrolna	10	5,75	4,18	7,43	4,86	7,16	46,0	0,762
NG gs/ poskusna	10	6,27	4,87	6,95	5,21	6,64		

AG – arealna gostota; NG – numerična gosota; gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)

4.2.2 Peyerjeve plošče ileuma

4.2.2.1 Apoptoza

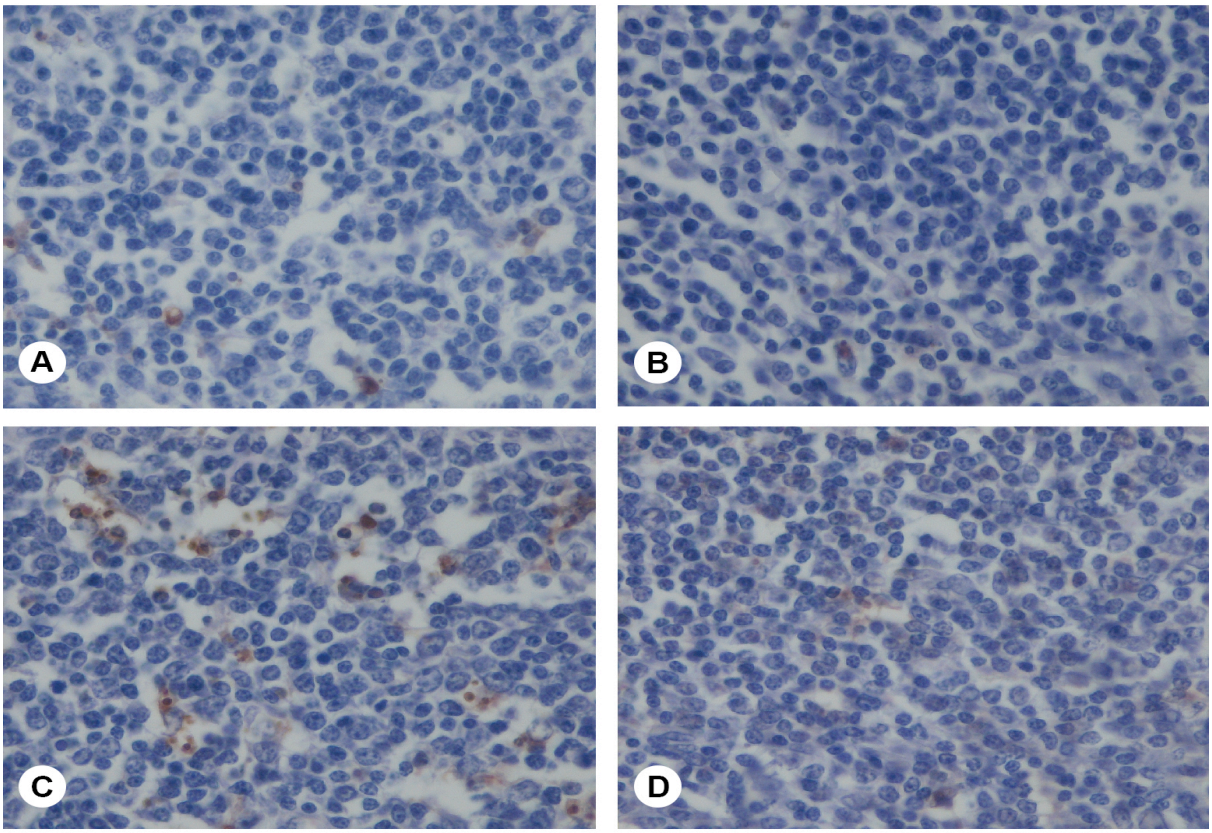
Povprečno število apoptotičnih celic v Peyerjevih ploščah ileuma mladic je bilo statistično značilno večje v poskusni skupini kot v kontrolni skupini (germinativno središče limfatičnega folikla, P < 0,001; področje nad germinativnim sredičem limfatičnega folikla, P < 0,001). Višje povprečno število TUNEL-pozitivnih celic je bilo ugotovljeno v germinativnih središčih limfatičnih foliklov in v področju nad germinativnimi središči limfatičnih foliklov poskusne skupine (Tabela 26, Slika 21).

Tabela 26: Povprečno število TUNEL-pozitivnih celic v Peyerjevih ploščah ileuma mladic kontrolne in poskusne skupine (5 naključno izbranih polj, x 400).

Table 26: The average number of total TUNEL-positive cells in the ileum Peyer's patches of gilts from the control and experimental groups (5 randomly selected fields, x 400).

Mesto meritve/ skupina	Število mladice	Median	Minimum	Maksimum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
gs limfatičnega folikla/ kontrolna	10	4,70	3,60	9,60	4,15	5,80	0,00	<0,001
gs limfatičnega folikla/ poskusna	10	18,30	13,20	25,40	14,10	20,40		
področje nad gs limfatičnega folikla/ kontrolna	10	1,70	0,60	2,40	1,35	2,05	0,00	<0,001
področje nad gs limfatičnega folikla/ poskusna	10	6,60	4,40	10,00	5,80	7,50		

gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)



Slika 21: Apoptoza celic v Peyerjevih ploščah mladic. A: germinativno središče limfatičnega folikla/kontrolna skupina; B: področje nad germinativnim središčem limfatičnega folikla/kontrolna skupina; C: germinativno središče limfatičnega folikla/poskusna skupina; D: področje nad germinativnim središčem limfatičnega folikla/poskusna skupina. Metoda TUNEL, x 400.

Figure 21: Cell apoptosis in the ileum Peyer's patches of gilts. A: germinative center of lymphatic follicle/control group; B: an area above the germinative center of lymphatic follicle/control group; C: germinative center of lymphatic follicle/experimental group; D: an area above the germinative center of lymphatic follicle/experimental group. TUNEL method, x 400.

4.2.2.2 Makrofagi

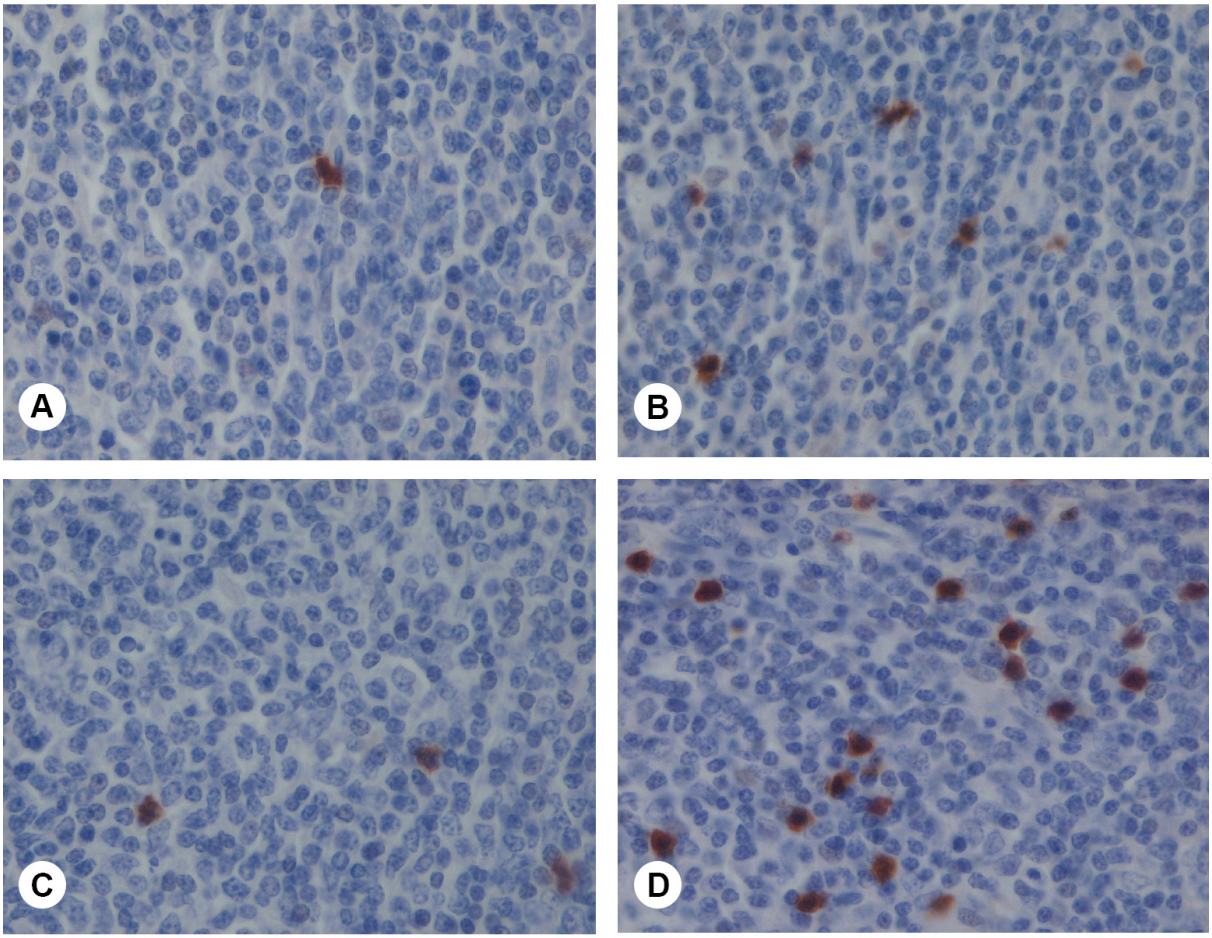
Povprečno število makrofagov v Peyerjevih ploščah ileuma mladic je bilo v poskusni skupini statistično značilno večje v germinativnih središčih limfatičnih foliklov (P = 0,011) in v področju nad germinativnimi središči limfatičnih foliklov Peyerjevih plošč (P < 0,001) v primerjavi s kontrolno skupino (Tabela 27, Slika 22).

Tabela 27: Povprečno število makrofagov v Peyerjevih ploščah ileuma mladic kontrolne in poskusne skupine (5 naključno izbranih vidnih polj, x 400).

Table 27: The average number of macrophages in the ileum Peyer's patches of gilts from the control and experimental groups (5 randomly selected fields, x 400).

Mesto meritve/ skupina	Število mladic	Median	Minimum	Maksimum	kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
gs limfatičnega folikla/ kontrolna	10	1,00	0,60	2,40	0,80	1,90	16,50	0,011
gs limfatičnega folikla/ poskusna	10	2,00	1,40	3,00	1,70	2,45		
področje nad gs limfatičnega folikla/ kontrolna	10	3,50	1,00	8,20	2,20	6,10	2,00	<0,001
področje nad gs limfatičnega folikla/ poskusna	10	14,80	6,60	18,20	9,00	16,25		

gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)



Slika 22: Imunohistokemičen prikaz makrofagov v Peyerjevih ploščah ileuma mladic. A: germinativno središče limfatičnega folikla/kontrolna skupina; B: področje nad germinativnim središčem limfatičnega folikla/kontrolna skupina; C: germinativno središče limfatičnega folikla/poskusna skupina; D: področje nad germinativnim središčem limfatičnega folikla/poskusna skupina. Imunohistokemično barvanje z uporabo monoklonskih protiteles MAC 387 (DAKO). Kontrastirano s hematoksilinom, x 400.

Figure 22: Immunohistochemical analysis of macrophages in ileum Peyer's patches of gilts. A: germinative center of lymphatic follicle/control group; B: an area above the germinative center of lymphatic follicle/control group; C: germinative center of lymphatic follicle/experimental group; D: an area above the germinative center of lymphatic follicle/experimental group. Immunohistochemical staining using monoclonal antibodies MAC 387 (DAKO). Contrasted with hematoxylin, x 400.

4.2.2.3 Proliferacijski indeks

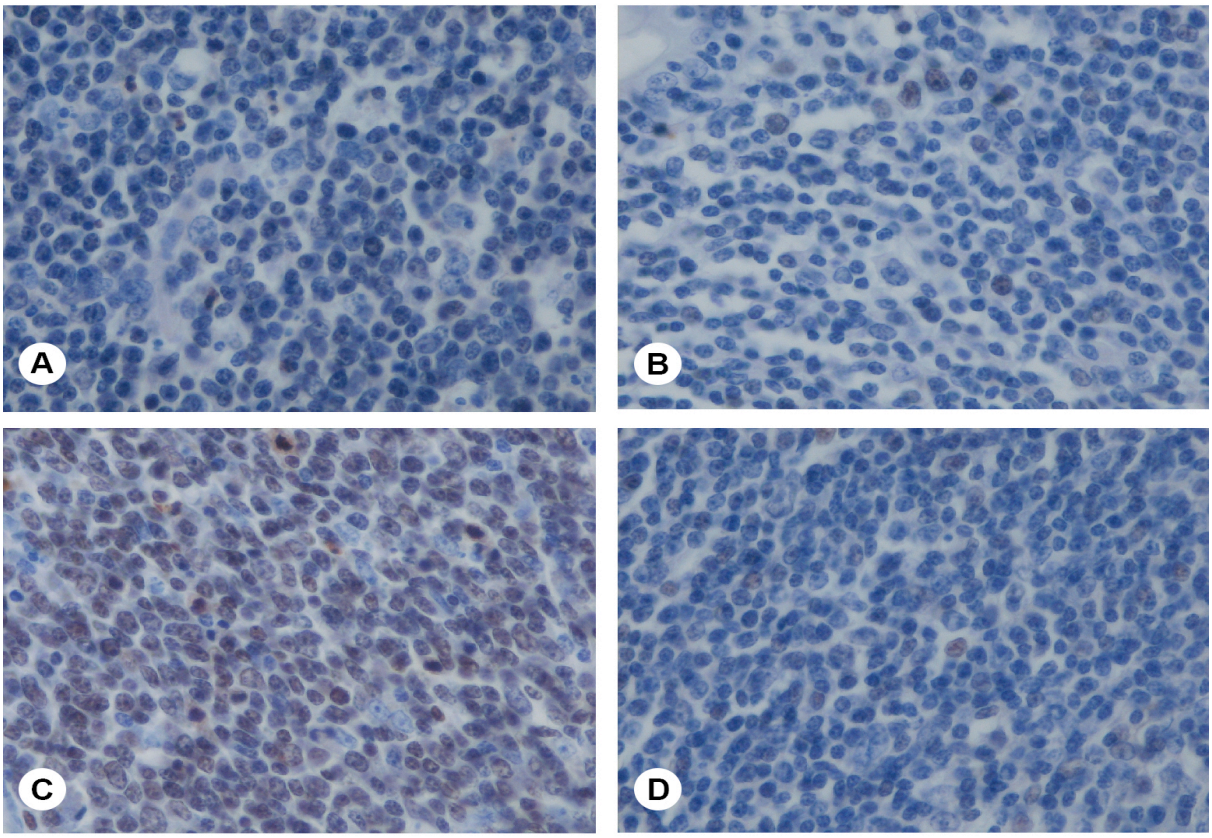
V Peyerjevih ploščah ileuma mladic poskusne skupine je bil proliferacijski indeks statistično značilno višji kot v kontrolni skupini. Večje število celic v proliferaciji je bilo ugotovljeno v germinativnih središčih limfatičnih foliklov (P < 0,001) in v področjih nad germinativnimi središči limfatičnih foliklov (P = 0,001) Peyerjevih plošč poskusne skupine (Tabela 28, Slika 23).

Tabela 28: Število celic v proliferaciji na 1000 preštetih celic v Peyerjevih ploščah ileuma mladic kontrolne in poskusne skupine (5 naključno izbranih vidnih polj, x 400).

Table 28: The number of cells in proliferation of 1000 counted cells in the ileum Peyer's patches of gilts from the control and experimental groups (5 randomly selected fields, x 400).

Mesto meritve/ skupina	Število mladic	Median	Minimum	Maksimum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
gs limfatičnega folikla/ kontrolna	10	30,50	13,00	47,00	23,00	40,25	0,00	<0,001
gs limfatičnega folikla/ poskusna	10	118,00	97,00	164,00	108,00	132,00		
področje nad gs limfatičnega folikla/ kontrolna	10	13,50	5,00	34,00	9,50	28,00	4,00	0,001
področje nad gs limfatičnega folikla/ poskusna	10	36,50	30,00	56,00	32,75	51,00		

gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)



Slika 23: Imunohistokemičen prikaz proliferacije celic v Peyerjevih ploščah ileuma mladic. A: germinativno središče limfatičnega folikla/kontrolna skupina; B: področje nad germinativnim središčem limfatičnega folikla/kontrolna skupina; C: germinativno središče limfatičnega folikla/poskusna skupina; D: področje nad germinativnim središčem limfatičnega folikla/poskusna skupina. Imunohistokemično barvanje z uporabo monoklonskih protiteles Ki-67 (DAKO). Kontrastirano s hematoksilinom, x 400.

Figure 23: Immunohistochemical analysis of cell proliferation in ileum Peyer's patches of gilts. A: germinative center of lymphatic follicle/control group; B: an area above the germinative center of lymphatic follicle/control group; C: germinative center of lymphatic follicle/experimental group; D: an area above the germinative center of lymphatic follicle/experimental group. Immunohistochemical staining using a monoclonal antibodies Ki-67 (DAKO). Contrasted with hematoxylin, x 400.

4.2.2.4 Limfociti T

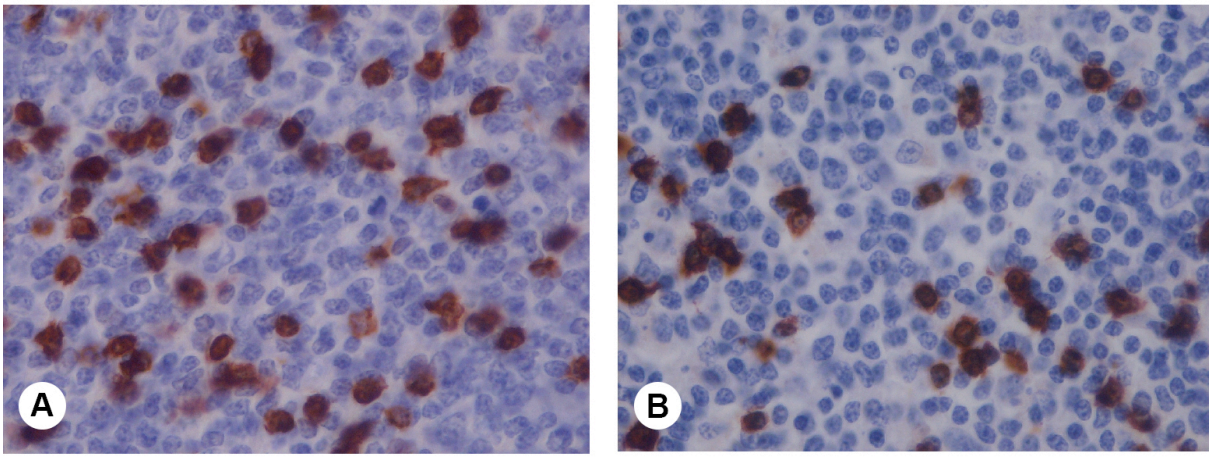
Povprečno število limfocitov T v germinativnih središčih limfatičnih foliklov Peyerjevih plošč mladic je bilo statistično značilno manjše (P = 0,004) v poskusni skupini (Tabela 29, Slika 24).

Tabela 29: Povprečno število limfocitov T v Peyerjevih ploščah ileuma mladic kontrolne in poskusne skupine (5 naključno izbranih vidnih polj, x 400).

Table 29: The average number of lymphocytes T in the ileum Peyer's patches of gilts from the control and experimental groups (5 randomly selected fields, x 400).

Mesto meritve/ skupina	Število mladic	Median	Minimum	Maksimum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
gs limfatičnega folikla/ kontrolna	10	58,00	46,00	61,40	50,95	60,45	12,00	0,004
gs limfatičnega folikla/ poskusna	10	45,90	42,60	57,60	43,15	51,65		

gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)



Slika 24: Imunohistokemičen prikaz limfocitov T v Peyerjevih ploščah ileuma mladic. A: germinativno središče limfatičnega folikla/kontrolna skupina; B: germinativno središče limfatičnega folikla/poskusna skupina. Imunohistokemično barvanje z uporabo poliklonskih protiteles CD 3 (DAKO). Kontrastirano s hematoksilinom, x 400.

Figure 24: Immunohistochemical analysis of lymphocytes T in ileum Peyer's patches of gilts. A: germinative center of lymphatic follicle/control group; B: germinative center of lymphatic follicle/experimental group. Immunohistochemical staining using policlonal antibodies CD3 (DAKO). Contrasted with hematoxylin, x 400.

4.2.2.5 Arealna in numerična gostota

Povprečna arealna in numerična gostota germinativnih središč limfatičnih foliklov v Peyerjevih ploščah mladic sta bili statistično značilno večji (AG, P < 0,001; NG, P = 0,010) v poskusni skupini, če jih primerjamo s kontrolno skupino (Tabela 30).

Tabela 30: Povprečna arealna in numerična gostota germinativnih središč limfatičnih foliklov v Peyerjevih ploščah ileuma mladic kontrolne in poskusne skupine (20 naključno izbranih polj, x 40).

Table 30: The average areal and numerical densities of germinal centers of the lymphatic follicles in the ileum Peyer's patches of gilts from the control and experimental groups (20 randomly selected fields, x 40).

AG, NG/ skupina	Število mladic	Median	Minimum	Maximum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
AG gs/ kontrolna	10	553463,50	316900,00	676367,00	410682,75	625634,25	1,0	<0,001
AG gs/ poskusna	10	744254,50	671967,00	83378465,00	707094,75	880321,00		
NG gs/ kontrolna	10	3,07	0,00	3,70	2,53	3,44	16,0	0,010
NG gs/ poskusna	10	4,07	2,40	681,60	3,31	4,48		

AG – arealna gostota; NG – numerična gostota; gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)

4.2.3 Vranica

4.2.3.1 Apoptoza

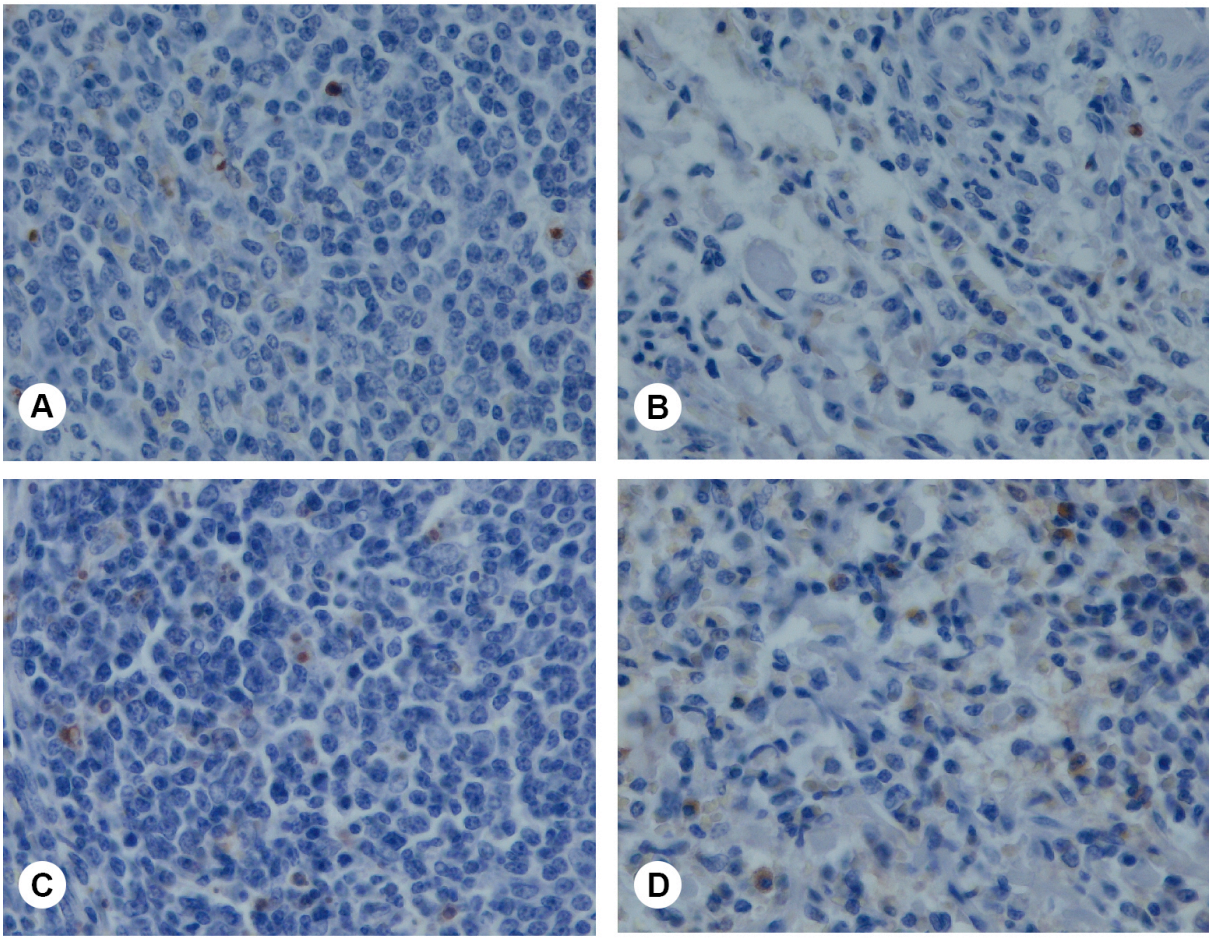
Povprečno število apoptotičnih celic v vranici mladic je bilo statistično večje v poskusni skupini kot v kontrolni skupini (germinativno središče limfatičnega folikla, P < 0,001; rdeča pulpa, P < 0,001). Višje povprečno število TUNEL-pozitivnih celic je bilo ugotovljeno v germinativnih središčih limfatičnih foliklov in v rdeči pulpi vranice poskusne skupine (Tabela 31, Slika 25).

Tabela 31: Povprečno število TUNEL-pozitivnih celic v vranici mladic kontrolne in poskusne skupine (5 naključno izbranih polj, x 400).

Table 31: The average number of TUNEL-positive cells in the spleen of gilts from the control and experimental groups (5 randomly selected fields, x 400).

Mesto meritve/ skupina	Število mladic	Median	Minimum	Maksimum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
gs limfatičnega folikla/ kontrolna	10	8,50	5,60	14,60	6,40	13,05	0,00	<0,001
gs limfatičnega folikla/ poskusna	10	19,70	16,40	29,40	17,50	24,25		
rdeča pulpa/ kontrolna	10	2,70	1,00	5,40	2,35	3,10	2,00	<0,001
rdeča pulpa/ poskusna	10	6,60	4,40	11,20	5,60	9,25		

gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)



Slika 25: Apoptoza celic v vranici mladic. A: germinativno središče limfatičnega folikla/kontrolna skupina; B: rdeča pulpa/kontrolna skupina; C: germinativno središče limfatičnega folikla/poskusna skupina; D: rdeča pulpa/poskusna skupina. Metoda TUNEL, x 400.

Figure 25: Cell apoptosis in the spleen of gilts. A: germinative center of the lymphatic follicle/control group; B: red pulp/control group; C: germinative center of the lymphatic follicle/experimental group; D: red pulp/experimental group. TUNEL method, x 400.

4.2.3.2 Makrofagi

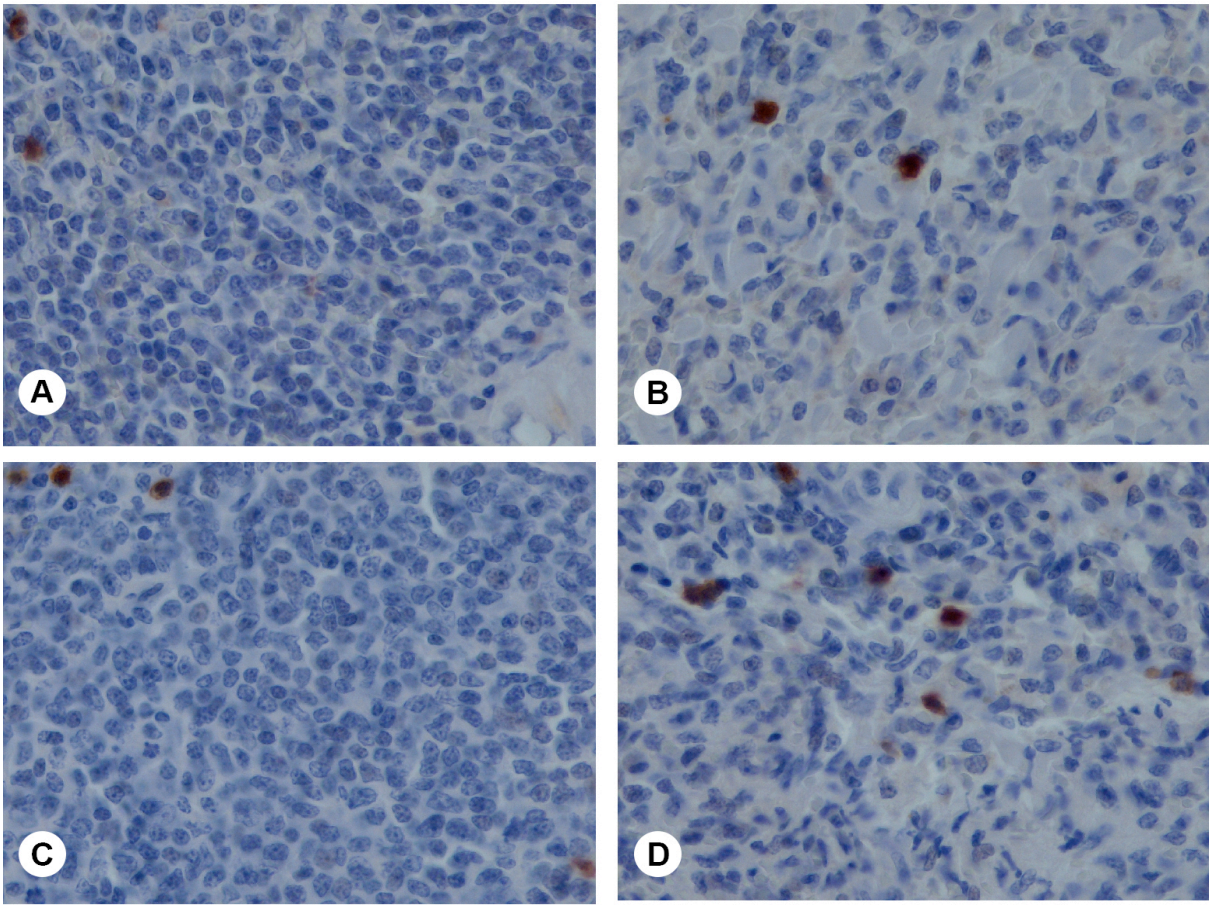
Povprečno število makrofagov v vranici mladic je bilo v poskusni skupini statistično značilno večje v primerjavi s kontrolno skupino, in sicer v germinativnih središčih limfatičnih foliklov (P < 0,001) in v rdeči pulpi (P < 0,001) (Tabela 32, Slika 26).

Tabela 32: Povprečno število makrofagov v vranici mladic kontrolne in poskusne skupine (5 naključno izbranih vidnih polj, x 400).

Table 32: The average number of macrophages of gilts from the control and experimental group (5 randomly selected fields, x 400).

Mesto meritve/ skupina	Število mladic	Median	Minimum	Maksimum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
gs limfatičnega folikla/ kontrolna	10	1,00	0,80	2,00	0,95	1,65	0,00	<0,001
gs limfatičnega folikla/ poskusna	10	2,50	2,20	3,00	2,35	2,65		
rdeča pulpa/ kontrolna	10	2,40	1,60	3,00	1,80	2,85	0,00	<0,001
rdeča pulpa/ poskusna	10	4,80	4,00	6,20	4,35	5,30		

gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)



Slika 26: Imunohistokemičen prikaz makrofagov v vranici mladic. A: germinativno središče limfatičnega folikla/kontrolna skupina; B: rdeča pulpa/kontrolna skupina; C: germinativno središče limfatičnega folikla/poskusna skupina; D: rdeča pulpa/poskusna skupina. Imunohistokemično barvanje z uporabo monoklonskih protiteles MAC 387 (DAKO). Kontrastirano s hematoksilinom, x 400.

Figure 26**:** Immunohistochemical analysis of macrophages in the spleen of gilts. A: germinative center of the lymphatic follicle/control group; B: red pulp/control group; C: germinative center of the lymphatic follicle/experimental group; D: red pulp/experimental group. Immunohistochemical staining using monoclonal antibodies MAC 387 (DAKO). Contrasted with hematoxylin, x 400.

4.2.3.3 Proliferacijski indeks

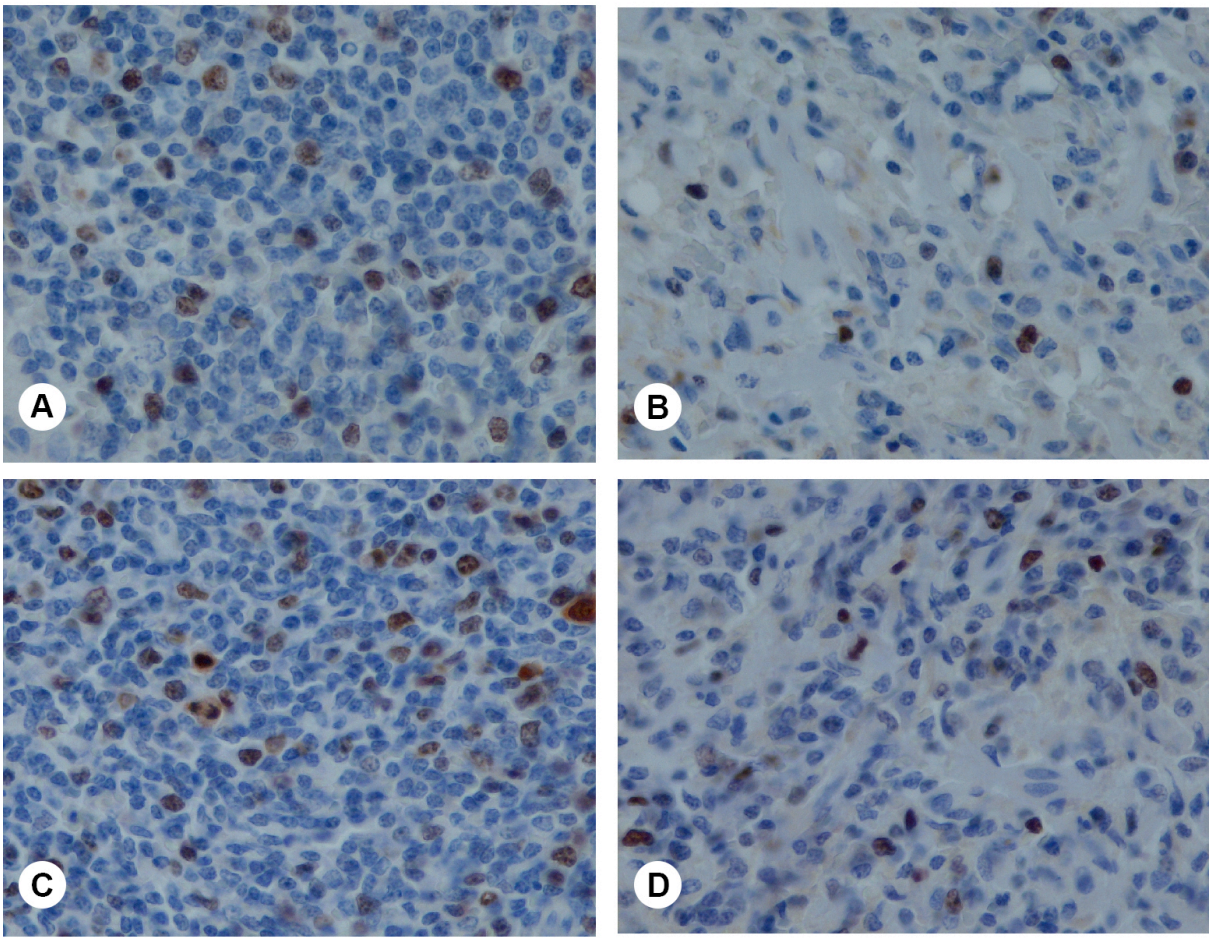
Proliferacijski indeks je bil statistično značilno večjipri mladicah v poskusni skupini, in sicer v germinativnih središčih limfatičnih foliklov (P < 0,001) in v rdeči pulpi (P < 0 ,001) vranice (Tabela 33, Slika 27).

Tabela 33: Število celic v proliferaciji na 1000 preštetih celic v vranici mladic kontrolne in poskusne skupine (5 naključno izbranih vidnih polj, x 400).

Table 33: The number of cells in proliferation of 1000 counted cells in the spleen of gilts from the control and experimental groups (5 randomly selected fields, x 400).

Mesto meritve/ skupina	Število mladic	Median	Minimum	Maksimum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
gs limfatičnega folikla/ kontrolna	10	85,00	65,00	112,00	69,75	95,75	0,00	<0,001
gs limfatičnega folikla/ poskusna	10	158,00	115,00	202,00	133,25	183,25		
rdeča pulpa/ kontrolna	10	40,00	20,00	58,00	25,50	49,00	0,00	<0,001
rdeča pulpa/ poskusna	10	101,00	80,00	145,00	90,50	116,25		

gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)



Slika 27: Imunohistokemičen prikaz proliferacije celic v vranivi mladic. A: germinativno središče limfatičnega folikla/kontrolna skupina; B: rdeča pulpa/kontrolna skupina; C: germinativno središče limfatičnega folikla/poskusna skupina; D: rdeča pulpa/poskusna skupina. Imunohistokemično barvanje z uporabo monoklonskih protiteles Ki-67 (DAKO). Kontrastirano s hematoksilinom, x 400.

Figure 27: Immunohistochemical analysis of cell proliferation in the spleen of gilts. A: germinative center of the lymphatic follicle/control group; B: red pulp/control group; C: germinative center of the lymphatic follicle/experimental group; D: red pulp/experimental group. Immunohistochemical staining using a monoclonal antibodies Ki-67 (DAKO). Contrasted with hematoxylin, x 400.

4.2.3.4 Arealna in numerična gostota

V vranici mladic sta bili povprečna arealna in numerična gostota germinativnih središč limfatičnih foliklov statistično značilno večji (AG, P = 0,008; NG, P = 0,004) v poskusni skupini kot v kontrolni skupini (Tabela 34).

Tabela 34: Povprečna arealna in numerična gostota germinativnih središč limfatičnih foliklov v vranici mladic kontrolne in poskusne skupine (20 naključno izbranih polj, x 40).

Table 34: The average areal and numerical densities of the germinal centers of the lymphatic follicles in the spleen of gilts from the control and experimental groups (20 randomly selected fields, x 40).

AG, NG/ skupina	Število mladic	Median	Minimum	Maximum	Kvartili		Mann-Whitney U	P
					25	75		
AG gs/ kontrolna	10	44867,01	29355,34	1,473407,09	34599,39	70581,96	15,0	0,008
AG gs/ poskusna	10	96054,19	50163,47	1911302,13	70293,61	586652,71		
NG gs/ kontrolna	10	2,66	1,41	3,49	2,25	3,10	12,0	0,004
NG gs/ poskusna	10	4,05	0,37	5,12	3,46	4,36		

AG – arealna gostota; NG – numerična gostota; gs – germinativno središče; P - statistična značilnost (P < 0,05)

4.3 POVZETEK REZULTATOV

V Tabeli 35 so predstavljeni povzetki rezultatov raziskave o elementih imunskega sistema v limfatičnih organih mladic, ki so konzumirale krmo z mikotoksinom DON, in njihovih teden dni starih pujskov (Tabela 35).

Tabela 35: Povzetek rezultatov morfometričnih meritev v vzorcih limfatičnih organov pri pujskih in mladicah, z označeno statistično značilno razliko med poskusno in kontrolno skupino.

Table 35: Summary of the results of morphometric measurements in samples of lymphatic organs in piglets and gilts with marked statistically significant difference between the experimental and control group.

Organ	Test	Pujski (kon/pos)			Mladice (kon/pos)		
Timus	Apoptoza	**sk**	**sr**		/		
	Makrofagi	sk	sr		/		
	Proliferacija	**sk**	**sr**		/		
	Razmerje	**sk**	**sr**		/		
Bezgavke	Apoptoza	gs	sr	if	**gs**	**sr**	**if**
	Makrofagi	**gs**	**sr**	if	**gs**	**sr**	**if**
	Proliferacija	gs	**sr**	**if**	**gs**	**sr**	**if**
	AG	**gs**			gs		
	NG	**gs**			gs		
Peyerjeve plošče	Apoptoza	gs	ngs		**gs**	**ngs**	
	Makrofagi	gs	ngs		**gs**	**ngs**	
	Proliferacija	**gs**	**ngs**		**gs**	**ngs**	
	Limfociti T	gs			**gs**		
	AG	**gs**			**gs**		
	NG	gs			**gs**		
Vranica	Apoptoza	**gs**	**rp**		**gs**	**rp**	
	Makrofagi	**gs**	**rp**		**gs**	**rp**	
	Proliferacija	**gs**	**rp**		**gs**	**rp**	
	AG	**gs**			**gs**		
	NG	**gs**			**gs**		

AG – arealna gostota; NG – numerična gostota; gs – germinativno središče; ngs – nad germinativnim središčem; sk – skorja; sr – sredica; if – interfolikularno; rp – rdeča pulpa; kon/pos – kontrolna/poskusna skupina; statistično značilno **večje** oziroma statistično značilno **manjše** v poskusni v primerjavi s kontrolno skupino

4.4 KORELACIJA MED KRMO IN OPAZOVANIMI SPREMENLJIVKAMI

Od začetka poskusa do poroda je bila dnevna poraba krme v poskusni skupini mladic 2,9 ± 0,3 kg in v kontrolni 3,4 ± 01 kg (P = 0,02). Med laktacijo so mladice v poskusni skupini zaužile 4,1 ± 0,6 kg oziroma 4,7 ± 0,5 kg v kontrolni (P = 0,027), od odstavitve do osemenitve pa 2,6 ± 0,4 oziroma 3,4 ± 0,2 kg krme (P < 0,001). Torej so mladice v poskusni skupini med poskusom konzumirale v povprečju statistično značilno manj krme kot mladice v kontrolni skupini.

S Spearmanovim koeficientom korelacije smo preverili, ali med opazovanimi spremenljivkami (konzumacija krme in spremenljivkami - apoptoza, proliferacija, makrofagi, limfociti T, arealna in numerična gostota) obstaja statistično značilna povezanost. Za vsak par spremenljivk smo izračunali koeficient korelacije (R) in statistično značilnost (P). Če je P manjši od 0,05, potem obstaja povezanost med spremenljivkama, drugače pa ne. Pozitiven R pomeni, da se vrednosti ene in druge spremenljivke spreminjata v isto smer, če je negativen, se spreminja v nasprotno. Iz rezultatov je razvidno, da konzumacija krme ni imela statistično značilnega vpliva na preiskovane parametre v limfatičnih organih mladic in njihovih sesnih pujskov. Rezultati so predstavljeni v Tabeli 36.

Tabela 36: Prikaz korelacije med opazovanimi spremenljivkami in konzumacijo krme pri mladicah in njihovih pujskih.

Table 36: The correlation among the observed variables and feed consumption of gilts and their piglets.

	Pujski		**Mladice**	
Limfatični organ/ mesto	**Krma**		**Krma**	
meritve/ vrsta meritve	**R**	**P**	**R**	**P**
Timus				
skorja/apoptoza	0,343	0,366	/	/
sredica/apoptoza	0,089	0,821	/	/
skorja/razmerje	0,008	0,983	/	/
sredica/razmerje	-0,008	0,983	/	/
skorja/makrofagi	0,184	0,635	/	/
sredica/makrofagi	-0,168	0,666	/	/
skorja/proliferacija	-0,142	0,715	/	/
sredica/proliferacija	0,034	0,932	/	/

Mezenterialne bezgavke				
gs limfatičnega folikla/apoptoza	-0,405	0,320	0,075	0,847
sredica/apoptoza	0,119	0,779	0,013	0,974
interfolikularna področja/apoptoza	0,252	0,548	0,084	0,829
gs limfatičnega folikla/makrofagi	0,282	0,498	-0,022	0,954
sredica/makrofagi	0,357	0,385	-0,763	0,017
interfolikularna področja/makrofagi	-0,096	0,821	-0,485	0,186
gs limfatičnega folikla /proliferacija	-0,335	0,417	-0,424	0,255
sredica/proliferacija	-0,012	0,978	-0,153	0,694
interfolikularna področja/proliferacija	-0,240	0,568	-0,487	0,183
bezgavke/AG gs	-0,238	0,570	-0,452	0,222
bezgavke/NG gs	-0,190	0,651	0,042	0,915
Peyerjeve plošče				
gs/apoptoza	-0,151	0,698	0,494	0,177
ngs/apoptoza	0,513	0,158	-0,097	0,805
gs/makrofagi	-0,485	0,185	-0,038	0,923
ngs/makrofagi	-0,234	0,544	0,008	0,983
gs/proliferacija	-0,042	0,915	-0,276	0,472
ngs/proliferacija	0,210	0,587	-0,508	0,162
gs/limfociti T (CD3)	-0,386	0,305	0,276	0,472
Peyerjeve plošče/AG gs	-0,008	0,983	-0,176	0,651
Peyerjeve plošče/NG gs	-0,226	0,559	-0,268	0,486
Vranica				
gs/apoptoza	0,695	0,038	0,218	0,574
pulpa/apoptoza	0,874	0,002	-0,311	0,415
gs/makrofagi	-0,343	0,366	-0,305	0,425
pulpa/makrofagi	-0,273	0,477	-0,732	0,025
gs/proliferacija	0,611	0,081	0,025	0,949
pulpa/proliferacija	0,494	0,177	0,134	0,730
vranica/AG gs	-0,050	0,898	0,201	0,604
vranica/NG gs	-0,594	0,092	0,351	0,354

gs – germinativno središče; ngs – nad germinativnim središčem; AG – arealna gostota; NG – numerična gostota; R – korelacijski koeficient; P - statistična značilnost ($P < 0,05$)

5 RAZPRAVA

Z morfometričnimi analizami in imunohistokemičnimi barvanji tkivnih rezin limfatičnih organov mladic in njihovih teden dni starih pujskov smo ugotovili, da ima krma, naravno kontaminirana z DON v koncentraciji 5,08 mg/kg, vpliv na zgradbo limfatičnih organov in tudi na število celic v apoptozi, v proliferaciji, na število makrofagov in limfocitov T. Preučevali smo kar 64 parametrov. V 49 primerih smo z uporabo neparametričnega testa (Mann-Whitney U) ugotovili statistično značilne razlike med kontrolno in poskusno skupino ($P < 0,05$). Dokazali smo, da obstaja pri mladicah in pujskih statistično značilna razlika med kontrolno in poskusno skupino v številu in velikosti germinativnih središč limfatičnih foliklov (v Peyerjevih ploščah ileuma, mezenterialnih bezgavkah in vranici) ter v razmerju površine med skorjo in sredico timusa pri pujskih. V omenjenih limfatičnih organih mladic in pujskov smo dokazali tudi, da obstaja statistično značilna razlika med kontrolno in poskusno skupino v številu celic v apoptozi in proliferaciji, v številu makrofagov in limfocitov T.

Glede na dostopne opise raziskav na celičnih linijah in v živalskih modelih je bilo ugotovljeno, da izpostavljenost nizkim dozam DON poveča izražanje genov za citokine in kemokine ter tako modificira imunski odziv. Visoke doze DON povzročajo višji nivo apoptoze pri levkocitih, kar vodi v potencialno imunosupresivno delovanje (Pestka in sod., 2004). Koncentracijo 5,08 mg/kg DON, ki se je nahajala v krmi za našo poskusno skupino živali, lahko štejemo k visokim koncentracijam glede na to, da je največja še priporočena koncentracija v krmi za prašiče 1 mg/kg. Dejstvo, da DON lahko deluje stimulativno ali zaviralno na imunski odziv, včasih celo ob isti koncentraciji, predstavlja na videz nerešljivo protislovje, ki pa ga moramo vseeno gledati kritično, saj raziskovalci, ki so proučevali fenomen, niso vedno uporabljali iste metodike dela in tudi ne enakih modelov raziskave. Celice imunskega sistema, makrofagi, limfociti B in T so lahko tarče delovanja DON. Na rezultate raziskav torej vpliva zaužita doza toksina, pogostnost in čas zauživanja ter časovna točka, v kateri je bilo opravljeno vzorčenje oziroma je bila opravljena raziskava imunoloških parametrov, nenazadnje tudi sama zasnova ter metodologija raziskave in genetika tarčnih organizmov. Različni avtorji so tako preučevali molekularne povezave med mitogensko aktiviranimi protein kinazami (MAPK) in DON, med izražanjem genov za citokine in DON itd. (Pestka in sod., 2004). Rezultati raziskav so pogosto nasprotni in pomanjkljivi, zato smo

želeli v našem delu raziskati vpliv DON na limfatične organe mladic in njihovih teden dni starih sesnih pujskov. Ravno prašiči so med živalskimi vrstami najobčutljivejša vrsta, na kateri so ugotavljali učinke DON. Značilno klinično znamenje pri zauživanju krme z DON nad koncentracijo 0,9 mg/kg krme je manjša ješčnost prašičev, zaradi česar ti slabše priraščajo. Tako so poskusi z DON v prašičjem modelu pomembni predvsem zaradi dveh razlogov. Prašiči so pomemben vir hrane za človeka, zato manjše zauživanje krme, ki vsebuje DON, povzroča veliko gospodarsko škodo, na drugi strani pa so prašiči fiziološko podobni ljudem, torej so lahko pomemben model za biomedicinske raziskave pri različnih bolezenskih stanjih ljudi. Obstaja namreč verjetnost, da DON povzroča pri prašičih in ljudeh zelo podobne učinke, tako da z raziskavami, opravljenimi na prašičih, lahko sklepamo na morebitne podobne učinke tudi pri ljudeh (Pestka, 2010a; Pestka, 2010b).

O učinkih DON na imunski sistem prašičev je v splošnem malo znanega. Podatki kažejo, da DON povzroči slabši imunski odziv na cepivo, poveča ali zmanjša proliferativno sposobnost limfocitov na mitogene, kot sta fitohemaglutinin (PHA) ali konkanavalin A (Con-A), lahko vpliva na dendritične celice (npr. zmanjša njihovo endocitozno aktivnost) (Goyarts in sod., 2006; Bimczok in sod., 2007; Pinton in sod., 2008). DON med drugim vpliva tudi na povečanje mase jeter, lahko zmanjša koncentracijo serumskih albuminov in globulinov (Goyarts in sod., 2006; Pinton in sod., 2008).

Število raziskav, v katerih so preučevali učinke krme, kontaminirane z DON, na prvič brejih mladicah, ni veliko. Mladice in njihovi sesni pujski v prvem tednu starosti so še posebej občutljiva kategorija prašičev (Jakovac-Strajn in sod. 2009; Malovrh and Jakovac-Strajn 2010). V nekaterih raziskavah ugotavljajo zmanjšano ješčnost živali, vendar pri tem niso dokazali vpliva na embrionalno smrtnost (Friend in sod., 1983). V drugih podobnih raziskavah sploh niso potrdili vpliva DON na ješčnost, prav tako pri tem ni bilo dokazanihznačilnih razlik v številu novorojenih in odstavljenih pujskov (Chavez, 1984; Friend in sod., 1986). Diaz-Llano in Smith (2006, 2007) sta ugotovila, da krmljenje brejih mladic in mladic v laktaciji s 5,5 mg/kg DON, 0,5 mg/kg 15 acetil-DON in 0,3 mg/kg zearalenona poveča število mrtvorojenih pujskov, vendar pri tem ni bilo dokazanega vpliva na maso pujskov ob odstavitvi in na njihovo smrtnost med laktacijo. Če pogledamo rezultate naših raziskav, so mladice v poskusni skupini konzumirale statistično značilno manj krme v

primerjavi z mladicami v kontrolni skupini. Konzumacija krme pri tem ni imela statistično značilnega vpliva na preiskovane parametre v limfatičnih organih mladic in njihovih sesnih pujskov. V našem poskusu smo mladice žrtvovali pet do osem dni po odstavitvi pujskov, prav tako smo v prvem tednu starosti žrtvovali po enega klinično zdravega pujska iz vsakega gnezda. Izpostaviti moramo, da v raziskavi ob pregledu pujskov nismo opazili nobenih klinično zaznavnih sprememb pri živalih iz poskusne kot tudi ne iz kontrolne skupine. Ta ugotovitev je namreč pomembna za prašičerejce, ki ravno tako ne opazijo kliničnih sprememb pri svojih živalih in se zaradi tega dejstva verjetno ne zavedajo možnosti vpliva DON, na imunski sistem, kar lahko vodi v večjo občutljivost za nalezljive bolezni. Število odstavljenih pujskov in njihova telesna masa ob odstavitvi, ki sta sicer pomembna reprodukcijska parametra, sta bila namreč enaka tudi v našem poskusu pri obeh skupinah (Jakovac-Strajn, 2008). Takšne ugotovitve sicer niso presenetljive, saj je dobro znano, da so učinki DON, razen v akutnih primerih, težko zaznavni (Pestka, 2010a).

Posledice na pujskih, če njihove matere med brejostjo konzumirajo krmo z DON, so lahko neposredne zaradi transplacentarnega prenosa toksina v razvijajoče se pujske ali posredne zaradi manjše ješčnosti svinj. Zato dobijo ti manj energije, kar se lahko odraža na različne načine (Dänicke in sod., 2007). Kakovost mleka pri zauživanju DON se sicer ne spreminja (Diaz-Llano in Smith, 2007), poleg tega se DON izloča v mleku le v sledovih, <2 µg/kg (Friend in sod., 1986). Goyarts in sod. (2007, 2010) so ugotovili, da je razvijajoči se plod od 35. do 70. dne ali od 63. do 70. dne gestacije izpostavljen DON, ZEN in njihovim presnovkom, če breja svinja konzumira krmo, kontaminirano s *Fusarium* toksini. Ugotovili so tudi, da DON in de-epoksi-DON v precejšnji meri prehajata skozi placento. Kljub temu krma, kontaminirana s *Fusarium* toksini, brejim svinjam v tem poskusu ni povzročila škodljivih učinkov na uspešnost reprodukcije, na maso organov (srce, vranica, ledvica) ali na vzdrževanju brejosti in tudi ne na maso in dolžino ploda. Poleg tega ni bilo opaziti nobenih teratogenih ali letalnih učinkov na zarodke (Goyarts in sod., 2007; Goyarts in sod., 2010) in nobenih makroskopskih ali histoloških sprememb v organih (srce, vranica, ledvica, jetra) zarodkov. Dokazali pa so povečano vsebnost glikogena in spremembe v arhitekturi mitohondrijev v hepatocitih ploda, kar naj bi bila po njihovem mnenju posledica toksinov, ki jih je svinja vnesla s krmo in so preko placente prešli na plod (Tiemann in sod., 2008). Goyarts in sod. (2010) so v krvni plazmi plodu ugotovili DON (0-5 ng/mL oziroma 1,4-7

ng/mL, odvisno od uporabljene analitične metode) in različno razmerje belih krvnih celic: nižji delež monocitov in nevtrofilcev ter višji delež limfocitov. To je lahko posledica neposrednega učinka DON na imunske celice in njihovo različno občutljivost na DON (Goyarts in sod., 2010). Jakovac-Strajn (2008) pa je v raziskavi z DON na mladicah v poskusni skupini ugotovila nižjo vsebnost limfocitov T ($CD3^+CD4^+$ in $CD3^+CD8^+$) kot na mladicah v kontrolni skupini. Wippermann in sod. (2009) so v svoji študiji svinje krmili s krmo, kontaminirano s 4,42 mg/kg DON, 0,0048 mg/kg ZEN, med 35. in 70. dnevom brejosti. Raziskovali so učinke krmljenja DON na imunohistokemične in morfometrične parametre organov imunskega sistema, jeter in črevesnega trakta prašičjega plodu na 70. dan gestacije. Opravili so anatomsko sekcijo ploda, makroskopski pregled bezgavk, timusa, vranice, jeter, kostnega mozga in tankega črevesja, opravili so histološke analize rezin organov in imunohistokemična barvanja (CD3, CD79a, p-p-53, p-p-38 MAPK, kaspazo-3, TNF-alfa, Ki-67, MAC 387). Zaključili so, da v preiskovanih organih fetusov ni razlik med kontrolno in poskusno skupino (Wippermann, 2011). Če primerjamo našo študijo, kjer smo uporabili podobne imunohistokemične metode, potem naši rezultati kažejo, da ima krma, ki vsebuje mikotoksin DON, značilen vpliv na morfologijo limfatičnih organov enotedenskih pujskov. Če primerjamo metodologijo našega in prej omenjenega poskusa, so mladice v obeh poskusih zauživale toksin približno enako dolgo, vendar pa so bile v naši raziskavi opravljene, poleg primerljivih imunohistokemičnih preiskav, dodatno tudi morfometrične analize timusa, Peyerjevih plošč, mezenterialnih bezgavk in vranice. Pomembna razlika med prej omenjenim poskusom in našo raziskavo pa je bila tudi v starosti pujskov. Ugotavljali smo sprememembe na limfatičnih organih pri enotedenskih pujskih, na katerih do sedaj, kolikor nam je znano, nihče ni opravil takšnih analiz. Glede na podatke iz literature je bilo opravljenih le malo poskusov na mladicah. Ker različni avtorji niso ugotovili sprememb na fetusih (Dänicke in sod., 2007; Goyarts in sod., 2007; Tiemann in sod., 2008; Wippermann in sod., 2009; Goyarts in sod., 2010), so se raziskovalci odločali predvsem za raziskave starejših pujskov, večinoma odstavljencev, ki že samostojno konzumirajo krmo (Chen in sod., 2008; Mikami in sod., 2010), ali pa so začeli študijo na pujskih, starejših od tedna dni (Gutzwiller, 2010). Če primerjamo metodiko in rezultate teh raziskav, se te medsebojno v marsičem razlikujejo. Gutzwiller in sod. (2010) so ugotovili, da izpostavljenost DON ni vplivala na izgubo telesne mase svinj med laktacijo in ne na število odstavljenih pujskov in njihov dnevni prirast. Mikami in sod. (2010) so prašičem v poskusu injicirali 1 mg/kg t. m. DON in s

histopatološkimi preiskavami ugotovili apoptozo limfocitov v timusu, Peyerjevih ploščah ileuma in v hepatocitih. Chen in sod. (2008) so s histopatološkimi študijami pokazali, da sta 1 mg/kg krme DON in 0,25 mg/kg krme ZEN povzročila histološke spremembe v vranici, bezgavkah, jetrih, ledvicah in maternici. Prav na podlagi tega so predlagali, da se glede na povečano razpoložljivost celičnih in molekularnih tehnologij pregledajo in dodelajo varnostni standardi za toksine v krmi, da bi se zagotovilo varno krmo in varnejše izdelke za potrošnike.

V praksi sočasno pojavljanje DON in ZEN ali drugih dodatnih mikotoksinov v krmi lahko evidentno poslabša prirejo. Učinki toksinov se lahko seštevajo ali množijo, odvisni pa so od medsebojnega razmerja (Döll in Dänicke, 2011). V naši raziskavi smo v krmi za poskusno skupino živali ugotovili tudi prisotnost fuzarne kisline. V večini študij ni podatka o vsebnosti fuzarne kisline, čeprav so poročali o sinergističnih interakcijah med fuzarno kislino in DON. Dokazano je, da lahko fuzarna kislina poveča toksičnost DON pri mladih prašičih (Smith in sod., 1997). Razlog, da se koncentracija fuzarne kisline v krmi za prašiče redko določa, je po mnenju nekaterih avtorjev njena majhna toksičnost, če v vzorcu ni drugih mikotoksinov (Smith in MacDonald, 1991; Smith in Sousadias, 1993).

V naši študiji smo pri pujskih, v večini raziskovanih parametrov, dokazali statistično značilno razliko med kontrolno in poskusno skupino, kar kaže na evidenten učinek toksinov v krmi za poskusno skupino. Zmanjšana velikost ali masa timusa, špekuliramo pa lahko tudi za volumen, so eden od prvih ugotovljenih pokazateljev toksičnosti, vendar v naši študiji s temi parametri nismo operirali. Predvideva se, da so timociti v skorji timusa še posebej dovzetni za delovanje toksičnih spojin, zato smo se osredotočili na histopatološke spremembe in spremembe v morfologiji timusa, ki so praktično uporabne za določanje imunotoksičnosti (Elmore, 2006). Morfometrične analize tkivnih rezin timusa sesnih pujskov iz našega poskusa so pokazale zaznavne spremembe v skorji in sredici. V tkivnih rezinah timusa živali iz poskusne skupine je bilo značilno manj skorje in več sredice v primerjavi s tkivnimi rezinami timusa živali iz kontrolne skupine (Tabela 6). Tudi v tkivnih vzorcih drugih limfatičnih organov sesnih pujskov in tudi mladic so morfometrične analize tkivnih rezin pokazale, da ima krma, naravno kontaminirana z DON, vpliv na njihovo histološko zgradbo. V tkivnih rezinah mezenterialnih bezgavk pujskov sta bili AG in NG germinativnih središč limfatičnih foliklov v poskusni skupini statistično značilno manjši (Tabela 12), če ju primerjamo s

tkivnimi rezinami mezenterialnih bezgavk kontrolne skupine pujskov. V mezenterialnih bezgavkah mladic za AG in NG germinativnih središč limfatičnih foliklov tega nismo potrdili. Statistično različni pa sta bili AG in NG germinativnih središč limfatičnih foliklov v histoloških rezinah Peyerjevih plošč pri pujskih in mladicah. Pri pujskih sta bili sicer AG in NG v poskusni skupini manjši v primerjavi s kontrolno skupino, vendar pa je bila razlika statistično značilno manjša le v primeru AG (Tabela 17). Statistično značilno večji (Tabela 30) pa sta bili pri mladicah v poskusni skupini v primerjavi s kontrolno skupino tako AG kot NG . Statistično značilno večji sta bili tudi AG in NG germinativnih središč limfatičnih foliklov v vranici pujskov (Tabela 21) in mladic (Tabela 34). Zaradi neprimerne prehrane, stresa ali toksičnih vplivov lahko pride do zmanjšanja organa ali njegovih delov (primer timus), kar je pokazatelj atrofije (Pearse, 2006b) oziroma zmanjšane funkcije (Chaytor in sod., 2011). Pearse (2006b) ugotavlja, da sta zmanjšana skorja in povečana sredica timusa, kar smo ugotovili tudi v našem poskusu, pokazatelj atrofije in ne involucije organa. Prav zmanjšana velikost timusa oziroma zmanjšana skorja timusa kot posledica apoptoze kortikalnih timocitov je kasnejši pokazatelj imunosupresije. Predvidevamo lahko, da zmanjšana fiziološka funcija timusa vodi v manjšo produkcijo imunsko zmožnih limfocitov T, kar se izraža z nižjim deležem limfocitov v periferni krvi prašičev, ki so zauživali DON (Jakovac-Strajn, 2008). Le to pa se lahko odraža bodisi v zaznavnih spremembah v sekundarnih limfatičnih organih (revnejša z limfociti T bogata področja) bodisi s povečano občutljivostjo na nekatere patogene, še zlasti na viruse. Spremembe v drugih, sekundarnih limfatičnih organih pa so lahko v pomoč pri dokazovanju, ali je atrofija timusa direktni učinek imunosupresije toksične snovi ali nespecifična reakcija na stres (Pearse, 2006b). V našem poskusu smo ugotovili tudi zmanjšanje AG tako v mezenterialnih bezgavkah kot Peyerjevih ploščah pujskov, NG pa je bila zmanjšana samo v bezgavkah pujskov. Zato bi lahko trdili, da je v našem poskusu učinek krme, ki vsebuje DON, na timus pujskov deloval toksično, kar ima za posledico kasnejšo imunosupresijo. Vranica mladic in pujskov poskusne skupine je imela povečano vrednost AG in NG, povečani sta bili tudi v Peyerjevih ploščah mladic. To nakazuje na povečanje organa, kar bi seveda lahko neposredno potrdili, če bi izmerili velikost, težo ali celo volumen posameznega organa. Pri vsem tem bi lahko govorili tudi o hiperplaziji teh organov, saj je poleg tega, da je bilo ugotovljeno povprečno večje število celic v apoptozi, ugotovljena tudi povečana proliferacija celic in s tem najverjetneje tudi spremenjeno razmerje med apoptozo in proliferacijo celic. Vprašanje, ki se postavlja na tej točki, je učinkovitost

takega organa (povečana, zmanjšana, enaka), kar bi seveda morali izmeriti z nekaterimi funkcijskimi testi na limfocitih. Poznano je, da lahko *Fusarium* mikotoksini (fumonizin B_1, T-2 toksin, fusarenon-X in DON) povzročijo apoptozo jetrnih in ledvičnih celic, epitelijskih celic gastrointestinalnega trakta in tudi imunskih celic (Surai in Dvorska, 2005). V naši raziskavi smo z imunohistokemičnimi analizami tkivnih rezin limfatičnih organov potrdili, da ima krma, naravno kontaminirana z DON, vpliv na apoptozo. DON v krmi vpliva tudi na proliferacijo nekaterih celic, na število makrofagov in na število limfocitov T v limfatičnih organih mladic in tudi v njihovih enotedenskih pujskih.

Apoptotična telesa in makrofagi so normalna histološka značilnost v skorji timusa, zlasti pri mladih živalih (Pearse, 2006a). Povečana izguba timocitov v skorji timusa zaradi povečane apoptoze bi lahko bila prva reakcija timusa na toksični vpliv. Sledi odstranitev apoptotičnih celičnih ostankov, kar povzroči izgubo kortiko-medularne razmejitve in atrofijo organa (Pearse, 2006b). V naši raziskavi se je izkazalo, da je bilo v tkivnih rezinah timusa, v skorji in v sredici pri pujskih poskusne skupine, povprečno število apoptotičnih celic značilno večje (Tabela 5) v primerjavi s kontrolno skupino. Vprašanje, ki se na tem mestu pojavi, je, ali krma, ki vsebuje DON, deluje direktno na apoptozo timocitov ali pa je povečana apoptoza timocitov tudi posledica delovanja toksinov na stromalne celice, ki bi nato nepravilno predstavljale lastne antigene in bi bila motena normalna selekcija (popačen mehanizem pozitivne in negativne selekcije) ali morda tudi zaradi vpliva na ustvarjanje citokinskega okolja, za kar so pomembne stromalne celice. Glede na poznane mehanizme delovanja DON na celice bi bilo to vsekakor mogoče. Tudi Pearse (2006b) omenja, da bi lahko v timusu, in sicer pri dovolj velikih koncentracijah imunotoksičnih snovi, prišlo do degeneracij epitelnih celic. Resenders in sod. (2004) so preučili frekvenco in porazdelitev apoptotičnih celic v limfatičnih organih zdravih prašičev, različnih starosti (6 dni, 2 meseca, 3,5 meseca in 5 mesecev). Apoptozo so dokazali v timusu, tonzilah, mezenterialnih bezgavkah, vranici in Peyerjevih ploščah. Uporabili so metodo »cleaved caspase 3« in metodo TUNEL, ki smo jo za dokaz apoptoze uporabili tudi v našem delu. Resenders in sod. (2004) omenjajo, da se z metodo TUNEL obarvajo tako prosta apoptotična telesca ter apoptotična telesca znotraj makrofagov kot v jedrih limfocitnih celic. Novejša raziskava (Bracarense in sod., 2017) je v podganjem modelu pokazala, da ima krma, kontaminirana z DON, v poskusni skupini (11,4 mg/kg) v primerjavi s kontrolno skupino (1,75 mg/kg) signifikanten vpliv na jetra, vranico in

tudi bezgavke. Dokazali so histološke poškodbe jeter in limfatičnih organov. Poglavitne histološke ugotovitve v jetrih so bile citoplazemska vakuolizacija in hepatocelularna megalocitoza. Povečana je bila tudi proliferacija celic v jetrih in apoptoza limfocitov v bezgavkah. Morfološki in imunohistokemični rezultati omenjene študije kažejo, da krmljenje krme z DON zmanjšuje jetrno funkcijo, zaradi sprememb v limfatičnih organih pa povzroča posledično imunosupresijo (Bracarense in sod., 2017).

V naši raziskavi je bilo dokazano statistično značilno večje povprečno število apoptotičnih celic v germinativnem središču foliklov in v rdeči pulpi histoloških rezin vranice pujskov poskusne skupine. Apoptozo smo dokazali tudi v foliklih, sredici in interfolikularnem področju histoloških rezin mezenterialnih bezgavk in v germinativnih središčih ter nad germinativnimi središči rezin Peyerjevih plošč pujskov. Povprečno število apoptotičnih celic kontrolne in poskusne skupine pri pujskih je bilo enako v mezenterialnih bezgavkah (Tabela 9) oziroma ni bilo značilno manjše v Peyerjevih ploščah (Tabela 13) pujskov. Pri mladicah v poskusni skupini smo ugotovili značilno večje povprečno število apoptotičnih celic tudi v vseh treh delih histoloških rezin mezenterialnih bezgavk (Tabela 22) in v obeh področjih rezin Peyerjevih plošč (Tabela 26) v primerjavi s pripadajočimi histološkimi rezinami organov kontrolne skupine. Prav tako je bilo značilno večje povprečno število apoptotičnih celic v histoloških rezinah vranice mladic na področju germinativnih središč limfatičnih foliklov in v rdeči pulpi živali poskusne skupine v primerjavi s kontrolno skupino (Tabela 31). Dokazana značilno povečana apoptoza celic v omenjenih limfatičnih organih mladic poskusne skupine v primerjavi s kontrolno skupino naklazuje, da krma, ki vsebuje DON, lahko negativno vpliva na te organe. Povečana apoptoza ima lahko v sekundarnih limfatičnih organih vpliv na zmanjšanje števila aktiviranih imunskih celic, predvsem limfocitov, kar je lahko osnova zmanjšani imunski odzivnosti gostitelja (Resenders in sod., 2004). Imunski sistem ima sicer visoko sposobnost regeneracije, ki si odvisno od stopnje toksičnosti lahko opomore v relativno kratkem času po toksičnem dogodku. Pri dovolj visokih koncentracijah imunotoksičnih snovi pa lahko pride poleg degeneracije imunskih celic tudi do proliferacije celic v organih imunskega sistema (Pearse, 2006b). Tako kot Wippermann in sod. (2009) oziroma Wippermann (2011), ki je podobno študijo izvedel na prašičjih fetusih, smo tudi v naši raziskavi za označevanje celic v proliferaciji uporabili mišja monoklonska protitelesa proti človeškemu markerju Ki-67, ki ga najdemo v normalnih in neoplastičnih celicah. Za

določanje makrofagov smo uporabili mišja monoklonska protitelesa proti človeškemu MAC 387 in za limfocite T kunčja poliklonska protitelesa proti človeškemu CD 3. Značilno intenzivnejšo proliferacijo celic smo dokazali v tkivnih rezinah timusa poskusne skupine pujskov na področju skorje in sredice (Tabela 8). Ker proliferacijski marker ni specifičen za določeno vrsto celic, lahko uporabimo obstoječe razlage proliferacije v timusu pri drugih avtorjih. Tako kot omenja Pearse (2006b), bi lahko bil to poskus okrevanja timusa ali pa je lahko to tudi znak drugih proliferacijskih sprememb po toksičnemu vplivu *Fusarium* mikotosinov. Lahko gre za proliferacijo epitelnih celic v timusu (Pearse, 2006b), medtem ko limfociti apoptotično propadajo. Čeprav nimamo natančnih podatkov, katere celice v timusu preidejo v proliferacijo, vseeno že lahko trdimo, da je timus občutljiv ciljni organ po izpostavljenosti telesa imunotoksičnim snovem.

Število celic v proliferaciji je bilo praviloma v vseh histoloških vzorcih sekundarnih limfatičnih organov mladic in pujskov statistično značilno večje v poskusni skupini v primerjavi s histološkimi vzorci organov kontrolne skupine obeh proučevanih kategorij. Statistično značilno večje število celic v proliferaciji smo dokazali v germinativnih središčih in nad germinativnih središčih limfatičnih foliklov Peyerjevih plošč pujskov (Tabela 15). Značilno večje je bilo tudi število celic v proliferaciji v germinativnih središčih limfatičnega folikla in rdeče pulpe vranice pujskov poskusne skupine (Tabela 20). V mezenterialnih bezgavkah pujskov pa je bilo število celic v proliferaciji značilno večje v interfolikularnem delu in v sredici poskusne skupine (Tabela 11), le v germinativnem središču limfatičnega folikla ni bilo značilno različno (Tabela 11). Pri mladicah poskusne skupine je bilo število celic v proliferaciji značilno večje v primerjavi s kontrolno skupino, in sicer v mezenterialnih bezgavkah, v vseh treh delih (folikel, sredica, interfolikularno; Tabela 24), v Peyerjevih ploščah (germinativno središče, nad germinativnim središčem; Tabela 28) in v vranici, tako v germinativnih središčih limfatičnih foliklov kot v rdeči pulpi (Tabela 33). Glede na navedene podatke lahko špekuliramo, da krma, ki vsebuje DON, spodbuja proliferacijo celic v sekundarnih limfatičnih organih, kar trdijo nekateri avtorji glede vpliva DON na limfocite. Ali je to poskus regeneracije limfatičnih organov po obsežni apoptozi ali pa je to proliferacija drugih celic (na primer epitelnih) (Pearse, 2006b), ki ima lahko skupaj s povečano apoptozo za posledico zmanjšanje števila imunskih celic, in tako vpliva na imunsko odzivnost (Resenders in sod., 2004) limfatičnih organov mladic in njihovih pujskov. Pri tem bi lahko

navedli še druge možne vzroke, in sicer od vpliva DON na citokinsko okolje, ki potem vpliva na pomnoževanje limfocitov, pa do morebitnega protitelesnega imunskega odziva na sam DON, ki ima za posledico pomnoževanje specifičnih limfocitov B. Vsekakor pa bo za preciznejši odgovor na to vprašanje potrebno opraviti še dodatne, specifične raziskave o vplivu DON na proliferacijo imunskih celic v limfatičnih organih.

Zavedati se moramo, da proliferacija in apoptoza v primarnih limfatičnih organih v biološkem smislu ne pomenita enako kot proliferacija in apoptoza v sekundarnih limfatičnih organih, kjer nastaja predvsem imunski odziv na določene antigene. Pričakovali bi, da bo imela povečana proliferacija v primarnih limfatičnih organih pri mladicah tudi povečano število limfocitov T, vendar sodeč po rezultatih Jakovac-Strajn (2008), kjer je bilo v krvi mladic poskusne skupine ugotovljen nižji delež limfocitov T v primerjavi s kontrolno skupino, lahko sklepamo, da pri tem nad dokazano proliferacijo prevladuje apoptoza, med drugim tudi imunskih celic.

Pri enotedenskih pujskih smo dokazali statistično značilno večje število makrofagov v germinativnih središčih limfatičnih foliklov in v rdeči pulpi vranice poskusne skupin v primerjavi s kontrolno (Tabela 19). Značilno večje število makrofagov je bilo tudi v sredici mezenterialnih bezgavk pujskov poskusne skupine, medtem ko je bilo v germinativnih središčih limfatičnih foliklov mezenterialnih bezgavk pujskov poskusne skupine značilno manjše kot v kontrolni skupini (Tabela 10). Prav tako je bilo manjše število makrofagov v interfolikularnem delu mezenterialnih bezgavk pujskov poskusne skupine, vendar statistično neznačilno (Tabela 10). V Peyerjevih ploščah pujskov pa je bilo število makrofagov v poskusni skupini manjše v germinativnih središčih limfatičnih foliklov, v delu nad germinativnimi središči pa večje, vendar v primerjavi s kontrolno skupino ni bilo statistično značilno (Tabela 14). Tudi v skorji in sredici timusa pujskov med kontrolno in poskusno skupino ni bilo statističnih značilnih razlik v številu makrofagov (Tabela 7). Pri mladicah je bilo v vseh treh delih mezenterialnih bezgavk (folikel, sredica, interfolikularno) število makrofagov statistično značilno manjše v poskusni skupini v primerjavi s kontrolno (Tabela 23). V Peyerjevih ploščah mladic poskusne skupine (v obeh delih; Tabela 27) in v vranici mladic poskusne skupine (v obeh delih; Tabela 32) je bilo število makrofagov značilno večje v primerjavi s kontrolno skupino. Apoptotična telesca in makrofagi so ponavadi normalno

prisotni v timusu (Pearse, 2006a) in drugih limfatičnih organih. Pri povečani apoptozi v timusu ponavadi sledi tudi povečano število makrofagov (Pearse, 2006b). Tega v timusu in Peyerjevih ploščah pujskov nismo opazili, smo pa to opazili v vseh limfatičnih organih mladic in vranici pujskov. Porast števila makrofagov v teh limfatičnih organih je lahko odziv na povečano apoptozo zaradi toksičnega delovanja krme konatminirane z mikotoksinom DON in zaradi nastalega citokinskega okolja. Makrofagi namreč s svojo fagocitno aktivnostjo pomembno vplivajo na odstrajevanje produktov apoptoze. V mezenterialnih bezgavkah mladic in delno tudi pri pujskih smo opazili, da je bilo število makrofagov značilno nižje v poskusni skupini v primerjavi s kontrolno skupino. Mogoče je prišlo do migracije makrofagov iz bezgavk v druge limfatične organe (vranica, Peyerjeve plošče) ali pa kot navaja Marzocco in sod. (2009), lahko DON direktno povzroči tudi apoptozo makrofagov in je zaradi tega manjše število teh v omenjenih organih. Tudi tukaj si lahko vsaj teoretično predstavljamo, da je količina DON, ki preide po limfnih žilah iz črevesja do mezenterialnih bezgavk, višja v primerjavi s koncentracijo v drugih delih imunskega sistema.

Zaradi prevelike gostote limfocitov T v večini reprezentativnih delov limfatičnih organov, in sicer pri kontrolni in poskusni skupini mladic in pujskov ni bilo mogoče prešteti limfocitov T. Te smo uspeli prešteti le v germinativnih središčih limfatičnih foliklov Peyerjevih plošč ileuma mladic in njihovih teden dni starih pujskov. Pierron in sod. (2016) navajajo, da sta med številnimi mikotoksini, ki se nahajajo v prašičji krmi, prav DON in fumonizin B_1 tista, ki imata največji vpliv na črevesje in imunski sistem prašičev. Črevesje je po njihovem mnenju prva obramba pred kontaminanti iz krme in je lahko izpostavljeno visokim koncentracijam mikotoksinov, na katere se imunski sistem odzove. DON vzdraži črevesno obrambo, zmanjša imunski odziv, zmanjša vnos krme in prirast (Pierron in sod., 2016). Obremski in sod. (2008) v svoji študiji navajajo, da nizke doze DON ne povzročajo večjih sprememb, spodbudijo pa metabolizem v enterocitih in spodbudijo vnetne reakcije v mukozi tankega črevesja. To lahko pomeni, da krma, ki vsebuje DON, vpliva tudi na limfocitni infiltrat v tem področju, ki je pogojen s citokinskim okoljem vnetnih reakcij. Tudi Zielonka in sod. (2009) navajajo, da sta zmanjšana ješčnost in zmanjšan prirast (tudi do 40 %) verjetno povezana z regresivnimi poškodbami v tankem črevesju in posledično slabšo prebavo ter resorbcijo hranil v tem področju. Naši rezultati, poleg že prej omenjene apoptoze in proliferacije celic, nakazujejo, da se pojavlja zelo verjetna imunosupresija, saj je bilo število limfocitov T pri mladicah

poskusne skupine v germinativnih središčih Peyerjevih plošč statistično značilno manjše v primerjavi s kontrolno skupino (Tabela 29). Pri pujskih poskusne skupine je bilo sicer število limfocitov T v germinativnih središčih limfatičnih foliklov Peyerjevih plošč večje kot v kontrolni skupini, vendar razlike niso bile statistično značilne (Tabela 16). Pri analizi rezultatov imunohistokemije in morfometrije pri mladicah lahko domnevamo, da so bile tako Peyerjeve plošče ileuma, mezenterialne bezgavke in vranica prizadete zaradi DON, kar bi lahko primerjali z zgoraj omenjenimi trditvami Pierron in sod. (2016). Kot je razvidno iz naših rezultatov, je bilo tako v Peyerjevih ploščah ileuma in v vranici mladic poskusne skupine povečano število celic v apoptozi in proliferaciji in tudi število makrofagov, kar poleg majhnega števila limfocitov T v Peyerjevih ploščah in v periferni krvi mladic (Jakovac-Strajn, 2008), nakazuje na imunosupresivno delovanje v limfatičnih organih oziroma za imunski odziv na DON kot poskus vzpostavitve ponovne imunske aktivnosti organa. Tudi v mezenterialnih bezgavkah je bilo podobno, vendar je bilo število makrofagov v poskusni skupini manjše, kar bi lahko nakazovalo na morebitno migracijo teh v Peyerjeve plošče ileuma. Rothkötter in Pabst (1989) navajata, da se s starostjo Peyerjeve plošče ne spreminjajo in ostajajo v enakem številu, vendar smo v naši raziskavi dokazali ravno nasprotno, saj je krma, kontaminirana z DON, vplivala na Peyerjeve plošče mladic, kar se kaže v spremenjeni AG in NG germinativnih središč limfatičnih foliklov v Peyerjevih ploščah mladic.

Najbolj zaznavne histološke spremembe v timusu in v vranici so bile v naši raziskavi pri pujskih (Tabela 35). Ta organa naj bi bila pri pujskih razvita že pred Peyerjevimi ploščami (Barman in sod., 1997). Tudi Tizard (2004) navaja, da naj bi timus dozorel prej pri domačih živalih kot pri miškah. Prav tako naj bi bile kritične faze rasti timusa pri prašičih zaključene pred samim rojstvom. Peyerjeve plošče pa naj bi bile pomembnejše šele po 1. mesecu življenja (Barman in sod., 1997). Vozelj (1985) navaja, da načeloma, če antigen ne pride v timus, se tam imunski odziv ne izrazi. V našem primeru pa so bile spremembe v timusu pri enotedenskih pujskih zelo očitne, na podlagi česar sklepamo, da so lahko pujski prišli v stik s *Fusarium* mikotoksini kot antigeni že intrauterino. Torej, če ima žival oslabljen imunski odziv, je to lahko posledica slabšega delovanja prirojenega imunskega sistema že pred rojstvom in takoj po njem, kar seveda lahko vpliva kasneje tudi na pridobljeni del imunskega sistema, ki lahko zakasni v razvoju, zato je nezadostno učinkovit pri specifičnem odstranjevanju patogenov. Preobčutljivostne reakcije na cepljenje, na različne okužbe, na

okoljske ali prehranske antigene ali celo na lastno tkivo se prav tako lahko pojavijo, če je imunski sistem preveč stimuliran ali nepravilno reguliran (Roth in Thacker 2006). Z raziskavami, opravljenimi v preteklosti, je bilo ugotovljeno, da trichoteceni v nizkih odmerkih spodbujajo imunski odziv, medtem ko visoki odmerki povzročajo apoptozo levkocitov, kar vodi v imunosupresijo (Pestka in sod., 2004). Podatki iz literature nakazujejo, da DON povzroča šibkejši imunski odziv po cepljenju, da vpliva na povečanje ali zmanjšanje proliferacijske sposobnosti limfocitov po stimulaciji s fitohemaglutininom (PHA) ali konkavalinom A (Con-A), da vpliva na dendritične celice in da poveča maso jeter ter zmanjša koncentracijo serumskih albuminov ali globulinov (Goyarts in sod., 2006b; Pinton in sod., 2008). V naši študiji je bil torej opazen učinek krme, kontaminirane s *Fusarium* mikotoksini, ki je bila krmljena mladicam, in se je kazal že v skorji in sredici timusa njihovih enotedenskih sesnih pujskov, saj je bilo povprečno število apoptotičnih celic v obeh delih timusa povečano. To lahko pomeni, da bodo lahko imeli pujski zmanjšano sposobnost imunskega odziva. Kljub temu je bilo število celic v proliferaciji tako v skorji kot v sredici timusa bistveno večje v primerjavi s kontrolno skupino pujskov. Razvijajoči se imunski sistem teh pujskov bi bil v danem primeru lahko preveč stimuliran ali pa celo nepravilno reguliran (odvisno od vrste celic, ki so bile v proliferaciji), kar bi lahko povzročilo že prej navedene nepravilnosti v delovanju imunskega sistema. Krma, kontaminirana s *Fusarium* mikotoksini, krmljena mladicam, bi torej lahko vplivala na populacijo timocitov njihovih mladičev v smeri povečane proliferacije ali programirane celične smrti. Vpliv dopolnjuje dejstvo, da so bili pujski teden dni izpostavljeni DON preko mleka mladic, kar je poleg prehoda preko placente še dodaten način izpostavljenosti *Fusarium* mikotoksinom po njihovem rojstvu. Tako na osnovi naših rezultatov menimo, da intrauterina in laktogena izpostavljenost pujskov *Fusarium* toksinom nedvoumno povzroči merljive spremembe v histoloških rezinah timusa enotedenskih pujskov. Takšna perinatalna izpostavljenost je bila pogosto zanemarjena pri predhodnih ocenah o še sprejemljivih mejah (dnevnega) vnosa DON v prehrano živali in ljudi. V prejšnjih raziskavah je bilo ugotovljeno, da imajo mladice, ki konzumirajo krmo s koncentracijo DON 5,08 mg/kg, tudi v kolostrumu statistično značilno manj imunoglobulinov razreda A (IgA), kar se posledično izraža tudi, da je v serumu njihovih pujskov 12, 24 in 48 ur po prvem sesanju značilno manj IgA in tudi IgG (Jakovac-Strajn, 2008). Glede na naše poznavanje področja, danes ne obstajajo normativi, s katerimi bi lahko ovrednotili pasivno zaščito pujskov na podlagi skupne količine imunoglobulinov kot zadostno ali nezadostno. V danem primeru, kjer

je bila dokazana značilna razlika med kontrolno in poskusno skupino, torej lahko pričakujemo slabšo protitelesno zaščito pujskov iz poskusne skupine.

Prašiči se pogosto uporabljajo kot model za proučevanje človeških bolezni, ker so fiziološko podobni ljudem (Goyarts in sod., 2006b). Študije s *Fusarium* mikotoksini na prašičih so torej vsekakor zelo pomembne tudi za razumevanje, ali ima izpostavljenost človeka *Fusarium* mikotoksinom podobne učinke. Znano je, da so učinki *Fusarium* mikotoksinov, zlasti DON, v majhnih odmerkih težko zaznavni v primerjavi z akutno izpostavljenostjo, kjer so doze večje. V zadnjih nekaj letih se proučuje vpliv kronične izpostavljenosti z majhnimi odmerki *Fusarium* mikotoksinov na ljudi, zlasti na mladino. Prepoznani so subtilni učinki na rast, tudi na delovanje imunskega sistema in na reprodukcijsko sposobnost (Pestka, 2010a). Metanalize rezultatov vseh dosedanjih študij s tega področja kažejo, da mora biti za popolno razumevanje učinkov *Fusarium* mikotoksinov, katerim so pogosto izpostavljene živali in tudi ljudje, opravljenih še mnogo nadaljnjih študij.

6 ZAKLJUČKI

Z morfometričnimi in imunohistokemičnimi metodami smo potrdili imunosupresivni učinek krme, ki vsebuje mikotoksin DON (5,08 mg/kg), na limfatične organe mladic in njihovih teden dni starih sesnih pujskov.

Dokazali smo, da obstaja v limfatičnih organih pri mladicah in pujskih statistična razlika med kontrolno in poskusno skupino v številu in velikosti germinativnih središč limfatičnih foliklov v histoloških rezinah Peyerjevih plošč ileuma, mezenterialnih bezgavk in vranice in tudi v razmerju površine med skorjo in sredico v histoloških rezinah timusa pri pujskih. V teh limfatičnih organih smo tako pri mladicah kot tudi pri njihovih sesnih pujskih dokazali, da obstaja statistična razlika med kontrolno in poskusno skupino v številu apoptotičnih celic, v proliferacijski aktivnosti, v številu makrofagov in limfocitov T.

Če je imunski sistem oslabljen ali nepravilno reguliran, se lahko kot posledice pojavijo preobčutljivostne reakcije na cepljenja, na okužbe in tudi na okoljske in prehrambne antigene ali celo na lastno tkivo. V dostopni literaturi do sedaj še ni bil opravljen model našega poskusa in rezultati predstavljajo pomemben doprinos k znanosti in k poznavanju vrednotenja delovanja imunskega odziva po vnosu krme, naravno kontaminirane z DON. Gledano bolj na splošno pa predstavlja naša raziskava spoznanje k boljšemu razumevanju učinkov DON, ki so mu pogosto izpostavljene živali in ljudje.

7 POVZETEK

Namen tega dela je bil preučiti učinke krme, naravno kontaminirane z mikotoksini, ki jih proizvajajo plesni iz rodu *Fusarium*, na limfatične organe mladic in njihovih teden dni starih pujskov. Raziskavo smo opravili na vzorcih, pridobljenih med poskusom, ki ga je opisala Jakovac-Strajn (2008). Dvajset brejih mladic je bilo deljenih v dve skupini, ki sta bili v poskusu 52 ± 1 dan. Kontrolna skupina je konzumirala krmo z DON v koncentraciji 0,26 mg/kg, poskusna skupina pa krmo, ki je vsebovala 5,08 mg/kg DON in 0,09 mg/kg ZEN ter 21,61 mg/kg fuzarne kisline. V naši študiji je največje še priporočene koncentracije *Fusarium* mikotoksinov močno presegal samo DON, zato smo se osredotočili predvsem na ta mikotoksin.

Mladice smo žrtvovali 5-8 dni po odstavitvi pujskov, prav tako pa smo v prvem tednu starosti žrtvovali iz vsakega gnezda po enega klinično zdravega pujska. Pri vseh živalih smo odvzeli vzorce ileuma s Peyerjevimi ploščami, mezenterialnih bezgavk in vranice, pri pujskih pa tudi timusa. Vzorce limfatičnih organov smo fiksirali v 10 % puferiranem formalinu in rutinsko vklopili v parafinske bloke. Število in velikost germinativnih središč foliklov limfatičnih organov ter razmerje med skorjo in sredico timusa smo analizirali na tkivnih rezinah, obarvanih s HE. Občrtali in izmerili smo referenčni prostor in profile. Preiskali smo 20 polj na tkivno rezino pri 40 x povečavi.

Celice v apoptozi smo označili z metodo TUNEL, celice v proliferaciji, makrofage in limfocite T pa z imunohistokemičnmi metodami na parafinskih tkivnih rezinah. Za določanje celic v proliferaciji smo uporabili barvanje z mišjimi monoklonskimi protitelesi proti človeškemu Ki-67 antigenu, za označevanje makrofagov pa barvanje z mišjimi monoklonskimi protitelesi proti človeškemu MAC 387 in za označevanje limfocitov T barvanje s kunčjimi poliklonskimi protitelesi proti človeškemu CD 3. Pri 400 x povečavi smo preiskali 5 vidnih polj.

Pri pujskih smo v skorji in sredici timusa določali celice v apoptozi, proliferaciji in število makrofagov. Poleg tega smo določali tudi razmerje med skorjo in sredico. V germinativnih središčih in na področju nad germinativnimi središči limfatičnih foliklov v Peyerjevih ploščah

mladic in pujskov smo določali celice v apoptozi, proliferaciji in število makrofagov. V germinativnih središčih limfatičnih foliklov Peyerjevih plošč smo določili tudi število limfocitov T in arealno ter numerično gostoto njihovih profilov. V vzorcih mezenterialnih bezgavk mladic in pujskov smo določali celice v apoptozi, v proliferaciji in število makrofagov v germinativnem središču limfatičnega folikla, v sredici in tudi v interfolikularnem področju. Poleg tega smo določili tudi arealno in numerično gostoto germinativnih središč limfatičnih foliklov v skorji mezenterialnih bezgavk. Celice v apoptozi, proliferaciji in število makrofagov smo določali tudi v germinativnih središčih limfatičnih foliklov in v rdeči pulpi vzorcev vranice mladic in pujskov. Določili smo tudi arealno in numerično gostoto germinativnih središč limfatičnih foliklov.

Morfometrične in imunohistokemične analize tkivnih rezin limfatičnih organov so pokazale, da ima krma, naravno kontaminirana z DON, vpliv na limfatične organe mladic in njihovih teden dni starih pujskov. Med kontrolno in poskusno skupino pujskov smo v timusu dokazali statistično značilne razlike v vseh preiskovanih parametrih, razen v številu makrofagov. Tudi v mezenterialnih bezgavkah in Peyerjevih ploščah mladic smo večinoma ugotovili statistično značilne večje vrednosti pri preiskovanih parametrih v poskusni skupini. Le število makrofagov v mezenterialnih bezgavkah in število limfocitov T v Peyerjevih ploščah mladic je bilo v poskusni skupini statistično značilno manjše. Pri pujskih so bile spremembe v mezenterialnih bezgavkah večinoma večje v poskusni skupini, v Peyerjevih ploščah pa statističnih razlik med skupinama nismo ugotovili, razen v številu celic v proliferaciji in arealni gostoti. V vranici pujskov in mladic pa so bili vsi preiskovani parametri statistično značilno večji v poskusni skupini v primerjavi s kontrolno skupino.
Dokazali smo tudi, da konzumacija krme v naši raziskavi ni imela statistično značilnega vpliva na preiskovane parametre v limfatičnih organih mladic in njihovih sesnih pujskov.

Naša raziskava je pokazala, da je učinek krme, naravno kontaminirane z DON, bolj imunosupresiven kot imunostimulatoren pri mladih plemenskih svinjah in pri njihovih teden dni starih pujskih. Če je imunski sistem oslabljen ali nepravilno reguliran, se lahko kot posledice pojavijo preobčutljivostne reakcije na cepljenja, na okužbe in tudi na okoljske in prehrambne antigene ali celo na lastno tkivo. V dostopni literaturi do sedaj še ni bil opravljen model našega poskusa in rezultati predstavljajo pomemben doprinos k znanosti in k

poznavanju vrednotenja delovanja imunskega odziva po vnosu krme, naravno kontaminirane z DON. Gledano bolj na splošno pa predstavlja naša raziskava spoznanje k boljšemu razumevanju učinkov DON, ki so mu pogosto izpostavljene živali in ljudje.

8 SUMMARY

The purpose of this work was to study the effects of feed naturally contaminated with mycotoxins produced by moulds from the genus *Fusarium*, on the lymphatic organs of the gilts and their one-week old piglets. The research was carried out on samples obtained during the experiment described by Jakovac-Strajn (2008). Twenty pregnant gilts were divided into two groups, which were in the experiment for 52 ± 1 days. The control group consumed feed with DON at a concentration of 0.26 mg/kg, and the experimental group was fed with feed with 5.08 mg/kg of DON, 0.09 mg/kg ZEN, and 21.61 mg/kg fusaric acid. In our study, the highest recommended concentrations of *Fusarium* mycotoxins were strongly exceeded only by DON, so we focused primarily on this mycotoxin.

The gilts were sacrificed 5-8 days after weaning piglets, and in the first week of age one clinically healthy piglet was also sacrificed from each nest. In all animals, samples of ileum with Peyer's patch, mesenteric lymph nodes and spleen were taken, and in piglets also from the thymus. Samples of lymphatic organs were fixed in 10% buffered formalin and routinely incorporated into paraffin blocks. The number and size of the germinative centres of lymphatic organ follicles and the ratio between the cortex and the medulla of the thymus were analysed on tissue slices stained by HE. We redrew and measured the reference space and profiles, and examined 20 fields on each tissue slice at 40 x magnification.

Cells in the apoptosis were labelled with the TUNEL method, while cells in proliferation, macrophages and T lymphocytes were labelled with immunohistochemical methods on paraffin tissue slices. For the determination of cells in proliferation, staining with mouse monoclonal antibodies against human Ki-67 antigen (DAKO) was used, while for marking macrophages we applied staining with mouse monoclonal antibodies against human MAC 387 (DAKO), and for labelling of T lymphocytes we used staining with rabbit polyclonal antibodies against human CD 3 (DAKO). We then examined five visible fields at 400 x magnification.

In the piglets, the cells in apoptosis, proliferation and the number of macrophages were determined in the cortex and medulla of the thymus. In addition, the ratio between the cortex

and the medulla was also determined. Cells in apoptosis, proliferation and the number of macrophages were determined in the germinative centres of the lymphatic follicles and the areas above these in the Peyer's patches of the gilts and piglets. In the germinative centres of lymphatic follicles of the Peyer's patches, the number of T lymphocytes and the areal and numerical densities of their profiles were determined. Cells in apoptosis, proliferation, and number of macrophages were determined in the samples of the mesenteric lymph nodes of the gilts and piglets, in the germinative centres of the lymphatic follicles, in the medulla and in the interfollicular region. In addition, the areal and numerical densities of the germinative centres of lymphatic follicles in the cortex of the mesenteric lymph node were also determined. Cells in apoptosis, proliferation and number of macrophages were also determined in the germinative centres of lymphatic follicles and in the red pulp of the spleen samples of the gilts and piglets. The areal and numerical densities of the germinative centres of lymphatic follicles were also assessed.

Morphometric and immunohistochemical analyses of the tissue slices of lymphatic organs showed that feed naturally contaminated with DON had an impact on the lymphatic organs of gilts and their one-week old piglets. Statistically significant differences in all investigated parameters between the control and experimental group of piglets were demonstrated in timus, except in the number of macrophages. Also in the mesenteric lymph nodes and Peyer's patches of the gilts, statistically significantly higher values in the investigated parameters were mostly found in the experimental group. Only the number of macrophages in mesenteric lymph nodes and the number of T lymphocytes in Peyer's patches of the gilts in experimental group were statistically significantly lower. In piglets, however, differences in mesenteric lymph nodes were mostly higher in the experimental group, but in Peyer's patches there were no statistical differences between the groups, except in the number of cells in proliferation and the areal density. In the spleen, of piglets and gilts, all the investigated parameters were statistically significantly higher in the experimental group compered to the control group.
We also discovered that the consumption of feed in our study did not have a statistically significant effect on the investigated parameters in the lymphatic organs of gilts and their suckling piglets.

Our study has shown that the effect of feed naturally contaminated with DON is more immunosuppressive than immunostimulatory, both in young breeding swine and their one-week old piglets. If the immune system is weakened or improperly regulated, hypersensitivity reactions to vaccinations, to infections as well as to environmental or nutritional antigens or even to their own tissue may occur as a consequence. In the available literature, the model of our experiment has not yet been performed, and the results represent an important contribution to the science and knowledge of evaluating the immune response after feeding feed naturally contaminated with DON. Viewed more generally, our research is a contribution to understanding the effects of DON, to which both animals and humans are often exposed.

9 ZAHVALE

Za strokovno vodstvo, prijateljstvo, brezmejno pomoč in potrpljenje pri nastajanju naloge se iskreno zahvaljujem svoji mentorici, prof dr. Bredi Jakovac Strajn. Hvala!

Zahvaljujem se somentorju, prof. dr. Milanu Pogačnik, in komisiji: prof. dr. Tadeju Malovrh, prof. dr. Nini Gale in prof. dr. Antonu Vengušt. Vsem iskrena hvala za pozitivno vzdušje, spodbude in strokovne komentarje ter dobro voljo pri nastajanju naloge.

Doc. dr. Tanji Švara se želim posebej zahvaliti, ker me je uvedla v imunohistokemijo in bdela nad mojim delom na Inštitutu za patologijo, divjad, ribe in čebele. Vedno je bila pripravljena priskočiti na pomoč ter si vzeti čas za moje raziskovalno delo, tudi takrat, ko je imela sama ogromno dela … Hvala! Hvala tudi Juriju Omahen in Benjaminu Cerk ter drugim sodelavcem z Inštituta, ki so mi bili vedno pripravljeni pomagat.

Zahvaljujem se slovenistki Ireni Šinkovec za jezikovni pregled naloge v slovenščini in g. Paul Steed za jezikovni pregled v angleščini ter vedno nasmejani mag. Giti Grecs-Smole za pregled referenc. Zahvaljujem se mag. Mateji Nagode za izjemno delo pri statistični obdelavi podatkov. Hvala, da je v njenem pomembnem obdobju namenila svoj dragoceni čas tudi mojim podatkom. Hvala Luku Milčinskemu za čas in pomoč pri oblikovanju tega dela.

Hvala prof. dr. Urošu Pestevšku, prof. dr. Jankotu Žustu in prof. dr. Nestorju Klemencu za njihov dragoceni čas, strokovne pogovore, nasvete in ideje, povezane z nalogo in z mojim delom. Iskreno bi se rad zahvalil (čeprav s solzami v očeh) Vladu Jakovcu za prijateljstvo in vse spodbudne besede med raziskovanjem. Hvala, Vlado!

Iskrena hvala vsem mojim sodelavcem na Enoti za okolje, prehrano, dobrobit in higieno živali (Inštitut za varno hrano, krmo in okolje): Katarini, Ireni, Marjani, Alenki, Gabrijeli, Štefanu, Janji, Poloni, prof. dr. Martinu Dobeicu, Karin, Petri, Robiju in Klementini za vso pomoč, dobro voljo, nasmejane obraze in spodbudne besede … ter vsem drugim, ki so kakorkoli prispevali k rezultatom tega dela. Predvsem pa hvala vsem, ki ste me kadarkoli vprašali: »Kdaj boš že končal?« in me tako spodbujali ter mi pomagali.

Za sofinanciranje doktorskega študija se zahvaljujem Evropskemu socialnemu skladu (»Naložba v vašo prihodnost« - operacijo delno financira Evropska unija), Republiki Sloveniji, Ministrstvu za izobraževanje, znanost in šport, v okviru javnega razpisa za izbor operacij »Inovativna shema za sofinanciranje doktorskega študija za spodbujanje sodelovanja z gospodarstvom in reševanje aktualnih družbenih izzivov – generacija 2010, Univerza v Ljubljani« in Veterinarski fakulteti, Univerze v Ljubljani.

Posebno zahvalo namenjam moji družini (ožji in širši) za vso brezmejno pomoč in potrpljenje v teh letih, za vse tisto, kar se z besedami ne da izraziti. Hvala! Hvala tudi tebi, Lina in Lan, za sobo … Vida, Lina in Lan, rad vas imam!

10 LITERATURA

1 Abbas HK, Shier WT, Mirocha CJ. Sensitivity of cultured human and mouse fibroblasts to trichothecenes. J Assoc Off Anal Chem, 1984; 67: 607–10.

2 Accensi F, Pinton P, Callu P, et. al.. Ingestion of low doses of deoxynivalenol does not affect hematological, biochemical, or immune responses of piglets. J Anim Sci, 2006; 84: 1935–42.

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

4 Awad WA, Ghareeb K, Dadak A, Hess M, Böhm J. Single and combined effects of deoxynivalenol mycotoxin and a microbial feed additive on lymhocyte DNA damege and oxidative stress in broiler chickens. PLoS One, 2014; 9(1): e88028

5 Bacon CW, Porter JK, Norred WP, Leslie JF. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. Appl Environ Microbiol, 1996; 62: 4039–43.

6 Barman NN, Bianchi ATJ, Zwart RJ, Pabst R, Rothkötter HJ. Jejunal and ileal Peyer`s patches in pigs differ in their postnatal development. Anat Embryol, 1997; 195: 41–50.

7 Beardall JM, Miller JD. Diseases in humans with mycotoxins as possible causes. In: Miller JD, Trenholm HL, eds. Mycotoxins in grain. St. Paul: Eagan Press, 1994; 487–569.

8 Bensassi F, El Golli-Bennour E, Abid-Essefi S, Bouaziz C, Hajlaoui MR, Bacha H. Pathway of deoxynivalenol-induced apoptosis in human colon carcinoma cells. Toxicology, 2009; 264: 104–9.

9 Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev, 2003; 16(3): 497–516.

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

11 Bimczok D, Doll S, Rau H, et al. The *Fusarium* toxin deoxynivalenol disrupts phenotype and function of monocyte-derived dendritic cells in vivo and in vitro. Immunobiology 2007; 212(8): 655–66.

12 Biro KK. Adverse effects of deoxynivalenol and ochratoxin A in farm animals: comparative in vivo and in vitro studies. Utrecht: Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Pharmacology, Pharmacy and Toxicology, 2003.

Dissertation.

13 Bondy GS, Pestka JJ. Immunomodulation by fungal toxins. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2000; 3(2): 109–43.

14 Bracarense APFL, Basso KM, Da Silva EO, Payros D, Oswald IP. Deoxynivalenol in liver and lymphoid organs of rats: effects of dose and duration on immunohistological changes. World Mycotoxin J, 2017; 10(1): 89–96.

15 Brandtzaeg P, Dale I, Gabrielsen T-Ø. The leucocyte protein L1 (calprotectin): usefulness as an immunohistochemical marker antigen and putative biological function. Histopathology, 1992; 21: 191–6.

16 Campana D, Thompson JS, Amlot P, Brown S, Janossy G. The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoide lineage. J Immunol, 1987; 138: 648–55.

17 Cavret S, Lecoeur S. Fusariotoxin transfer in animal. Food Chem Toxicol, 2006; 44: 444–53.

18 Chavez ER. Vomitoxin-contaminated wheat in pig diets: pregnant and lactating gilts and weaners. Can J Anim Sci, 1984; 64: 717–23.

19 Chavez ER, Rheaume JA. The significance of the reduced feed consumption observed in growing pigs fed vomitoxin-contaminated diets. Can J Anim Sci, 1986; 66: 277–87.

20 Chaytor AC, See TM, Hansen JA, De Souza ALP, Middleton TF, Kim SW. Effects of chronic exposure of diets with reduced concentrations of aflatoxin and deoxynivalenol on growt and immune status of pigs. J Anim Sci, 2011; 89: 124–35.

21 Chen F, Ma Y, Xue C, et al.. The combination of deoxinivalenol and zearalenone at permitted feed concentrations causes serious physiological effects in young pigs. J Vet Sci, 2008; 9(1): 39–44.

22 Chianini F, Majo N, Segales J, Dominguez J, Domingo M. Immunohistological study of the immune system cells in paraffin-embedded tissues of conventional pigs. Vet Immunol and Immunopathol, 2001; 82: 245–55.

23 Collan Y. Morphometry in pathology: another look at diagnostic histopathology. Pathol Res Pract, 1984; 179(2): 189–92.

24 Commission recommendation 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animals feeding. Off J Eur Union, 2006; L229: 7–9.

25 Commission regulation 1126/2007/EC of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as

regards *Fusarium* toxins in maize and maize products.
Off J Eur Union, 2007; L255: 14–17.

26 Coppock RW, Swanson SP, Gelberg HB, et al.. Preliminary study of the pharmacokinetics and toxicopathy of deoxynivalenol (vomitoxin) in swine.
Am J Vet Res, 1985; 46: 169–74.

27 Cote ML, Beasley RV, Bratich PM, Swanson SP, Shivaprasad HL, Buck WB. Sex-related reduced weight gains in growing swine fed diets containing deoxynivalenol.
J Anim Sci, 1985; 61: 942–50.

28 Dänicke S, Goyarts T, Döll S, Grove N, Spolders M, Flachowsky G. Effects of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol on tissue protein synthesis in pigs.
Toxicol Lett, 2006; 165: 297–311.

29 Dänicke S, Brüssow KP, Goyarts T, Valenta H, Ueberschär KH, Tiemann U. On the transfer of the *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) from the sow to the full-term piglet during the last third of gestation.
Food Chem Toxicol, 2007; 45: 1565–74.

30 Diaz-Llano G, Smith TK. Effects of feeding grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins with and without a polymeric glucomannan adsorbent on reproductive performance and serum chemistry of pregnant gilts.
J Anim Sci, 2006; 84: 2361–6.

31 Diaz-Llano G, Smith TK. The effects of feeding grains naturally contaminatedwith *Fusarium* mycotoxins with and without a polymeric glucomannan adsorbenton lactation, serum chemistry and reproductive performance after weaning of first-parity lactating sows. J Anim Sci, 2007; 85: 1412–23.

32 Döll S, Dänicke S. The *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. Pre Vet Med, 2011; 102(2): 132–45.

33 Dumitrescu G, Drinceanu D, Stef L, Boca L, Taranu I, Marin D. Alteration on histological structure of some organs induced by low levels of DON mycotoxin in weaned piglets. Archiva Zootech, 2008; 11(2): 12–20.

34 Duan WR, Gamer DS, Williams SD, Funckes-Shippy CL, Spath IS, Bloome EAG. Comparison of immunohistochemistry foractivated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. J Pathol, 2003; 199: 221–8.

35 Elmore SA. Enhanced histopathology of the thymus.
Toxicol Pathol, 2006; 34: 656–65.

36 Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death.
Toxicol Pathol, 2007; 35(4): 495–516.

37 Eriksen GS, Pettersson H, Lundh T. Comparative cytotoxicity of deoxynivaenol, nivalenol, their acetylated derivates and de-epoxy metabolites. Food Chem Toxicol, 2004; 42(4): 619–24.

38 Ferrari L, Cantoni AM, Borghetti P, De Angelis E, Corradi A. Cellular immune response and immunotoxicity induced by DON (deoxynivalenol) in piglets. Vet Res Commun, 2009; 33(Suppl 1): S133–5.

39 Fink-Gremmels J. Mycotoxins: their implications for human and animal health. Vet Q, 1999; 21(4): 115–20.

40 Fink-Gremmels J, Malekinejad H. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. Anim Feed Sci Technol, 2007; 137: 326–41.

41 Forsell JH, Jensen R, Tai JH, Witt M, Lin WS, Pestka JJ. Comparison of acute toxicities of deoxynivalenol (vomitoxin) and 15-acetyldeoxynivalenol in the B6C3F1 mouse. Food Chem Toxicol, 1987; 25(2): 155–62.

42 Forsyth DM, Yoshizawa T, Morooka N, Tuite J. Emetic and refusal activity of deoxynivalenol to swine. Appl Environ Microbiol, 1977; 34: 547–52.

43 Friedman L, Gaines DW, Eppley R, Smith MC, Chi RK, Braunberg RC. Effect of T-2 toxin (T2), deoxynivalenol (DON), zearalenon (Z) and DON+Z on macromolecular synthesis by male rat spleen slices. FASEB J, 1996; 10: A458.

44 Friend DW, Trenholm HL, Elliot JI, Thompson BK, Hartin KE. Effect of feeding vomitoxin-contaminated wheat to pigs. Can J Anim Sci, 1982: 62: 1211–22.

45 Friend DW, Trenholm HL, Fiser PS, Thompson BK, Hartin BK. Effect on dam performance and fetal development of de-oxynivalenol (vomitoxin)-contaminated wheat in the diet of pregnant gilts. Can J Anim Sci, 1983; 63: 689–98.

46 Friend DW, Thompson BK, Trenholm HL, Hartin KE, Prelusky DB. Effects of feeding deoxynivalenol (DON)-contaminated wheat diets to pregnant and lactating gilts and on their progeny. Can J Anim Sci, 1986; 66: 229–36.

47 Friend DW, Trenholm JL, Thompson BK, Prelusky DB, Hartin KE. Effect of deoxynivalenol (DON)-contaminated diet fed to growing-finishing pigs on their performance at market weight, nitrogen retention and DON excretion. Can J Anim Sci, 1986a; 66: 1075–85.

48 Friend DW, Thompson BK, Trenholm HL, Hartin KE, Prelusky DB. 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, 1986b; 66: 765–75.

49 Friend DW, Thompson BK, Trenholm BK, Hartin KE, Prelusky DB. Effects of

feeding deoxynivalenol (DON)-contaminated wheat diets to pregnant and lactating gilts and on their progeny. Can J Anim Sci, 1986c; 66: 229–36.

50 Friend DW, Thompson BK, Trenholm HL, Boermans HJ, Hartin KE, Panich PL. Toxicity of T-2 toxin and its interaction with deoxynivalenol when fed to young pigs. Can J Anim Sci, 1992; 72: 703–11.

51 Gerez JR, Pinton P, Callu P, Grosjean F, Oswald PI, Bracarense APFL. Deoxynivalenol alone or in combination with nivalenol and zearalenone induce systemic histological changes in pigs. Experimet toxicol Pathol, 2015; 67: 89–98.

52 Gillett NA, Chan C. Application of immunohistochemistry in the evaluation of immunosuppresive agents. Hum Exp Toxicol, 2000; 19: 251–4.

53 Goyarts T, Dänicke S. Bioavailability of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) from naturally contaminated wheat for the pig.
Toxicol Lett, 2006; 163: 171–82.

54 Goyarts T, Grove N, Dänicke S. Effects of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol from naturally contaminated wheat given subchronically of as one single dose on the in vivo protein synthesis of peripheral blood lymphocytes and plasma proteins in the pig. Food Chem Toxicol, 2006a; 44: 1953–65.

55 Goyarts T, Dänicke S, Grove N, Tiemann U, Rothkötter HJ. Methodical aspects of in vitro proliferation of porcine blood lymphocytes when exposed to deoxynivalenol (DON). Landbauforsch Völkenrode, 2006b; 56(3/4): 139–48.

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

57 Goyarts T, Brüssow KP, Valenta H, Tiemann U, Jäger K, Dänicke S. On the effects of the Fusarium toxin deoxinivalenol (DON) administered per os or intraperitoneal infusion to sows during days 63 to 70 of gestation. Mycotoxin Res, 2010; 26: 119–31.

58 Grenier B, Loureiro-Bracarense AP, Lucioli J, et. al.. Individual and combined effects of subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisins in piglets.
Mol Nutr Food Res, 2011; 55: 761–71.

59 Grove JF. Macrocyclic trichothecenes. Nat Prod Rep, 1993; 10: 429–48.

60 Gutzwiller A. Effects of deoxinivalenol (DON) in the lactation diet on the feed intake and fertility of sows. Mycotoxin Res, 2010; 26: 211–215.

61 Hale LP, Clark AG, Li J, Greer PK, Byers Kraus V. Age-releted tymic atrophy in the guinea pig. Dev Comp Immunol, 2001; 25: 509–18.

62 Hamilton PW, Allen DC. Morphometry in histopathology.

J Pathology, 1995; 175: 369–79.

63 Harvey RB, Kubena LF, Huff WE, et al.. Effects of aflatoxin, deoxynivalenol, and their combinations in the diets of growing pigs. Am J Vet Res, 1989; 50: 602–7.

64 Hunder G, Schüman K, Strugala G, et al.. Influence of subchronic exposure to low dietary deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, on intestinal absorption of nutrients in mice. Food Chem Toxicol, 1991; 29: 809–14.

65 Iordanov MS, Pribnow D, Magun JL, et al.. Ribotoxic stress response: activation of the stress-activated protein kinase JNK1 by inhibitirs of the peptydil transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the alpha-sarcin/ricin loop in the 28S rRNA. Mol Cell Biol, 1997; 17: 3373–81.

66 Jakovac-Strajn Breda. Imunosupresivni učinek krme, naravno konataminirane z mikotoksinom deoksinivalenolom (DON) na mlade plemenske svinje v obporodnem obdobju: doktorska disertacija. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2008.

67 Jakovac-Strajn B, Vengušt A, Pestevšek U. Effects of a deoxynivalenol-contaminated diet on the reproductive performance and immunoglobulin concentrations in pigs. Vet Rec, 2009; 165: 713–8.

68 Joling P, Bianchi AT, Kappe AL, Zwart RJ. Distribution of lymphocyte subpopulations in thymus, spleen, and peripheral blood of specific pathogen free pigs from 1 to 40 weeks of age. Vet Immunol Immunopathol, 1994; 40(2): 105–17.

69 Jurca J. Osnove imunologije. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2003: 3–105.

70 Kališnik M. Temelji stereometrije. 3. izd.. Ljubljana: Društvo za stereologijo in kvantiativno analizo slike, 2002.

71 Kališnik M. Oris histologije z embriologijo. 4. izd. Ljubljana: Medicinska fakulteta, 2003: 188–200.

72 Key G, Kubbutat MH, Gerdes J. Assessment of cell proliferation by means of an enzyme-linked immunosorbent assay based on the detection of the Ki-67 protein. J Immunol Methods 1994; 177: 113–7.

73 Lewczuk B, Przybylska-Gornowicz B, Gajecka M, et al.. Histological structure of duodenum in gilts receiving low doses of zearalenone and deoxynivalenol in feed. Experiment Toxicol Pathol, 2016; 68: 157–66.

74 Malovrh T, Jakovac-Strajn B. Feed contaminated with *Fusarium* toxins alter lymphocyte proliferation and apoptosis in primiparous sows during the perinatal period. Food Chem Toxicol, 2010; 48: 2907–12.

75 Marin DE, Taranu I, Manda G, Nagoe I, Oswald IP. In vitro effect of deoxynivalenol on porcine lymphocyte immune functions. Archiva Zootech 2006; 9: 10–8.

76 Marrs TC, Edginton JA, Price PN, Upshall DG (1986). Acute toxicity of T2 mycotoxin to the guinea-pig by inhalation and subcutaneous routes.
Br J Exp Pathol, 1986; 67: 259–68.

77 Marzocco S, Russo R, Bianco G, Autore G, Severino L. Pro-apoptotic effects of nivalenol and deoxynivalenol trichothecenes in J774A.1 murine macrophages.
Toxicol Lett, 2009; 189(1): 21–6.

78 Mason DY, Cordell J, Brown M, Pallesen G, Ralfkiaer E, Rothbard J, et al.. Detection of cells in paraffin wax embedded tissue using antibodies against a peptide sequence from the CD3 antigen. J Clin Pathol, 1989; 42: 1194–200.

79 McCormick D, Chong H, Hobbs C, Datta C, Hall PA. Detection of Ki67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. Histopathology, 1993; 22: 355–60.

80 Meky FA, Hardie LJ, Evans SW, Wild CP. Deoxynivalenol-induced immunomodulation of human lymphocyte proliferation and cytokine production.
Food Chem Toxicol, 2001; 39: 827–36.

81 Mikami O, Yamaguchi H, Murata H, Nakajima Y, Miyazaki S. Induction of apoptotic lesion in liver and lymphoid tissues and modulation of cytokine mRNA expression by acute exposure to deoxynivalenol in piglets.
J Vet Sci, 2010; 11(2): 107–13.

82 Moon Y, Pestka JJ. Vomitoxin-induced cyclooxygenase-2 gene expression in macrophages in mediated by activation of ERK and p38 but not JNK mitogen-activated protein kinases. Toxicol Sci, 2002; 69: 373–82.

83 Morgavi DP, Riley RT. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feed contaminated with *Fusarium* toxins. Anim Feed Sci Technol, 2007; 137: 201–12.

84 Morooka N, Uratsuji N, Yoshizawa T, Yamamoto H. Studies on the toxic substances in barley infected with *Fusarium spp*.
J Food Hyg Soc Jpn, 1972; 13: 368–75.

85 Nakajima Y, Mikami O, Yoshioka M, et al.. Involvement of apoptosis in the endotoxemic lesions of the liver and kidneys of piglets.
J Vet Med Sci 2000; 62(6): 621–6.

86 NRC. Nutrient Requirements of Domestic Animals. 10. Nutrient Requirements of Swine. National Academy Press, 1998: 117–21.

87 Obremski K, Zielonka L, Gajecka M, et al.. Histological estimation of the small intestine wall after administration of feed containing deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenone in the pig. Polish J Vet Sci, 2008; 11(4): 339–45.

88 Osweiler GD. Mycotoxins. In: Straw BE, eds. Diseases of swine. 8th ed. Ames: Iowa State University Press, 1999: 731–43.

89 Pearse G. Normal structure, function and histology of the thymus. Toxicol Pathol, 2006a; 34: 504–14.

90 Pearse G. Histopathology of the thymus. Toxicol Pathol, 2006b; 34: 515–47.

91 Pestka JJ, Lin WS, Miller ER. Emetic activity of the trichothecene 15-acetyldeoxynivalenol in swine. Food Chem Toxicol, 1987; 25: 855–8.

92 Pestka JJ, Zhou HR, Moon Y, Chung YL. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. Toxicol Lett, 2004; 153: 61–73.

93 Pestka JJ. Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and animal health risks. Anim Feed Sci Technol, 2007; 137: 283–98.

94 Pestka JJ, Islam Z, Amuzie CJ. Immunochemical assessment of deoxynivalenol tissue distribution following oral exposure in the mouse. Toxicol Lett, 2008; 178: 83–7.

95 Pestka JJ. Toxicological mechanisms and potential health effects of deoxynivalenol and nivalenol. World Mycotoxin J, 2010a; 3(4): 323–47.

96 Pestka JJ. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. Arch Toxicol, 2010b; 84: 663–79.

97 Pierron A, Alassane-Kpembi I, Oswald IP (2016). Impact of two mycotoxins deoxynivalenol and fumonisin on pig intestinal health. Porcine Health Manag, 2016; 2: e21(8pp.) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5382503/pdf/40813_2016_Article_41.pdf

98 Pinton P, Accensi F, Beauchamp E, et al.. Ingestion of deoxynivalenol (DON) contaminated feed alters the pig vaccinal immune responses. Toxicol Lett, 2008; 177: 215–22.

99 Prelusky DB, Hartin KE, Trenholm HL, Miller JD. Pharmacokinetic fate of 14C-labeled deoxynivalenol in swine. Fundam Appl Toxicol, 1988; 10: 276–86.

100 Prelusky DB, Trenholm HL. Tissue distribution of deoxynivalenol in swine dosed intravenously. J Agric Food Chem, 1991a; 39: 748–51.

101 Prelusky DB, Trenholm HL. Non-accumulation of residues in pigs consuming deoxynivalenol contaminated diets. J Food Sci, 1991b; 57: 801–2.

102 Prelusky DB, Trenholm HL. Non-accumulation of residues in swine tissue following

extended consumption of deoxynivalenol-contaminated diets.
J Food Sci, 1992; 57: 801–2.

103 Prelusky DB, Gerdes RG, Underhill, et al.. Effects of low-level dietary deoxynivalenol on the haematological and clinical parameters of the pig. Nat Toxins, 1994; 2: 97–104.

104 Ramos-Vara JA, Kiupel M, Baszler T, et al.. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories.
J Vet Diagn Invest, 2008; 20: 393–413.

105 Reid IM. Morphometric methods in veterinary pathology: a review.
Vet Pathol, 1980; 17: 522–43.

106 Resenders AR, Majo N, Segales J, et al.. Apoptosis in normal lymphoid organs from healthy normal, conventional pigs at different ages detected by TUNEL and cleaved caspase-3 immunohistochemistry in paraffin-embedded tissues.
Vet Immunol Immunopathol, 2004; 99: 203–13.

107 Rigler L. Anatomija domačih živali. Angiologia in integumentum commune. skripta za študente veterinarstva. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1992: 238–363.

108 Rigler L. Anatomija domačih živali. Splanchologia: skripta za študente veterinarstva. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2000: 179–85.

109 Robbana-Barnat S, Loridon-Rosa B, Lafarge-Frayssinet C, Cohen H, Neish GA, Frayssinet C. Protein synthesis inhibition and cardiac lesion associated with deoxynivalenol ingestion in mice. Food Addit Contam, 1987; 4: 49–55.

110 Roth JA, Thacker EL. Immun system. In: Straw BE, Zimmerman JJ, eds. Diseases of swine. 9th ed. Ames: Blackwell, 2006: 15–31.

111 Rothkötter HJ, Pabst R. Lymphocyte subsets in jejunal and ileal Peyer`s patches of normal and gnotobiotic minipigs. Immunology, 1989; 67: 103–8.

112 Rothkötter HJ. Anatomical particularities of the porcine immune system: a physician`s view. Dev Comp Immunol, 2009; 33: 267–72.

113 Rotter BA, Thompson BK, Rotter RG. Optimization of the mouse bioassay for deoxynivalenol as an alternative to large animal studies.
Bull Environ Contam Toxicol, 1994a; 53: 642–7.

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

115 Rotter BA, Thompson BK, Lessard M. Effect of deoxynivalenol-contaminated diet on performance and blood parameters in growing swine.
Can J Anim Sci, 1995; 75: 297–302.

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

117 Santin E. Mould growth and mycotoxin production. In: Diaz DE, ed. The mycotoxin blue book. Nottingham: University Press, 2005: 225–35.

118 Sarma M, Kalita SN, Sarma K. Histology of thymus of indigenous and crossbred piglets during postnatal development. Indian Anim Sci, 2004; 74(12): 1194–6.

119 Sarma M, Kalita SN, Baishya G. Ontogenic study of the thymus of indigenous and crossbred pigs during postnatal life (0–30 days). Indian J Anim Sci, 2005; 75(6): 634–6.

120 Sato M, Mikami O, Kobayashi M, NakajimaY. Apoptosis in the lymphatic organs of piglets inoculated with classical swine fever virus. Vet Microb, 2000; 75: 1–9

121 Sergent T, Parys M, Garsou S, Pussemier L, Schneider YL, Larondelle Y. Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular metabolism at realistic intestinal concentrations. Toxicol Lett, 2006; 164: 167–76.

122 Smith TK, MacDonald EJ. Effect of fusaric acid on brain regional neurochemistry and vomiting behaviour in swine. J Anim Sci, 1991; 69: 2044–9.

123 Smith TK, Sousadias MG. Fusaric acid content of swine feedstuffs. J Agric Food Chem, 1993; 41: 2296–8.

124 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, 1997; 75: 2184–91.

125 Smith TK, Diaz G, Swamy HVL. Current concepts in mycotoxicoses in swine. In: Diaz DE, ed. The mycotoxin blue book. Nottingham: University Press, 2005: 235–49.

126 Sinkora M, Stepanova K, Butler JE, et al.. Ileal Peyer's patches are not necessary for systemic B cell development and maintenance and do not contribute significantly to the overall B cell pool in swine. J Immunolo, 2011; 187: 5150–61.

127 Streit E, Schatzmayr G, Tassis P, et al.. Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed: focus on Europe. Toxins, 2012; 4: 788–809.

128 Surai PF, Dvorska JE. Effects of mycotoxins on antioxidant status and immunity. In: Diaz DE, ed. The mycotoxin blue book. Nottingham: University Press, 2005: 93–139.

129 Tiemann U, Brüssow KP, Dannenberger D, et al.. The effect of feeding a diet naturally contaminated with deoxinivalenol (DON) and zearalenone (ZON) on the spleen and

liver of sow and fetus from day 35 to 70 of gestation. Toxicol Lett, 2008; 179: 113–7.

130 Tizard IR. Veterinary immulogy. 7th ed. St. Louis: Saunders, Elsevier, 2004: 78–91.

131 Tizard IR. Veterinary immulogy. 8th ed. St. Louis: Saunders, Elsevier, 2009: 112–27.

132 Trenholm HL, Hamilton RMG, Friend DW, Thompson BK, Hartin KE. Feeding trials with vomitoxin (deoxynivalenol)-contaminated wheat: effect on swine, poultry, and dairy cattle. J Am Vet Med Assoc, 1984; 185(5): 527–31.

133 Tryphonas H, O'Grady L, Arnold DL, McGuire PF, Karpinski K, Vesonder RF. Effect of deoxynivalenol (vomitoxin) on the humoral immunity of mice.
Toxicol Lett, 1984; 23: 17–24.

134 Tunnacliffe HA, Olsson C, Traunecker A, Krissansen GW, Karjalainen K, De la Hera A. The majority of CD3 epitopes are conferred by the epsilon chain. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, et al., editors. Leukocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of 4th International workshop and conference; 1989 Feb 21-25; Vienna, Austria. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University press, 1989; 295–6.

135 Van Kol SWM, Hendriksen PJM, van Loveren H, et al.. The effects of deoxynivalenol on gene expression in the murine thymus.
Toxicol Appl Pharmacol, 2011; 250: 299–311.

136 Vesonder RF, Ciegler A, Jensen AH. Isolation of the emetic principle from Fusarium-infected corn. Appl Environ Microbiol, 1973; 26: 1008–10.

137 Vesonder RF, Hesseltine CW. Vomitoxin: natural occurrence on cereal grains and significance as a refusal of emetic factor to swine.
Process Biochem, 1980/81; 16(1): 12–5.

138 Vozelj M. Temelji imunologije. Ljubljana: Državna založba Slovenije, 1985: 5–469.

139 Weaver GA, Kurtz HJ, Bates FY, et al.. Acute and chronic toxicity of T-2 mycotoxin in swine. Vet Rec, 1978; 103: 531–5.

140 Widestrand J, Pettersson H. Effect of time, temperature and solvent on the stability of T-2 toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol and nivalenol calibrants.
Food Addit Contam, 2001; 18(11): 987–92.

141 Wippermann W, Reischauer A, Jäger K, Tiemann U, Dänicke, Schoon HA. Does the exposure of pregnant sows to deoxynivalenol (DON) affect fetal organs? A pathomorphological and immunohistochemical study. In: The 31st Mycotoxin-Workshop: Conference abstracts: Münster, Germany, 2009: 16.

142 Wippermann W. Diaplazentare Deoxinivalenolintoxikation bei Schweinefeten. Lassen sich am 70. Trachtigkeitstag histomorphologisch und immunhistologisch diagnostisch verwertbare Befunde erheben? Inaugural-dissertation. Leipzig: Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, 2011.

143 Yang GH, Jarvis BB, Chung YJ, Pestka JJ. Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: relationship to ERK, p 38 MAPK and SAPK/JNK activation. Toxicol Appl Pharmacol, 2000; 164: 149–60.

144 Young LG, McGirr L, Valli VE, Lumsden JH, Lun A. Vomitoxin in corn fed to young pigs. J Anim Sci, 1983; 57: 655–64.

145 Zielonka Ł, Wisniewska M, Gajecka M, Obremski K, Gajecki M. Influence of low doses of deoxynivalenol on histopathology of selected organs of pigs. Polish J Vet Sci, 2009; 12(1): 89–95.

146 Zhou HR, Islam Z, Pestka JJ (2003). Rapid sequential activation of mitogen-activated protein kinases and transcription precedes proinflammatory cytokine mRNA expression in spleens of mice exposed to the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol). Toxicol Sci, 2003; 72: 130–42.

147 Žust J, Vengušt A, Pestevšek U. Kontaminacija krme z mikroorganizmi in njihovimi toksičnimi presnovki. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2004: 45–54.

148 Žust J, Vengušt A, Pestevšek U. Kontaminacija krme z mikroorganizmi in njihovimi toksičnimi presnovki. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2004: 91–110.

11 PRILOGE

Delo ne vsebuje prilog.