

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaft  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie  
des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Einfluss von Mykotoxinen auf den Gehalt an Retinol und Retinylestern im  
Serum und in der Leber sowie auf ausgewählte Blutparameter beim  
präpubertären weiblichen Schwein**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Stephan Gericke  
Tierarzt aus Potsdam

Berlin 2007

Journal-Nr.: 3011

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. H. Martens  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. F.J. Schweigert  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. J. Zentek

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*  
mycotoxins, deoxynivalenol, zearalenone, pig, retinol, retinyl esters

Tag der Promotion: 16.03.2007

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*  
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen  
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über  
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN-13: 978-3-86664-457-1

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2007  
D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.  
Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder  
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in  
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,  
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch  
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der  
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von  
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.  
No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written  
authorization of the publisher.

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>3</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT</b> .....	<b>4</b>
2.1 GESCHICHTLICHER ÜBERBLICK .....	4
2.2 VORKOMMEN VON FUSARIENARTEN .....	6
2.3 DIE MYKOTOXINE DEOXYNIVALENOL UND ZEARALENON.....	11
2.3.1 <i>Mykotoxine in Lebens- und Futtermitteln</i> .....	13
2.3.2 <i>Wechselwirkungen zwischen Mykotoxinen</i> .....	18
2.3.3 <i>Deoxynivalenol beim Schwein</i> .....	19
2.3.4 <i>Zearalenon beim Schwein</i> .....	21
2.3.5 <i>Ernährung des Schweins</i> .....	23
2.5 VITAMIN-A-STOFFWECHSEL.....	25
2.5.1 <i>Allgemeine Definitionen</i> .....	25
2.5.2 <i>Transport und Metabolismus</i> .....	26
2.5.3 <i>Wirkungen von Vitamin A</i> .....	29
2.6 VITAMIN E.....	31
2.7 VITAMINE IN DER SCHWEINEZUCHT .....	32
2.8 INTERAKTIONEN ZWISCHEN MYKOTOXINEN UND DEN VITAMINEN A UND E .....	34
2.9 BLUTLIPIDE UND LIPOPROTEINSTOFFWECHSEL.....	35
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>38</b>
3.1 PROBENGEWINNUNG, PROBENAUFARBEITUNG .....	38
3.2 BESTIMMUNG VON VITAMIN E, RETINOL UND RETINYLESTERN IN SERUM UND LEBER MITTELS HPLC .....	40
3.2.1 <i>Eichung der HPLC</i> .....	40
3.2.2 <i>Probenvorbereitung</i> .....	41
3.2.3 <i>HPLC-Analyse</i> .....	42
3.4 ENZYMATISCHER TEST ZUR BESTIMMUNG VON TRIACYLGLYCERIDEN.....	43
3.5 ENZYMATISCHER TEST ZUR BESTIMMUNG VON CHOLESTEROL .....	43

3.6	PROTEINBESTIMMUNG MITTELS BCA .....	44
3.7	SDS- POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE .....	45
3.8	SEMIQUANTITATIVER RBP-NACHWEIS MITTELS WESTERNBLOT .....	46
3.9	DATENANALYSE UND STATISTIK.....	48
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>49</b>
4.1	ERGEBNISSE DER ALUMINIUMSILICATSTUDIE .....	49
4.1.1	<i>Ergebnisse FAL</i> .....	49
4.1.2	<i>Ergebnisse zur Bestimmung von Retinol, Retinylestern und <math>\alpha</math>-Tocopherol</i> .....	50
4.1.3	<i>Ergebnisse der enzymatischen Methoden</i> .....	51
4.1.4	<i>Qualitativer RBP – Nachweis und Quantifizierung</i> .....	53
4.2	ERGEBNISSE DER DOSISABHÄNGIGEN FÜTTERUNG VON DEOXYNIVALENOL UND ZEARALENON .....	55
4.2.1	<i>Ergebnisse FAL</i> .....	55
4.2.2	<i>Daten zur Bestimmung von Retinol und Retinylestern</i> .....	56
4.2.3	<i>Ergebnisse der enzymatischen Methoden</i> .....	56
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>58</b>
5.1	WIRKUNGEN DES DETOXIFIKATIONSMITTELS .....	59
5.2	DOSISABHÄNGIGEN FÜTTERUNG VON DEOXYNIVALENOL UND ZEARALENON .....	65
5.3	VERGLEICHENDE UND ABSCHLIEßENDE BETRACHTUNGEN .....	67
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>74</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>84</b>
	<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>85</b>

# 1 Einleitung

Es ist notwendig, die physiologische Grundlagen der Beeinträchtigung von Organismen durch Mykotoxine genau zu verstehen, um für den Verbraucher unbedenkliche Lebensmittel zu erzeugen und die Tiere vor gesundheitlichen Schäden zu schützen. Mykotoxine sind für Mensch, Tier und Pflanze giftige Naturstoffe, die im Rahmen des Sekundärstoffwechsels von Micromyceten gebildet werden und ein sehr breit gefächertes Wirkspektrum besitzen. Ziel dieser Doktorarbeit war es, den Einfluss von Mykotoxinen auf den Gehalt der fettlöslichen Vitamine A und E beim präpubertären weiblichen Schwein abzuschätzen. Die Spezies Schwein wurde aufgrund ihrer sensitiven Reaktion auf die untersuchten Mykotoxine gewählt.

Die durchgeführten Analysen gliedern sich in eine umfassende Studie zu Strategien der Detoxifikation der Mykotoxine Deoxynivalenol und Zearalenon beim Schwein des Institut für Tierernährung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft ein. Dort wurde die Effizienz des Detoxifikationsmittels Aluminiumsilicat mit Hinblick auf die genannten Toxine anhand spezifischer Parameter validiert. Vorher wurde die Sensitivität der Tiere auf verschiedene kritische Dosierungen der Giftstoffe betrachtet, um solche spezifischen Parameter zu detektieren.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden in Serum und Leber von insgesamt 90 präpubertären weiblichen Schweinen die Gehalte an Retinol und Retinylestern und außerdem weitere Serumparameter, wie das Vitamin E, das Retinol-Bindungsprotein, Protein-, Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen bestimmt. Beide Vitamine stehen in enger Beziehung zueinander, da sie entscheidende Funktionen während der Reproduktion haben, Vitamin E regulierend in die Hydrolyse der Retinylester eingreift und oxidationsprotektiv auf Vitamin A wirkt. Mögliche Veränderungen betreffen nicht nur den Stoffwechsel der beiden fettlöslichen Vitamine, sondern ließen auch Rückschlüsse auf Beeinträchtigung ihrer Funktionen, vor allem in Hinblick auf das Immunsystem, bei Proliferation und Wachstum und bei oxidativen Vorgängen zu. Ziel war es, zu zeigen, ob die analysierten Parameter Veränderungen aufgrund einer Intoxikation mit Deoxynivalenol und Zearalenon unterliegen und ob durch die Verwendung des Aluminiumsilicates eine positive Beeinflussung erreicht wird bzw. sich sogar nachteilige Auswirkungen zeigen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Geschichtlicher Überblick

Mykotoxine, Gifte von einfachen Pilzen als Verursacher von Erkrankungen bei Mensch und Tier, sind bereits in der Bibel erwähnt. Allein aus dem Mittelalter sind etwa 300 Berichte über Mutterkornvergiftungen (Ergotismus) überliefert, bei der die Bevölkerung ganzer Dörfer ausgerottet wurde. So wurden im Jahre 943 in der Gegend von Limoges (Frankreich) 40.000 Menschen Opfer dieser schrecklichen Vergiftung. Und immer wieder gingen wahre Seuchenzüge des „heiligen Feuers“ (St. Antoniusfeuer), wie es damals in Unkenntnis der medizinisch-wissenschaftlichen Zusammenhänge genannt wurde, durch ganz Europa (Marasas 1996).

Aber auch in neuerer Zeit kam es zu Vorfällen im Zusammenhang mit Mykotoxinen. So vergiftete ein Bäcker in den 50-iger Jahren in Frankreich 200 seiner Kunden, da er mutterkornhaltiges Mehl verbacken hatte. Die Opfer klagten über Übelkeit, Kopfschmerzen, Erbrechen, Durchfälle, epilepsieähnliche Krämpfe (Veitstanz), Halluzinationen und brandige Gliedmaßen, die auch amputiert werden mussten. Schwangere Frauen erlitten Fehlgeburten. Demenz, Verkrüppelung, Rückenmarksdegeneration und häufig Tod durch Kreislaufversagen oder Atemlähmung charakterisieren den weiteren Verlauf der Erkrankung (Marasas 1996).

In der ehemaligen UdSSR kam es in den Jahren 1943/44 vermehrt zu einer Erkrankung, die „alimentäre toxische Aleukie“ genannt wird. Hier wird durch Nahrungsgifte das Knochenmark zerstört. Das Ergebnis ist eine Beeinträchtigung der Blutbildung mit daraus resultierender Blutarmut. Durch Kriegswirren war im Herbst 1943 das Getreide nicht abgeerntet worden und blieb, von Schnee bedeckt, auf den Halmen stehen. Es wurde erst im folgenden Frühjahr geerntet und verbraucht. Hierdurch konnten Fusarienpilze sich massiv vermehren und Gift bilden (Marasas 1996).

Auch bei Tieren ist es in neuerer Zeit zu Massenvergiftungen gekommen. Die moderne Tierhaltung in Westeuropa kommt ohne den Import von Eiweißfuttermitteln aus anderen

Klimazonen nicht aus. Dies führte 1960 zum sogenannten Truthahnsterben (turkey-x-disease) in England. Ursache war importiertes Erdnusschrot, welches von einem aflatoxinbildenden Pilz befallen war. Dieses Geschehen war ein Auslöser für die Intensivierung der Mykotoxinforschung (Marasas 1996).

Gelegentlich treten solche Pilze aufgrund der Aktualität ökologischer Anbaubedingungen vermehrt wieder auf, da an speziellen Höfen auf den Pflanzenschutzmitteleinsatz (Fungizide) verzichtet wird. In neuerer Zeit wurden wiederholt von Vergiftungen durch mutterkornhaltiges Biogetreide berichtet. So sorgte vor einigen Jahren im Raum Frankfurt ein Vergiftungsfall eines 11-jährigen Mädchens durch ein mutterkornhaltiges Biomüsli für erhebliches Aufsehen in der Presse. Das Kind litt an Doppelsehen, Schwindelanfällen und anhaltenden Gebärmutterblutungen (Marasas 1996). In Lebensmittelgeschäften und Naturkostläden angebotenes Getreide aus kontrolliert ökologischem Anbau ist nach einem Bericht des Archivs für Lebensmittelhygiene offenbar häufig mit Fusarientoxinen belastet. Nach dem Urteil der Autoren sogar in „ernstzunehmenden Konzentrationen“. Bei einer Untersuchung im Raum München fanden sie in Weizen, Roggen, Gerste und Mais Deoxynivalenol, Zearalenon und Fumosine nach eigenen Angaben in Konzentrationen bis zu 2,6 ppm (Marasas 1996). Andere systematische Erhebungen finden keinen Unterschied in der Belastung von konventionellen und biologisch-ökologischen Getreideprodukten (Czerwiecki et al. 2002a; Czerwiecki et al. 2002b; Marx et al. 1995).

Ende der 90er Jahre war das Getreide ungewöhnlich hoch mit den Mykotoxinen Deoxynivalenol und Zearalenon belastet (Döll et al. 2002). Als Hauptursache wird die feuchte Witterung im Sommer angesehen. Aufgrund der negativen Wirkung dieser Mykotoxine auf die Tiergesundheit kam es nun bereits zu Problemen in der Verwertung solchen Getreides.

Sowohl national als auch international wurde seitdem die Bedeutung der Mykotoxine für die Sicherheit von Lebens- und Futtermitteln zu einem neuen Schwerpunkt in Forschung und Überwachung. Umfangreiche Verordnungen der Europäischen Union zur Kontamination von Lebensmitteln mit Mykotoxinen und entsprechende Richtlinien zur Probennahme und Analysenmethode wurden veröffentlicht. Auch in Deutschland führte die zunehmende Beachtung und umfassende Überwachung der Fusarien-Leittoxine Deoxynivalenol und Zearalenon bei der

Beurteilung von Getreiden und deren Erzeugnissen - nicht nur in Lebensmitteln - natürlich zu einer steigenden Anzahl belasteter Proben (siehe 2.3.1). Mit der Aufnahme von Grenzwerten für Deoxynivalenol und Zearalenon in die nationale Gesetzgebung (Mykotoxin Höchstmengenverordnung MHmV; zuletzt geändert im Februar und September 2004) ging Deutschland sogar über die bisher durch EU-Verordnungen geforderten Rechtsgrundlagen hinaus.

## ***2.2 Vorkommen von Fusarienarten***

Den Fusarien kommt weltweit, insbesondere bei Getreide und Mais, eine große Bedeutung zu. Sie sind wenig spezialisierte Krankheitserreger an Kulturpflanzen, insbesondere an allen Getreidearten. Typische Getreidekrankheiten, die durch Fusarien ausgelöst werden, sind Auflaufkrankheiten (Erkrankungen der Getreidekeimlinge), Auswinterungsschäden unter einer Schneedecke auf ungefrorenem Boden, Fuß- und Stengel-, sowie Ähren-, Kolben- und Rispenkrankheiten (Schisler et al. 2002). Die Fusarien befallen überwiegend lebende Pflanzen und sind daher typische Feldpilze, die sich aber auch im Lager unter günstigen Bedingungen ausbreiten können. Um der Ausbreitung von Fusarien im Lager vorzubeugen, darf nur Erntegut mit einem Wassergehalt von höchstens 14% eingelagert werden, gegebenenfalls muss es vorher getrocknet werden (Miller 2002). Fusarien können durch partielle Taubähigkeit und die Bildung so genannter Schmachtkörner direkte Schäden am Feldertrag und dessen Qualität (zum Beispiel schlechtere Back-, Brau- und Saatgutqualität) verursachen, jedoch muss ein Fusarienbefall von Getreide nicht unbedingt mit einer Ertragsminderung einhergehen (Miller 2002). Befallene Körner können rosa bis weinrot gefärbt sein. Außerdem kann die Besiedelung mit Fusarienpilzen zur Kontamination der Erntegüter mit verschiedenen Mykotoxinen führen. Von Fusarien werden verschiedene meist hochgiftige Mykotoxine, mit sehr unterschiedlichen chemischen Strukturen gebildet. Bei den etwa 100 von Fusarien gebildeten Toxinen unterscheidet man drei Hauptgruppen, die Gruppe der Trichothecene, Zearalenon und die Fumosine.





- 1 = Myzel mit Querwänden  
 2 = Konidienbildung  
 3 = reife Makrokonidien

Abb. 1: Sporen eines mykotoxinbildenden Pilzes (modifiziert nach <http://schimmel-schimmelpilze.de/schimmelpilzgifte-mykotoxine.html>)

Bei den heimischen Getreidearten werden hauptsächlich Hafer, Mais und Weizen von Fusarien befallen (Birzele et al. 2000). Gerste und Roggen gelten als am wenigsten anfällig. Im Feld wirken zahlreiche Umweltfaktoren der Atmosphäre und des Bodens (unter anderem Feuchtigkeit und Temperatur) auf die wachsende Pflanze und beeinflussen die Mikroflora am Wuchsstandort. Pflanzenbauliche Maßnahmen, wie Fruchtfolge, Bodenbearbeitung, Sortenwahl und Pflanzenschutz, können sich sowohl hemmend als auch fördernd auf einen Befall der Pflanze mit Fusarienpilzen auswirken. Zur Verdeutlichung der Einflüsse auf die Mykotoxinbildung in Futtermitteln dient Abbildung 2.

Das Witterungsgeschehen während der Vegetationszeit ist ausschlaggebend für den Befall von Getreide mit Fusarien. Besonders bei verstärktem Niederschlag und Temperaturen über 20 °C zum Zeitpunkt der Getreideblüte kann es zu einem erhöhten Befall der Ähren kommen, da die Pilze Feuchtigkeit und Wärme für ihre Entwicklung benötigen (Miller 2001). Zudem werden die Pilzsporen durch Wind und Regenspritzer vom Boden aufgewirbelt und gelangen so schnell zu den oberen Pflanzenteilen, die sie dann unverzüglich infizieren können.

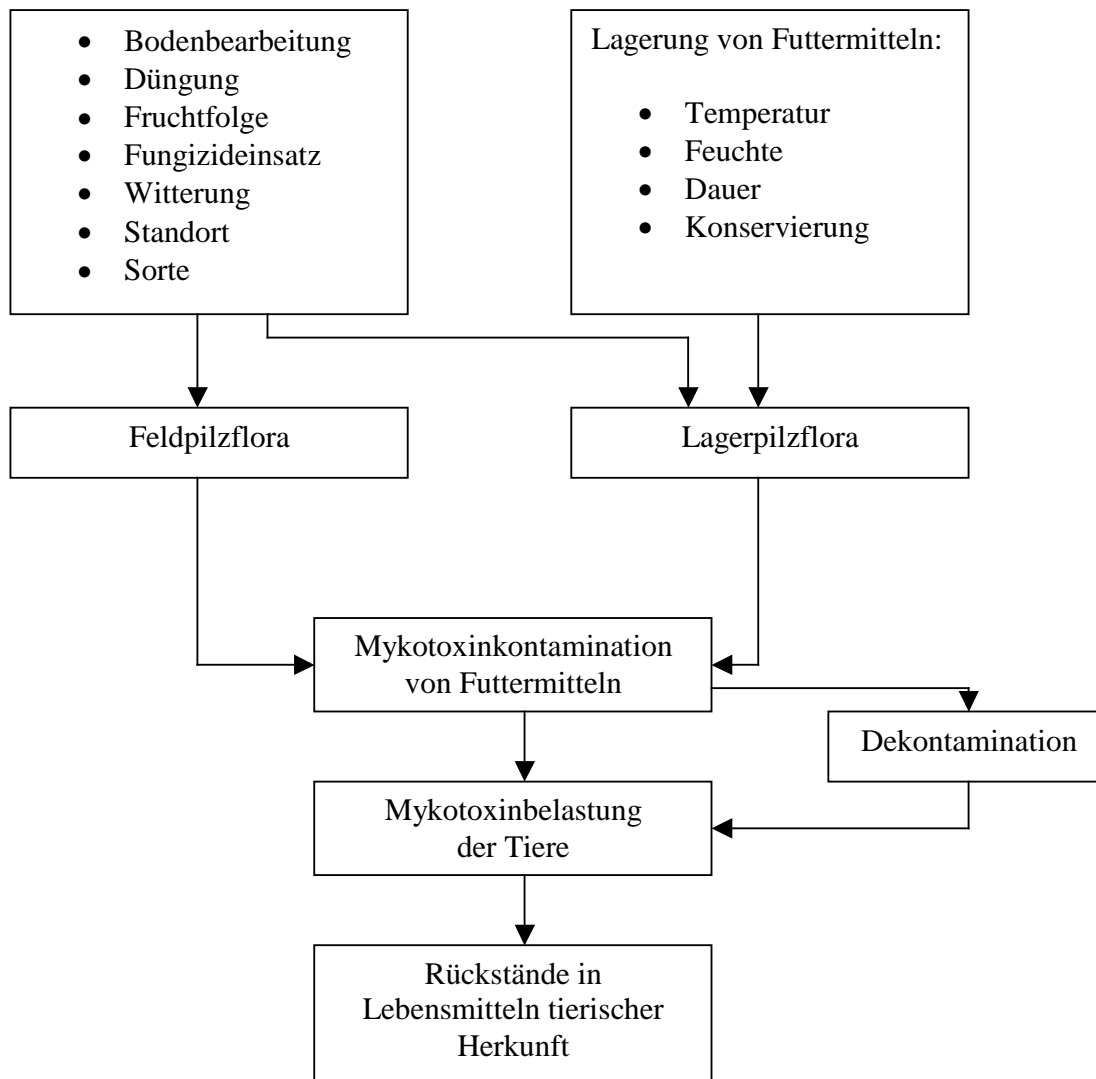


Abbildung 2: Einflüsse auf die Mykotoxinbildung in Futtermitteln, die Mykotoxinbelastung von Nutztieren sowie mögliche Rückstände in Lebensmitteln tierischer Herkunft (Dänicke et al. 2000)

Die Vorfrucht (die im Vorjahr angebaute Fruchtart) hat ebenfalls einen großen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit, mit der Getreide von Fusarien befallen wird. Bei einer engen Fruchtfolge mit hohem Getreideanteil (1 Jahr Blattfrucht, 2 Jahre Halmfrucht: z. B. Raps-Weizen-Weizen) folgen anfällige Pflanzenarten zeitlich unmittelbar aufeinander. Den Pilzen werden dadurch günstige

Entwicklungsmöglichkeiten geboten. Die Folge davon ist, dass das Risiko eines Fusarienbefalls erhöht ist. Wird die Fruchtfolge erweitert und der Getreideanteil darin verringert (z.B. Raps-Weizen-Erbсен-Weizen-Raps-Weizen-Senf-Hafer), findet der Pilz nicht genug geeignete Pflanzen bzw. Ernterückstände, die er für sein Wachstum, seine Vermehrung und seine Überdauerung braucht (Miller 2001). Auf diese Weise wird die Gefahr einer Infektion von Getreide mit Fusarien reduziert.

Im Winter überdauern Fusarien hauptsächlich auf abgestorbenen Pflanzenresten von Getreide oder Mais (Halme, Stroh, Stoppeln). Eine wendende Bodenbearbeitung (Pflügen) bringt die Pflanzenrückstände in tiefer gelegene Bodenschichten, so dass sich das Infektionsrisiko für die Folgefrucht erheblich verringert. Bei konservierenden Bodenbearbeitungsverfahren (z. B. Mulchsaat), mit denen der Boden vor Erosion geschützt werden kann, verbleiben Pflanzenrückstände, die mit Pilzsporen belastet sein können, an der Bodenoberfläche. Daraus kann sich ein Zielkonflikt zwischen Bodenschutz und Gesundheit der Folgefrucht ergeben. Landwirte, die bodenschützende Bearbeitungsverfahren anwenden, sollten daher weite Fruchtfolgen und geringer anfällige Getreidesorten auswählen.

Die Widerstandsfähigkeit verschiedener Getreidesorten gegenüber Fusarien beruht auf Unterschieden in der äußeren Gestalt (morphologische Eigenschaften) oder in den jahreszeitlich bedingten Wachstums- und Entwicklungsvorgängen (phänologische Eigenschaften) der Pflanzen (Scott 1993).

Chemische Pflanzenschutzmittel mit bestimmten Wirkstoffen (z. B. Azole) können bei termingerechter Anwendung zum Zeitpunkt der Getreideblüte sowohl das Wachstum von Fusarien als auch die Mykotoxinbildung in der Ähre deutlich reduzieren, jedoch nicht gänzlich verhindern. Eine Anwendung dieser pilzhemmenden Mittel (Fungizide) wird nur empfohlen, wenn ein hohes Risiko für einen Ährenbefall des Getreides besteht. Ein starker Fusarienbefall äußert sich oft in verfärbten (rötlich bis grau), kleineren und unregelmäßig geformten Körnern. Meist sind Körner jedoch nur gering mit Fusarien befallen und können mit bloßem Auge nicht von gesunden Körnern unterschieden werden. Ob in den Körnern Mykotoxine enthalten sind, kann man grundsätzlich nicht an äußeren Merkmale erkennen.

Nach der Ernte des Getreides folgen technische Reinigungsprozesse, bei denen die wertgebenden Bestandteile des Erntegutes (Körner) von wertmindernden Bestandteilen (z. B. Kümmerkorn, Spreu, Unkrautsamen, Steine) abgetrennt werden. Durch die Reinigung werden auch mykotoxinhaltige Bestandteile entfernt, so dass sich eine etwaige Belastung der Körner mit Mykotoxinen reduzieren kann (Miller 2001). Es schließen sich in der Regel Trocknungsprozesse an mit dem Ziel, das Getreide auf Feuchtigkeitsgehalte unter 14,5 % zu bringen. Durch den Feuchtigkeitsentzug werden die Voraussetzungen für eine sichere Lagerung geschaffen, da Veränderungen der Inhaltsstoffe im Getreidekorn weitgehend unterbunden und das Produkt vor mikrobiellem Verderb geschützt wird (Miller 2001). Bei sachgemäßer Trocknung und Lagerung der Getreidekörner können Schimmelpilze nicht weiterwachsen. Demzufolge ist auch eine weitere Mykotoxinbildung durch Fusarien ausgeschlossen. Die zuvor unter Feldbedingungen gebildeten Mykotoxine bleiben jedoch weitgehend erhalten.

In einer umfassenden Auswertung aller Analysenergebnisse einer im Rahmen der Europäischen Union in Auftrag gegebenen Untersuchung wurden für verschiedene EU-Länder die mittleren Kontaminationsmengen an Fusarientoxinen ermittelt (Creppy 2002). Daraus wurden auf der Basis einer geschätzten Verzehrsmenge von 62,5 kg Weizen pro Person und Jahr, die einer durchschnittlichen täglichen Aufnahme von 171 g pro Person entspricht, die tägliche Aufnahmemenge für Fusarientoxine aus Weizen geschätzt. Für Deutschland enthielten z. B. bei einer Gesamtzahl von 529 untersuchten Proben 63,3% Deoxynivalenol mit einer mittleren Konzentration von 122,4 µg/kg und 31,7% Zearalenon mit durchschnittlich 14,1 µg/kg. Daraus ergab sich eine geschätzte tägliche Aufnahme von 20,9 µg Deoxynivalenol und 2,41 µg Zearalenon (bzw. 0,30 µg und 0,034 µg pro Kilogramm Körpergewicht und Tag) (Creppy 2002).

Diese Aufnahmemengen wurden in der oben genannten Studie als nicht besonders besorgniserregend bei gesunden Erwachsenen erachtet, jedoch möglicherweise schon bei Kranken und Kindern. Es können jedoch höhere Werte erreicht werden, wenn die zuvor beschriebenen befallsfördernden Witterungsbedingungen in Kombination mit ungünstigen pflanzenbaulichen Maßnahmen zu einem hohen Fusariumbefall des Getreides führen. Es ist noch nicht ausreichend untersucht worden, ob sich eine langfristige Aufnahme von niedrigen Deoxynivalenol- bzw. Zearalenongehalten beim Menschen negativ auswirken kann, zum Beispiel auf das Immunsystem.

In Lebensmitteln tierischer Herkunft ist nicht oder mit marginalen Rückständen von Fusarientoxinen zu rechnen, da nach bisherigem Wissen durch den schnellen Metabolismus im Tierkörper sowohl Deoxynivalenol und als auch Zearalenon kaum in das Fleisch, in Innereien, in die Milch oder in Eier von landwirtschaftlichen Nutztieren übergehen (Bohm 1992).

### ***2.3 Die Mykotoxine Deoxynivalenol und Zearalenon***

Deoxynivalenol und Zearalenon gehören zu den Toxinen aus Fusarienarten (*F. graminearum* und *F. culmorum*). Diese Pilze erzeugen ein ganzes Spektrum zum Teil außerordentlich toxischer Substanzen, die neurotoxische, immuntoxische oder zytotoxische Wirkungen entfalten (Bennett et al. 2003).

Eine wichtige Gruppe der Fusarientoxine sind die Trichothecene. Diese stellen eine Familie von über 60 strukturverwandten Toxinen dar, die chemisch in vier Klassen unterteilt werden können. Allen gemeinsam ist eine Epoxidgruppe am C-12,13 sowie eine Doppelbindung an C-8,9 (Bennett und Klich 2003). Ihre toxische Potenz ist stark abhängig von der Natur der Seitenkette. Auffällig ist, dass bei den meisten Trichothecenen kaum Unterschiede in der parenteralen und enteralen Toxizität bestehen. Ferner nimmt die Toxizität in der Reihenfolge Maus, Ratte, Kaninchen, Meerschweinchen zu (Pieters et al. 2002). Für den Menschen muss mit einer noch höheren toxischen Potenz gerechnet werden (Pieters et al. 2002).

Die Trichothecene sind zytotoxische Substanzen. Sie hemmen die ribosomale Proteinsynthese durch Bindung an die 60-S-Einheit eukaryontischer Zellen (Bennett und Klich 2003). Prokaryonten sind weniger empfindlich. Der reaktionsfähige Teil ist offenbar die Epoxidgruppe, denn ihre Hydrolyse führt zur Inaktivierung (Jimenez und Mateo 1997). Dieses ist wahrscheinlich ein hepatischer Entgiftungsmechanismus (Jimenez und Mateo 1997). Die hohe zytotoxische Potenz zeigt sich in starken Schleimhautirritationen nach oraler Aufnahme mit Symptomen wie Übelkeit, Erbrechen und blutigen Durchfällen (Bennett und Klich 2003). Bei den systemischen Effekten stehen die immunsuppressiven Wirkungen im Vordergrund, die als zytotoxische Wirkung auf das Knochenmark aufzufassen sind (Bennett und Klich 2003). Hiermit in Zusammenhang stehen viele Sekundärerkrankungen, die endemisch bei Menschen und

Haustieren auftreten, die mit Fusarien kontaminiertes Getreide verzehren (Bennett und Klich 2003). Für einige Trichothecene konnte in Tieren eine teratogene Wirkung gezeigt werden (u.a. Deoxynivalenol) (Jackson et al. 1999). Dagegen gibt es keine Anhaltspunkte für eine mutagene oder direkt kanzerogene Wirkung (Jackson und Bullerman 1999). In Südafrika hat man allerdings eine positive Korrelation zwischen dem Gehalt an Deoxynivalenol in Mais und Ösophaguskrebs festgestellt (Hsia et al. 1988). Dieses könnte auf tumorpromovierende Effekte oder auch auf eine Schwächung des Immunsystems durch das Toxin zurückzuführen sein. Ein intaktes Immunsystem ist Voraussetzung für die natürliche Abwehr gegen Krebszellen. Weiterhin beeinflusst Deoxynivalenol potentiell die Genexpression, der direkte Beweis für die Modifikation von Prozessen, die involviert in die Initiation der mRNA-Translation sind steht allerdings noch aus (Wollenhaupt et al. 2005).

Auf Grund der sehr unterschiedlichen chemischen Strukturen der Trichothecene hat man 4 Untergruppen geschaffen, von denen die häufigsten die Typen A und B sind (Jimenez und Mateo 1997). Die Typ A Trichothecene sind charakterisiert durch eine Nicht-Ketogruppe am Kohlenstoffatom acht. Sie umfassen Toxine wie Mono- und Diacetoxyscirpenol, HT-2 Toxin, T-2 Toxin oder Neosolaniol. Zu den Typ B Trichothecenen, die durch eine Ketogruppe am Kohlenstoffatom acht gekennzeichnet sind, zählen Deoxynivalenol und Nivalenol. Die zum Beispiel von *Fusarium sporotrichioides* gebildeten Typ A Trichothecene wie T-2-Toxin und Neosolaniol waren Ursache der sogenannten Alimentären Toxischen Aleukie. Bei Getreide spielen diese Toxine heute eine untergeordnete Rolle. Typ A Trichothecene können aber bei Kartoffeln und Bananen vorkommen: Die Erreger der Trockenfäule von Kartoffeln *F. solani* und *F. sambucinum* sind potente Bildner von Diacetoxyscirpenol und die Infektion von Bananen mit *F. moniliforme* kann zur Kontamination der Früchte mit Diacetoxyscirpenol und Zearalenon führen (Jimenez und Mateo 1997). Zearalenon wird durch eine Reihe verschiedener Fusarien gebildet. Hauptbildner sind dieselben Pilze, die auch für die Deoxynivalenolbildung verantwortlich sind. Die Substanz besitzt eine ausgeprägte östrogene Wirksamkeit und wirkt anabol, hat aber nur eine sehr geringe Toxizität.

### 2.3.1 Mykotoxine in Lebens- und Futtermitteln

Mykotoxine sind futtermittelrechtlich als unerwünschte Stoffe geregelt. Unerwünschte Stoffe sind Stoffe – außer Tierseuchenerregern – die in oder auf Futtermitteln enthalten sind und die Gesundheit von Tieren, die Leistung von Nutztieren oder als Rückstände die Qualität der von Nutztieren gewonnenen Erzeugnisse, insbesondere im Hinblick auf ihre Unbedenklichkeit für die menschliche Gesundheit, nachteilig beeinflussen können (Zmudzki et al. 2004).

Für Futtermittel hat das Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (BMVEL) Orientierungswerte der Gehalte an den Mykotoxinen Deoxynivalenol und Zearalenon herausgegeben. Wenn die Mykotoxin-Gehalte der Futtermittel unter diesen Werten liegen, sind nach dem heutigen Wissensstand bei den Tieren keine durch Mykotoxine hervorgerufenen Gesundheitsstörungen zu erwarten. Bei Einhaltung der in der nachstehenden Tabelle wiedergegebenen Orientierungswerte für Deoxynivalenol und Zearalenon im Futter der Tiere ist davon auszugehen, dass Gesundheit und Leistungsfähigkeit der Tiere gewährleistet sind (BMVEL; Stand Juli 2000).

**Tabelle 1: Orientierungswerte für Konzentrationen von Deoxynivalenol und Zearalenon im Futter von Schwein, Rind und Huhn (mg/ kg Futter; bei 88 % Trockensubstanz), bei deren Unterschreitung die Gesundheit und Leistungsfähigkeit nicht beeinträchtigt wird (BMVEL; Stand Juli 2000)**

<i>Tierart bzw. Tierkategorie</i>	<i>Deoxynivalenol</i>	<i>Zearalenon</i>
<b><i>Schwein</i></b>		
<i>präpubertäre weibliche Zuchtschweine</i>	1,0	0,05
<i>Mastschweine und Zuchtsauen</i>	1,0	0,25
<b><i>Rind</i></b>		
<i>präruminierend</i>	2,0	0,25
<i>weibliches Aufzuchtrind/ Milchkuh</i>	5,0	0,5
<i>Mastrind</i>	5,0	- <sup>1</sup>
<b><i>Huhn</i></b>		
<i>(Legehühner, Masthühner)</i>	5,0	- <sup>1</sup>

<sup>1</sup> nach derzeitigem Wissensstand keine Orientierungswerte erforderlich

Die dargestellten Orientierungswerte wurden vom Institut für Tierernährung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) und dem Institut für Mikrobiologie und Toxikologie der Bundesanstalt für Fleischforschung (BAFF) unter Berücksichtigung von Anregungen der „Carry-Over-Arbeitsgruppe“ des BMVEL und der Gesellschaft für Mykotoxinforschung erarbeitet. Nach der gegenwärtigen Rechtsauffassung sind mykotoxinbelastete Futtermittel noch durch Verschneidung mit unbelasteten Chargen verkehrsfähig, ein Verbot nach EU-VO 2002/32 wird erst nach Umsetzung von verbindlichen Grenzwerten erwartet. Bisher trifft dies nur für Aflatoxin B1 zu.

Folgende Kontrollen sind Bestandteil der Empfehlungen der Europäischen Kommission zur Durchführung eines koordinierten Kontrollprogramms und wurden deshalb in das „Nationale Kontrollprogramm Futtermittelssicherheit“ (Deutschland) 2004 des BMVEL aufgenommen bzw. fortgeschrieben:

- Gehalt an bestimmten Mykotoxinen (Aflatoxin B1, Ochratoxin A, Zearalenon, Deoxynivalenol und Fumonisine)
- nicht zugelassene Zusatzstoffe, Verschleppungen von Zusatzstoffen und Tierarzneimitteln
- Einhaltung von Beschränkungen bei der Erzeugung und Verwendung von Einzelfuttermitteln tierischen Ursprungs.

Einer der Schwerpunkte der Kontrollen seit einigen Jahren ist also die Untersuchung auf bestimmte Mykotoxine. Dieser Empfehlung wird insofern nachgekommen, als im Jahr 2004 ca. 7800 Einzelbestimmungen auf Mykotoxine in Einzel- und Mischfuttermitteln durchgeführt worden sind.

Im Rahmen des Fusarien – und Fusarientoxin – Überwachungsprogrammes z.B. des Landes Sachsen-Anhalt konnte über die Jahre 2001 bis 2003 der Gehalt von Deoxynivalenol und Zearalenon in z.B. erntefrischem Winterweizen, Futterweizen und Weizennachprodukten (Kleie und Mehl) dokumentiert werden (Tabelle 2).



**Tabelle 2: Gehalte an Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA) in erntefrischem Getreide (bezogen auf 88% TM ) in Sachsen-Anhalt ([http://lsa-st23.sachsen-anhalt.de/llg/infothek/dokumente/fusa\\_moni.pdf](http://lsa-st23.sachsen-anhalt.de/llg/infothek/dokumente/fusa_moni.pdf))**

		2001	2002	2003
DON	belastete Proben %	55	86	58
	mittl.Gehalt µg/kg	131	234	214
	Gehalt von-bis	50-469	50-770	k. A.
ZEA	belastete Proben %	8	42	0 (unter 5 µg)
	mittl.Gehalt µg/kg	31	42	unter 5
	Gehalt von-bis	7-113	5-410	k. A.

k. A. = keine Angabe

Die unterschiedliche Empfindlichkeit der einzelnen Tierarten (Tabelle 3) spielt eine wichtige Rolle in Bezug auf die Wirksamkeit und die Folgen von Mykotoxinen. Die empfindlichste Tierart für die hier besprochenen Fusarientoxine ist das Schwein (Drochner 1989).

**Tabelle 3: Empfindlichkeit landwirtschaftlicher Nutztiere gegenüber Fusarientoxinen modifiziert nach (Dänicke et al. 2000)**

Tierart	Mykotoxin	
	Deoxynivalenol	Zearalenon
präpubertäre weibliche Zuchtschweine	+++	+++
Zuchtsauen	+++	++
Mastschweine	+++	++
Huhn	+	+
präruminierendes Rind	+++	++
weibliches Aufzuchttrind/ Milchkuh	+	++
Mastrind	+	+

+ wenig empfindlich

++ empfindlich

+++ sehr empfindlich

Zur Verringerung der Toxinbelastung für das Tier und damit des Ausbleiben einer Mischkontamination sind grundsätzlich vier Strategien möglich:

1. Präventivmaßnahmen zur geringen Toxinbildung auf den Kulturpflanzen
2. Detoxifikation im Futtermittel (-lager)
3. Chemisorption *in vivo*
4. Verfütterung, wenn keine Gefährdung für Tier und Mensch zu erwarten ist.

Bei der Beurteilung von Lebensmitteln und deren Sicherheit für den Verbraucher ist, wie bereits erwähnt, der Übergang von Mykotoxinen in Lebensmittel tierischer Herkunft als unbedeutend zu werten. Im Vordergrund steht hier die direkte Aufnahme belasteter Getreideprodukte durch den Menschen.

Auf Ebene der Europäischen Union erarbeitete das SCF (Scientific Committee on Food) Empfehlungen zur tolerierbaren täglichen Aufnahme (TDI) bei Deoxynivalenol von  $1\mu\text{g}/\text{kg}$  Körpergewicht und bei Zearalenon von  $0,2\mu\text{g}/\text{kg}$  KG für die Ernährung des Menschen. Während diese Werte bei Erwachsenen nach bisherigen Studien meist unterschritten werden, sind sie insbesondere bei der Ernährung von Kindern schnell erreicht. Mittels eines umfangreichen Berichtes vom April 2003 wurde eine umfangreiche Beurteilung der Belastung von Lebensmitteln und die Aufnahme durch die Bevölkerung der Europäischen Union gegeben (Schothorst et al. 2004; <http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/task3210.pdf>). Im Mittelpunkt der Verordnungen der Europäischen Union zur Festsetzung der Höchstgehalte bestimmter Kontaminanten in Lebensmitteln stehen die Mykotoxine Aflatoxin, Ochratoxin A und Patulin (Verordnung (EG) Nr. 466/2001 der Kommission vom 8. März 2001 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln, ABl. EG Nr. L 77, S. 1 mit nachfolgenden Änderungsverordnungen). In Deutschland wurden weiterhin entsprechend dem aktuellen Wissenstand im Februar 2004 mit der Verordnung zur Änderung der Mykotoxin-Höchstmengenverordnung (MHmV) vom 02.06.1999 auch erstmals die Gehalte der Fusariantoxine Deoxynivalenol, Zearalenon und der Fumonisine in Lebensmitteln gesetzlich geregelt (Tabelle 4). Insbesondere die Beachtung der für Kleinkinder- und Säuglingsnahrung verwendeten Rohstoffe belegt die Verantwortung für die Lebensmittelsicherheit und Gesundheit der nächsten Generation.

**Tabelle 4: Höchstgehalte ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ausgewählter Mykotoxine in Lebensmitteln, die aus Getreide hergestellt werden (MHmV; Stand Februar 2004)**

<i>Mykotoxin</i>	<i>Erzeugnis</i>	<i>Höchstgehalt</i>
Deoxynivalenol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Getreideerzeugnisse (Getreidekörner zum direkten Verzehr und verarbeitete Getreideerzeugnisse), ausgenommen Hartweizenerzeugnisse, Brot, Kleingebäck, Feine Backwaren</li> </ul>	500
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Brot, Kleingebäck, Feine Backwaren</li> </ul>	350
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Getreideerzeugnisse (Getreidekörner zum direkten Verzehr und verarbeitete Getreideerzeugnisse) zur Herstellung von diätetischen Lebensmitteln für Säuglinge oder Kleinkinder</li> </ul>	100
Zearalenon	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Getreideerzeugnisse (Getreidekörner zum direkten Verzehr und verarbeitete Getreideerzeugnisse)</li> </ul>	50
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Getreideerzeugnisse (Getreidekörner zum direkten Verzehr und verarbeitete Getreideerzeugnisse) zur Herstellung diätetischen Lebensmitteln für Säuglinge oder Kleinkinder</li> </ul>	20

### 2.3.2 Wechselwirkungen zwischen Mykotoxinen

Treten bei Studien unerwartete Effekte auf oder bleiben erwartete Effekte aus, wird oft eine Mischkontamination des Futtermittels zur Erklärung herangezogen und damit zum Ausdruck gebracht, dass ein Leittoxin nicht ursächlich für alle Ergebnisse einer Studie sein muss. Die Durchführung von Metaanalysen wird erschwert durch die Wechselwirkungen von Mykotoxinen, die zu widersprüchlichen Aussagen der Einzelstudien führen. Über sogenannte Potenzierungseffekte, die durch das gemeinsame Einwirken mehrerer Toxine auf den Organismus entstehen, ist noch sehr wenig bekannt (Schollenberger et al. 1999). Während Kombinationseffekte beim Geflügel gut untersucht sind, liegen beim Schwein nur vereinzelte Untersuchungen vor (Dänicke et al. 2000).

Wechselwirkungen oder Kombinationseffekte zwischen verschiedenen Mykotoxinen werden häufig zur Erklärung für das Auftreten bzw. Ausbleiben erwarteter oder unerwarteter Effekte herangezogen. So wird bei Versuchen mit belasteten Getreide, das nur auf Deoxynivalenol und Zearalenon untersucht worden ist, zum Teil über positive und zum Teil über negative Effekte berichtet (Dänicke et al. 2000). Lusky et al. (1997) beobachteten bei gleichzeitiger Gabe von 0,25 mg Zearalenon und 0,1 mg Ochratoxin A pro kg Futter über 90 Tage an Schweine keinen nachweisbaren Einfluss auf die Tiergesundheit. Eine Verstärkung der Effekte durch die Kombination Ochratoxin/ Zearalenon konnte nicht festgestellt werden, dafür gelang der Nachweis von  $\alpha$ -Zearalenol in Leber und Niere bei den Tieren, die beiden Toxinen ausgesetzt waren. Beim Menschen sind Erbrechen, Durchfall und Hautreaktionen die häufigsten Beschwerden bei der Aufnahme von Trichothecenen durch die Nahrung. Eine Gefährdung der Gesundheit des Menschen durch Lebensmittel tierischer Herkunft wird aber übereinstimmend ausgeschlossen. Es kann unter Umständen abhängig vom Metabolismus zur Anhäufung der Toxine und ihrer Umwandlungsprodukte im Tierkörper, sowie in Produkten wie Milch und Eiern kommen (Marx et al. 1995). Zearalenon ist als Rückstand in Leber, Niere, Eiern und Milch vorhanden, jedoch sind die in den Studien eingesetzten Toxinkonzentrationen als sehr hoch und nicht praxisrelevant anzusehen (Dänicke et al. 2000). Es liegt keine Gefährdung durch Rückstände von Fusarientoxinen in Eiern, Milch und essbaren Geweben vor, da die nachgewiesenen Gehalte um etwa 2-3 Zehnerpotenzen niedriger sind, als die ursprünglich

verfütterten Toxinkonzentrationen (Dänicke et al. 2000). Somit stammt der größte Teil der vom Menschen aufgenommenen Fusarientoxine aus kontaminiertem Getreide (Beasley et al. 1990)

### **2.3.3 Deoxynivalenol beim Schwein**

Deoxynivalenol und Nivalenol sind heute die bedeutendsten Mykotoxine im Getreideanbau aus der Gruppe der Typ B Trichothecene, wobei Deoxynivalenol wahrscheinlich das am häufigsten vorkommende Mykotoxin in Nahrungs- und Futtermitteln ist. Beide Toxine werden vor allem durch *Fusarium graminearum*, daneben auch durch *Fusarium culmorum* und *Fusarium crookwellense* gebildet. Von *Fusarium graminearum* scheinen in Nord- und Südamerika, Europa und Asien die Deoxynivalenol bildenden Stämme zu dominieren, und in Japan und Australien die Nivalenol-Bildner. Nivalenol kommt weniger häufig in Getreide vor als Deoxynivalenol und über die Toxizität von Nivalenol ist sehr viel weniger bekannt (Schothorst und van Egmond 2004).

Der Haupteffekt der zellulären Wirkungsweise von Deoxynivalenol besteht in der Inhibition der Proteinbiosynthese (Rotter et al. 1996). Dabei bindet das Toxin an die 60S-Untereinheit der Ribosomen, wodurch es zu einer Hemmung der Peptidyltransferase kommt (Rotter et al. 1996). In der Folge wird die gesamte Proteinsynthese gestört. In erster Linie kommt es demnach zu zytotoxischen Effekten.

Deoxynivalenol und Nivalenol und deren jeweilige Vorstufen der Biosynthese 3-bzw. 15-Acetyldeoxynivalenol und Fusarenon X zählen zu den Typ B Trichothecenen, die durch eine Ketogruppe am Kohlenstoffatom acht gekennzeichnet sind (Rotter et al. 1996). Pharmakokinetik und Metabolismus des Deoxynivalenols bei der Spezies Schwein wurden in verschiedenen Studien untersucht. Nach Prelusky et al. (1988), beträgt die systemische Absorption 82% und ca. 95% der gesamten Wiederfindung kam dem Ausgangstoxin zu. Ein Metabolismus scheint kaum stattzufinden. Der Anteil der Konjugate beträgt weniger als 5% und im Harn konnten keine Veränderungen der Metabolitenprofile detektiert werden (Coppock et al. 1985).

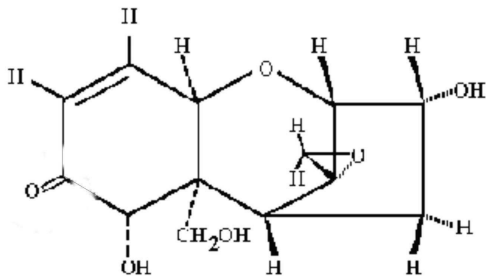


Abbildung 3: Strukturformel Deoxynivalenol ([www.mykotoxin-schimmelpilzgift.de](http://www.mykotoxin-schimmelpilzgift.de))

Bei akuter Deoxynivalenolintoxikation stehen beim Schwein Erbrechen, Durchfall und Futterverweigerung bzw. in weniger akuten Fällen ein Rückgang im Futterverzehr und damit verbunden eine Verschlechterung der Zunahmen und Futterverwertung im Vordergrund. Aus Dosis-Wirkungsstudien mit kontaminiertem Getreide an Ferkeln und Mastschweinen postulierten (Pollmann et al. 1985), dass die Futteraufnahme zurückgeht, wenn die Konzentration des Futters 1 mg Deoxynivalenol übersteigt. Deoxynivalenol reizt die Schleimhäute, außerdem beeinflusst es das Immunsystem, so dass die Tiere anfälliger gegenüber Infektionskrankheiten werden können (Rotter et al. 1996). Das Schwein gilt als die gegenüber Deoxynivalenol empfindlichste Nutztierart. Neben zahlreichen Feldstudien, die diesen Fakt belegen, wurde in Österreich eine Studie zu klinischen Symptomen von Fusariotoxinen bei Nutztieren durchgeführt (Schuh 1981). Dabei wurden verschiedene Deoxynivalenolkonzentrationen dem Futter von Schweinen beigemischt und Effekte beobachtet (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Studienergebnisse für Deoxynivalenol (DON) beim Schwein (Schuh 1981)**

<i>DON – Konzentration im Futter</i>	<i>Effekte</i>
0,2 mg/ kg Futter	Wachstumsdepressionen bei Ferkeln
1,04 mg/ kg Futter	Erbrechen, Hämorrhagie des Verdauungstraktes
3,7 mg/ kg Futter	Durchfall, erhöhte Mortalität
15 mg/ kg Futter (+ 0,224 mg/ kg Zearalenon)	vollständige Verweigerung des Futters

Die Substanzen Nivalenol und Deoxynivalenol sind durch die International Agency for Research in Cancer (IARC) als nicht krebserzeugend eingestuft. Chavez et al. (1984) konnten zeigen, dass auch keine Teratogenität durch Deoxynivalenol beim Schwein vorliegt, da kontaminiertes Futter während der letzten 90 Tage der Trächtigkeit und der 21-tägigen Laktation verfüttert wurde und kein Effekt auf das Gewicht der Sauen zum Zeitpunkt der Geburt bzw. nach der Geburt vorhanden war. Außerdem konnte weder die Ferkelmasse, noch die Zahl der lebendgeborenen Ferkel durch die Intervention beeinflusst werden.

#### **2.3.4 Zearalenon beim Schwein**

Zearalenon gehört zu den Toxinen aus Fusarienarten und wird durch eine Reihe verschiedener Fusarien gebildet; Hauptbildner sind dieselben Pilze, die auch für die Deoxynivalenolbildung verantwortlich sind. Die Substanz besitzt auf Grund seiner räumlichen chemischen Struktur eine ausgeprägte östrogene Wirksamkeit und wirkt anabolisch (Gajecki 2002). Zearalenon hat nur eine sehr geringe Toxizität. Es konkurriert mit körpereigenen Östrogenen um die Bindung an Östrogenrezeptoren und vermittelt so dysregulierte Östrogenwirkungen, die sich klinisch im Hyperöstrogenismus manifestieren können (Gajecki 2002). Die höchste Affinität zum Östrogenrezeptor weist der Zearalenonmetabolit  $\alpha$ -Zearalenol auf, gefolgt von Zearalenon selbst (Fitzpatrick et al. 1989). Beta-Zearalenol zeigt praktisch keine Affinität zum genannten Rezeptor. In den Mukosazellen von Duodenum und Jejunum wird beim Schwein in Anwesenheit von NADPH Zearalenon zu  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zearalenol metabolisiert (Olsen et al. 1987). Auch in der Leber findet eine Reduktion statt. Außerdem wird Zearalenon in der Darmschleimhaut rasch mit Glucuronsäure konjugiert (Biehl et al. 1993).

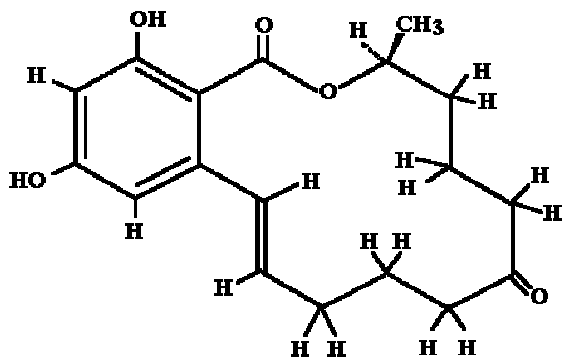


Abbildung 4: Strukturformel Zearalenon ([www.mykotoxin-schimmelpilzgift.de](http://www.mykotoxin-schimmelpilzgift.de))

Mehrere Studien belegen, dass im Metabolitenprofil des Harns hauptsächlich  $\alpha$ -Zearalenol unkonjugiert oder konjugiert mit Glucuronsäure bzw. Sulfat vorhanden ist (Bata et al. 1983); (Mirocha et al. 1981). Eine kürzlich erschienene Studie detektierte  $\alpha$ -Zearalenol als einzigsten Zearalenon-Metabolit in Galle, Leber und Harn junger weiblicher Schweine (Dänicke et al. 2005). Eine Übersicht über den Metabolismus von Zearalenon zeigt die Abbildung 5.

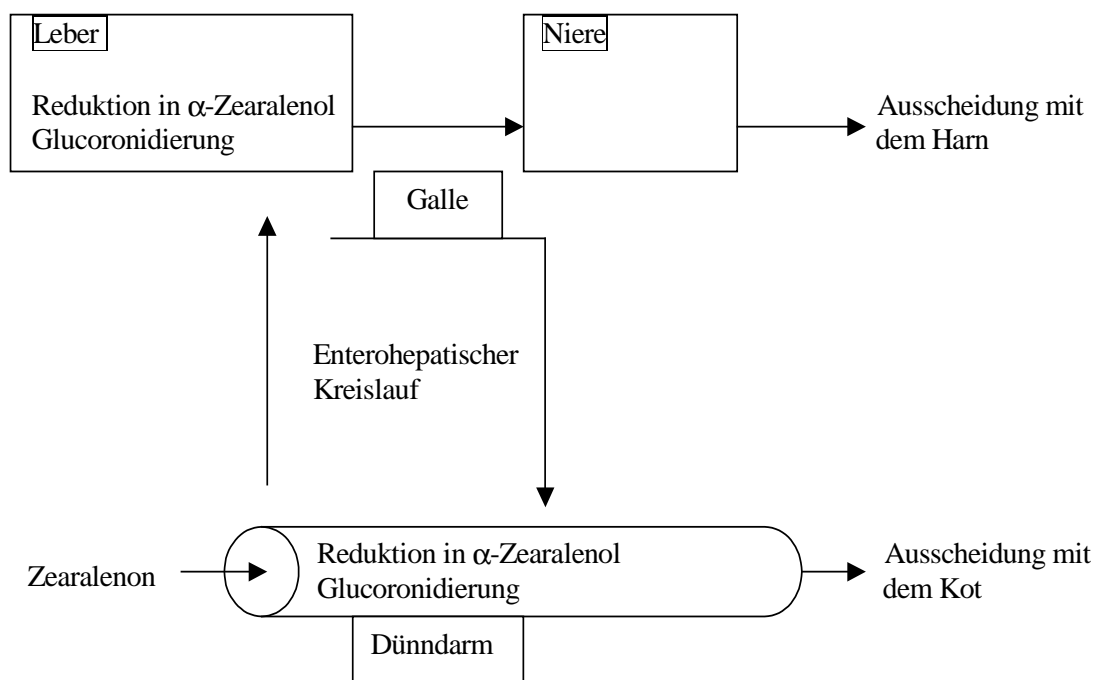


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Metabolismus von Zearalenon beim Schwein



Bei Schweinen ist die biologische Halbwertszeit von Zearalenon länger als bei anderen Lebewesen, das heißt, dass aus pflanzlichen und tierischen Nahrungsmitteln aufgenommene Zearalenon verbleibt länger im Körper. Zearalenon zeigt besonders bei Schweinen seine größte Wirkung beginnend mit Schwellungen der Vulva und des Gesäuges über typische Zeichen zu hoher Östrogenaufnahme (Hyperöstrogenismus) bis hin zu Unfruchtbarkeit oder Scheinträchtigkeit (Bauer et al. 1987). Die verschiedenen Effekte von Zearalenon im Futter von Jungsauen im Zeitraum von Beginn der Pubertät bis zur Belegung bzw. von Sauen während der Trächtigkeit untersuchten Etienne et al. im Jahr 1982 (Tabelle 6). Bei Zearalenon-Konzentrationen im Futter von 40 mg/kg konnten beim Eber eine verringerte Testosteronkonzentration im Plasma sowie eine verschlechterte Libido in der 14.-18 Lebenswoche nachgewiesen werden (Berger et al. 1981). Im Alter von 36 Wochen zeigten sich diese Faktoren dann nicht mehr.

**Tabelle 6: Studienergebnisse für Zearalenon (ZON) beim Schwein (Etienne et al. 1982)**

<i>ZON</i>	<i>Effekte</i>
3,61 mg/ kg Futter bei Jungsauen (Pubertät bis Belegung)	Scheinträchtigkeit bei 45 % der Jungsauen
4,33 mg/ kg Futter bei Sauen bis zum 80. Trächtigkeitstag	Reproduktionsleistung unverändert; Gewichtsreduktion von Uterus, Plazenten und Feten; erhöhte Inhomogenität zwischen den Feten

### **2.3.5 Ernährung des Schweins**

Die Fütterung des Schweins hat eine große Bedeutung für den Erfolg in der Schweinehaltung. Leistungsmerkmale wie Wurfgröße und Absetzgewicht, Tageszuwachs (Mast) und Fleischansatz sowie Futtermittelverwertung, aber auch Schlachtkörperqualität stehen unter dem Einfluss der Ernährung. Schweine sind Omnivoren, heute aber mehr Getreideverbraucher als Abfallverwerter. Das Fassungsvermögen des Magendarmtraktes des Schweins entspricht ca. 25 % der Lebendmasse. Die mechanische Zerkleinerung des Futters ist relativ beschränkt. Die Verdauung

findet vor allem präzäkal durch körpereigene Enzyme statt. Postnatal kommt es zur Aktivitätszunahme einiger Verdauungsenzyme (z. B. Amylase) v.a. nach dem Absetzen und zur Abnahme der Aktivität anderer Verdauungsenzyme (z.B. Laktase, Chymotrypsin). Beim postilealen Nahrungsabbau spielen mikrobielle Enzyme eine Rolle, diese Verdauung ist aber von sekundärer Bedeutung, abgesehen von der Produktion von B-Vitaminen, die aber nur teilweise absorbiert werden können und von der Entstehung flüchtiger Fettsäuren während des Rohfaserabbaus, was relativ bedeutend für die Energieversorgung ist. Einen positiven Einfluss auf die Gesamtverdaulichkeit des Futters haben Pelettieren, Flockieren, Mahlen, Quellen und zusätzlich auf das Futter von Absetzferkeln Extrudieren und Expandieren. Eine Zunahme des Rohfasergehaltes oder Trocknen des Futters verschlechtern die Gesamtverdaulichkeit. Die wichtigsten Futtermittel für das Schwein zeigt die folgende Tabelle 7.

**Tabelle 7: Futtermittel für das Schwein und Besonderheiten (Restriktionen) bei deren Einsatz (König 2004)**

<i>Futtermittel</i>	<i>Restriktionen</i>
Gerste	bevorzugt als Energielieferant; keine Restriktion
Weizen	keine Restriktion
Weizenkleie	hoher Rohfasergehalt; flockiert für Ferkel
Hafer	limitierter Einsatz bei hohem Rohfasergehalt
Triticale	ähnlich wie Gerste und Weizen
Roggen	Verzehrsdepressionen bei zu hoher Zufuhr
Mais	max. 45-60 % in Rationen von Mastschweinen (hoher Polyensäuregehalt)
Ackerbohnen	Methioninzulagen
Proteinerbsen	Methioninzulagen
Rapsextraktionsschrot/ Rapsmehl	Verzehrsdepression, Hypothyreose, Hepatomegalie, evt. Nierenschäden bei zu hoher Zufuhr
Sojaextraktionsschrot	getoastet; bevorzugt als pflanzlicher Proteinlieferant eingesetzt
Tiermehle/ Fischmehl	vor allem zur Verbesserung der Versorgung mit essentiellen Aminosäuren; hygienische Aspekte

	(Salmonellen etc.)
Kartoffeln	gedämpft, siliert, flockiert, roh (verminderte Verdaulichkeit, evt. Solaninintoxikation)
Gras	Ballastträger für trächtige Sauen oder Aufzuchttiere; Einsatz limitiert (Polyensäuregehalt)
Trockengras	Einsatz limitiert (Polyensäuregehalt)
Küchenabfälle	Einsatz limitiert (Polyensäuregehalt); große Schwankungen des Nährstoffgehaltes; Hygiene (Kochen, Pasteurisieren, Sterilisieren)
Molke/ Schotte	Max. 10 % des Lebendgewichtes bzw. 30 % der Ration für Mastschweine (schlechtes Wachstum); Hygienemaßnahmen
Mager- und Buttermilch	Max. 5L/ Tag für Mastschweine

## ***2.5 Vitamin-A-Stoffwechsel***

### **2.5.1 Allgemeine Definitionen**

Vitamin A ist ein Oberbegriff für eine Reihe von Verbindungen mit ähnlicher chemischer Struktur, jedoch unterschiedlicher Wirkungsweise. Für eine klare Sprachregelung im Umgang mit Vitamin-A-Derivaten wurde von der „Joint Commission on Biochemical Nomenclature“ eine einheitliche Nomenklatur aufgrund chemischer Gemeinsamkeiten vorgeschlagen, nach der die Bezeichnung Vitamin A für Verbindungen, die keine Carotinoide sind und qualitativ die biologische Aktivität des Vitamin-A-Alkohols aufweisen gilt (Gerlach et al. 1988). Der biologische Vitamin-A-Begriff umfasst Retinol und die Retinylester. Nur diese Verbindungen besitzen Vitamin-A-Wirkung, weil sie metabolisch in Retinal und Retinsäure umgewandelt werden können (Sklan 1987).

In der Pflanzenwelt kommen Carotinoide, die teilweise im tierischen Organismus in Retinol umgewandelt werden, vor und nicht Vitamin A selbst. Die Carotinoide, die das Potential haben, in Retinol umgewandelt werden zu können, bezeichnet man als Provitamin A. mit Unter zahlreichen Carotinoiden sind  $\alpha$ -Carotin,  $\beta$ -Carotin und  $\gamma$ -Carotin die wichtigsten Provitamine A (Sklan 1987). Carotinoide sind Bestandteil der Chromoplasten und werden von Pflanzen als Schutz vor photooxidativen Prozessen gebildet. Sie können Strahlungsenergie über den Triplettzustand direkt absorbieren und deaktivieren und reaktive Sauerstoffverbindungen quenchen. Da jede Pflanze Carotinoide bildet, stehen im Pflanzenmaterial weltweit eine enorme Syntheseleistung und ein immenses Reservoir zur Verfügung. Vitamin A selbst kommt unter anderem in Leber, Butter, Eigelb, Milch- und Käseprodukten sowie einigen Seefischen vor (Gerlach et al. 1988).

### **2.5.2 Transport und Metabolismus**

Aus tierischen Quellen nehmen Mensch und Tier Vitamin A in Form von Retinol oder Retinylestern auf. Die Retinylester werden im Darm durch unspezifische Pankreaslipase und durch eine Retinylesterhydrolase an der Bürstensaummembran hydrolysiert und gelangen als freies Retinol über erleichterte Diffusion in die Darmzelle, wo eine Reveresterung mit langkettigen Fettsäuren stattfindet (Schweigert et al. 2002). Katalysiert wird diese Reaktion durch Lecithin-Retinol-Acyltransferase (LRAT) und AcylCoA-Retinol-Transferase (ARAT), zwei mikrosomale Enzyme. Es entstehen dabei hauptsächlich Retinylpalmitat und Retinylstearat, die dann in Chylomikronen eingebaut werden, welche über den Ductus thoracicus in den Blutkreislauf gelangen (Harrison et al. 2001), wo sie auf die Fraktionen der Lipoproteine verteilt werden.

Beta-Carotin wird im oberen Dünndarm unter Mitwirkung von Gallensäuren mittels passiver Diffusion resorbiert. Bei der Resorption stellen Gallensäuren einen unerlässlichen Cofaktor dar. In den Enterozyten des Intestinaltraktes wird der größte Teil des aufgenommenen Carotins durch eine Dioxygenase gespalten (Nagao 2004). Donor der notwendigen Reduktionsäquivalente ist NADPH/H<sup>+</sup>. Da die Aktivität dieses Enzyms von der Vitamin-A-Versorgungslage abhängt, sinkt bei ausreichendem Vitamin- A-Angebot die Spaltung von  $\beta$ -Carotin (und anderen Carotenoiden)

in Vitamin-A-Derivate. Es wird als intaktes  $\beta$ -Carotin weiter verstoffwechselt (Nagao 2004). Damit ist auch in einzigartiger Weise gewährleistet, dass durch Carotinoide keine toxischen Vitamin-A-Spiegel erzeugt werden. Das entstehende Retinal wird erst in Retinol umgewandelt und dann in Chylomikronen eingebaut und zur Leber transportiert.

Bei den hydrolytischen Vorgängen der Spaltung der Triglyceride der Chylomikronen im Blut (unter der Einwirkung der Lipoproteinlipase), entstehen wieder Retinylester, die dann in Gewebe aufgenommen werden können (Napoli 1999). In der Leber werden Retinylester hydrolysiert und in die Speicherform überführt oder das entstehende Retinol an das Retinol-Bindungsprotein (RBP) gebunden. Da nahezu alle Zellen des Organismus Vitamin A benötigen, muss das extrem hydrophobe Molekül in Bindung an spezifische Proteine transportiert werden. Bis heute sind fünf Bindungsproteine isoliert und identifiziert worden (Napoli 1999). Der Transport von Retinol im Blut erfolgt über das RBP und das Transthyretin (55 kDa), das dafür verantwortlich ist, dass der relativ kleine Komplex Retinol-RBP (21 kDa) nicht renal filtriert wird (Raila et al. 2001). Intrazellulär sind zwei zytoplasmatische Carrierproteine spezifisch für Retinol (CRBP (I)/ (II)) und zwei weitere für den aktiven Metaboliten Retinsäure (CRABP (I)/ (II)) isoliert und kloniert worden (Wolf 1991).

Die Leber enthält für die Speicherung von Vitamin A spezialisierte Zellen, die sogenannten Ito-Zellen (Flisiak 1997). Die Speicherung von Vitamin A erfolgt als Retinylpalmitat (Dawson 2000). Die in den Itozellen gespeicherte Menge an Vitamin A sichert den Bedarf für mehrere Monate. Bei Bedarf wird Retinylpalmitat durch eine spezifische Esterase freigesetzt. In den Zielzellen wird Retinol oder der Metabolit, die Retinsäure, nach Bindung an zytoplasmatische Rezeptoren in den Kern transportiert, um nach Bindung an nukleäre Retinsäure-Rezeptoren, die zur Familie der Steroid-Thyroid-Hormonrezeptoren gehören, die Proteinsynthese-Leistungen zu beeinflussen (Mangelsdorf et al. 1990). Weiterhin beeinflusst Retinsäure posttranslationale Reaktionen wie Glykoprotein-Sythese (Roberts et al. 1984). Einen Überblick über die Wege des Transports und der Speicherung von Vitamin A zeigt die Abbildung 6.

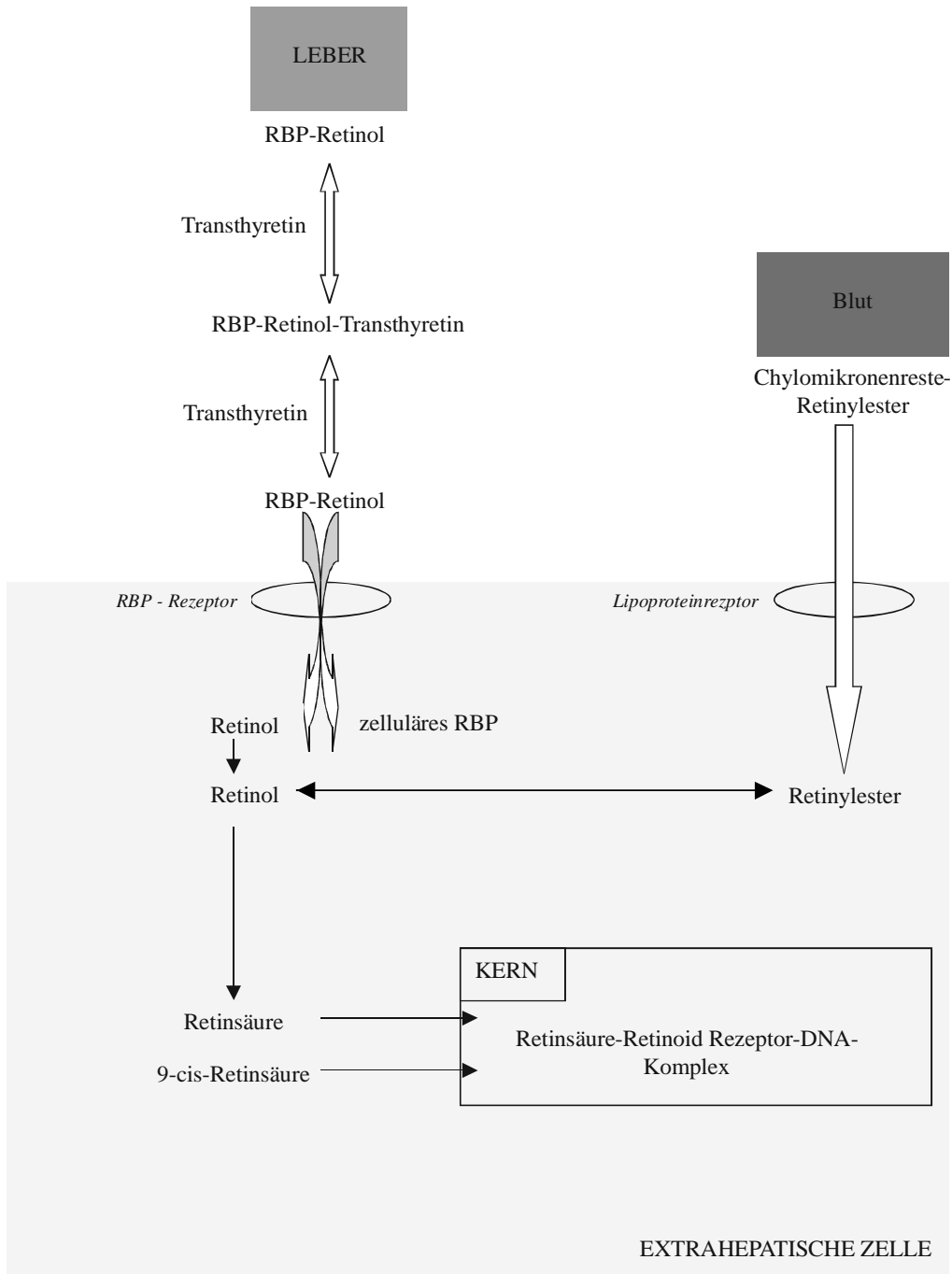


Abbildung 6: Transport und Speicherung von Vitamin A

### 2.5.3 Wirkungen von Vitamin A

Bereits im Jahre 1500 v. Chr. wurde in China die Anwendung von Honig und Leber zur Behandlung der Nachtblindheit empfohlen. Das erste Mal wurde Vitamin A als antixerophthalmischer Faktor 1913 von McCollum und Davis beschrieben (Olson 1999). Heute weiß man um Funktionen dieses Vitamins im Bereich des Sehorgans, der Embryogenese, des Immunsystems und um Wirkungen bei der Proliferation und Differenzierung (Biesalski et al. 2004).

Eine entscheidende Rolle spielt Vitamin A in den Scheibchen der Photorezeptoren beim Sehorgan. Es wird dort an das Apoprotein Opsin gebunden. Durch Lichteinfall isomerisiert 11-cis-Retinal zu all-trans-Retinal und löst sich vom Opsin ab, wodurch es zu Konformationsänderungen am Apoprotein kommt (Boulton et al. 2001). Über verschiedene Kaskaden (G-Protein, cGMP-Phosphodiesterase, cGMP) entsteht eine Hyperpolarisation an der Zellmembran und es entsteht ein Nervenimpuls (Boulton et al. 2001).

Es handelt sich beim Vitamin A um ein typisches Beispiel einer Substanz, die fraglos in niedriger Dosierung für die Entwicklung des Konzeptus essentiell ist (Ross et al. 1994). Es ist seit langem bekannt, dass beim Fehlen dieses Vitamins abnorme Entwicklungen auftreten. Vitamin-A-Mangel gehört zu den ersten Bedingungen mit denen experimentell Fehlbildungen ausgelöst wurden (Schweigert et al. 1991). Andererseits induziert auch eine Überdosierung des Vitamins eine abnorme Entwicklung. Aus Tierexperimenten sind bei hoher Dosis teratogene Effekte seit langem bekannt. Ein solches dosisabhängiges entgegengesetztes Verhalten ist bei bestimmten Vitaminen, Hormonen und Transmittern durchaus nicht selten. Obgleich der Wirkmechanismus der Auslösung abnormer Entwicklungen während der Embryonalzeit durch Retinoide (aktive Form von Vitamin A) nicht bekannt ist, gibt es doch inzwischen eine größere Zahl von Anhaltspunkten zur molekularbiologischen Wirkungsweise dieser Verbindungen. Interessanterweise ist Retinsäure bis heute die einzige Substanz, für die überzeugende Anhaltspunkte für eine wesentliche physiologische Bedeutung bei der Musterbildung während der Organogenese, wie bei der Entwicklung der Wirbelsäule und der Extremitäten, existieren (Yamaguchi et al. 1998). Ab wann in der Entwicklung Vitamin A für den Embryo von

Bedeutung ist, wurde noch nicht vollständig geklärt. Neben dem Einfluss von Vitamin A auf die Entwicklung der Extremitäten sind Retinoide auch für die anterior-posteriore Orientierung des Embryos von Bedeutung, sowie für eine physiologische Entwicklung von Epithelien und Haut (Zouboulis 2001). Typische Fehlbildungen, die im Zusammenhang mit Vitamin A auftreten, sind unter anderem Gaumenspalten, Herzdefekte, Thymusdefekte, Retina- und Opticusnerv-Defekte, Defekte des ZNS, Mikrognathie und Mikrotie/Anotie (Ross und Gardner 1994).

Vitamin-A-Defizit ist ein großes Problem in den Entwicklungsländern (Schweigert et al. 2003), was sich vor allem durch eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionskrankheiten bei Kindern bemerkbar macht. Mehr als 230 Millionen Kinder weltweit haben eine inadäquate Vitamin-A-Versorgung und die Hauptursache für nachlassendes Sehvermögen von mehr als 2,8 Millionen Vorschulkindern ist Vitamin-A-Mangel induziert über Fehlernährung (Underwood et al. 1996). Epidemiologische Studien haben bewiesen, dass eine Vitamin-A-Supplementation bei erkrankten Kindern in Asien und Afrika zu einer signifikanten Reduktion der Sterblichkeit führte (Sommer 1994). Tierexperimentelle Studien haben aufgezeigt, dass in Vitamin-A-defizienten Tieren sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunität geschwächt ist. Die Immunantwort wurde allerdings durch Gabe von Retinol wiederhergestellt. Die molekularen Mechanismen, die Grundlage der Wirkung von Vitamin A auf die Immunantwort sind, wurden bisher nicht geklärt (Fawzi 2003).

Das Wachstum und die Differenzierung verschiedener Zellen wird von Vitamin A beeinflusst (Biesalski und Nohr 2004). Je nach verwendeter Zelllinie, Vitamin-A-Derivat und Konzentration konnten in unterschiedlichen Studien sowohl eine Hemmung, als auch eine Förderung des Wachstums und sowohl in differenzierender, als auch ein dedifferenzierender Effekt beobachtet werden.

Einem Mangel an Vitamin A nennt man Hypovitaminose und er zeigt als Symptom unter anderem Nachtblindheit (Thompson et al. 2003). Bei der Hypervitaminose A unterscheidet man zwischen akuter Vitamin-A-Intoxikation (Kopfschmerzen, Benommenheit, Erbrechen, Schwindel, diskrete Hautveränderungen) und chronischer Hypervitaminose (Appetitverlust,



Austrocknung der Haut, Haarausfall, Mundwinkelrhagaden, Knochenschmerzen, Wachstumsverzögerungen u.m.) (Clark 1971).

## **2.6 Vitamin E**

Anfang der 20er Jahre wurde nachgewiesen, dass die Vermehrungsfähigkeit männlicher und weiblicher Ratten sowie die Verhinderung der Atrophie reproduktiver Organe von einem fettlöslichen Nahrungsfaktor abhängt, der später dem Alphabet folgend als Vitamin E bezeichnet wurde.

Vitamin E ist die offizielle Bezeichnung für alle Tocol- und Tocotrienolderivate, die qualitativ die biologische Aktivität von RRR-alpha-Tocopherol, dem natürlich vorkommenden Stereoisomer, besitzen (Herrera et al. 2001). Somit ist Vitamin E ein Oberbegriff, der die Tocopherole und Tocotrienole mit mindestens einem kernständigen Methylsubstituenten umfasst. Die  $\alpha$ -Tocopherole kommen entsprechend ihrer drei Chiralitätszentren (C2, C4', C8') in der Isoprenseitenkette als acht Enantiomere vor, die alle Vitamin-E-Wirkung haben (Herrera und Barbas 2001).

Die Wirkungen der Tocopherole sind vielfältig und in ihren Mechanismen noch nicht vollständig geklärt. Vitamin E ist der wichtigste fettlösliche Radikalfänger in Säugetieren, was seine Bedeutung bei der Verhütung von in-vivo-Oxidation von Lipiden, z.B. in Membranen und Low-density-Lipoproteinen (LDL), unterstreicht (Green 1972). Tocopherol führt zum Abbruch der Kettenreaktion der Autoxidation, indem es ein phenolisches Wasserstoffatom an das Peroxyl-Radikal abgibt und dabei selbst über ein stabileres Semichinonradikal in das Tocopherolchinon übergeht (Pietta 2000). Über die Antioxidans-Wirkung werden für die Tocopherole aber auch direkte Membranwirkungen, Einflüsse auf die Proteinsynthese, Wirkungen bei hämatologischen Erkrankungen und Funktionen im neuromuskulären System diskutiert (Azzi et al. 2000). Die Symptome eines schweren Vitamin-E-Mangels zeigen sich in einem charakteristischen und fortschreitenden neurologischen Syndrom, welches das zentrale und periphere Nervensystem, die Retina und Muskeln mit einbezieht. Es gibt zunehmend Beweise, dass durch freie Radikale vermittelte Zell- und Gewebeschäden bei der Pathogenese verschiedener degenerativer

Krankheiten und Zustände eine Rolle spielen (Middleton et al. 2000). Vitamin E ist nicht akut toxisch, in chronischer Dosierung gering toxisch und zeigt weder mutagene, teratogene noch kanzerogene Eigenschaften (Kappus et al. 1992). Avitaminosen am Tier sind im wesentlichen auf drei Formen beschränkt, die männliche und weibliche Fertilitätsstörung, die sogenannte „white muscle disease“ bei Jungtieren und die Muskeldystrophie.

Zwischen Vitamin A und Vitamin E konnten verschiedene gegenseitige Beeinflussungen festgestellt werden. Als eine der wesentlichen Wirkungen von Vitamin E wird seine antioxidative Eigenschaft in Bezug auf Vitamin A betrachtet, d.h. der intraluminale Oxidationsschutz vor der eigentlichen Resorption (Sklan et al. 1982). Auf zellulärer Ebene ließ sich ein protektiver Effekt von Vitamin E auf die Autoxidation des Retinaldehyds im Pigmentepithel nachweisen (McLellan et al. 2003). Vitamin E greift außerdem regulierend in die Hydrolyse der Retinylester in Leber und extrahepatischen Geweben ein (Napoli et al. 1984).

## ***2.7 Vitamine in der Schweinezucht***

In der Schweinehaltung müssen Vitamine mit der Nahrung zugeführt werden. Vitamin A als fettlösliches Vitamin kann aber relativ gut im Körper gespeichert werden. Der Bedarf an Vitaminen ist beim Schwein stark abhängig von Leistungsstadium, Rationszusammensetzung und Umweltfaktoren (Stress, Klima, Hygiene, Infektions- und Keimdruck) (Schoknecht 1997). Die futtermittelrechtlichen Toleranzen machen deutlich, wie genau bzw. ungenau sich der Bedarf ermitteln lässt. Bei einem deklarierten Vitamin-A-Gehalt von 20.000 I.E./ kg ist mit der zulässigen Deklarationstoleranz und einem Analysenspielraum ein tatsächlicher Gehalt von 12.800 I.E./ kg futtermittelrechtlich als in Ordnung zu betrachten.

In besonderen Situationen mit erhöhten Anforderungen ist es sinnvoll, eine erhöhte, zeitlich begrenzte und spezielle Vitaminzufuhr zu verabreichen. Dies kann z. B. bei der Geburt, Rausche und Belegungszeit, Impfung, Krankheit, Transport, Umstallung, Futtermittelwechsel u.m. notwendig und hilfreich sein (Schoknecht 1997). Bei Vitamin A ist eine kurzfristige Gabe von 500.000 I.E. pro Tag ohne negative Auswirkungen für das Schwein. Bei längerfristiger zu hoher

Aufnahme von Vitamin A wird die Leber geschädigt und die Aufnahme von Vitamin E stark vermindert (Kolb 1994).

Vitamin A wirkt beim Schwein antiinfektiös, erhöht die körperliche Widerstandskraft gegen Infektionen (Antikörperbildung), ist für Regeneration, Schutz und Aufbau von Haut und Schleimhaut verantwortlich und an der Regulation des Stoffwechsels beteiligt. Sein Mangel führt zu Wachstumsdepressionen, Krankheitsanfälligkeit und Fruchtbarkeitsstörungen (stille Brunst, verzögerter Eisprung, Missbildungen, Totgeburten) (Chew 1993). Vitamin E übernimmt beim Schwein Aufgaben beim Schutz der Trächtigkeit. Außerdem erhöht es die Milchproduktion, stimuliert die Antikörperbildung, verbessert die Fleischqualität, hat antitoxische Wirkung und verhindert Lebernekrosen und Muskeldegenerationen (Hidiroglou et al. 1992). Vitamin E ist beteiligt an der Regulation des Hormonstoffwechsels und der Steuerung des Kohlenhydrat- und Kreatin-Stoffwechsels (Hidiroglou et al. 1992). Zusätzlich wirkt es antioxidativ und stabilisiert oxidationsempfindliche Phospholipide und sonstige oxidationsempfindliche Stoffe wie Vitamin A (Miller et al. 1983). Kommt es zu einem Mangel an Vitamin E, treten Symptome wie Fruchtbarkeitsstörungen, Schwächung des Immunsystems, Bewegungsstörungen, Kannibalismus, Muskelschäden an Herz- u. Skelettmuskulatur (Herztod, Bananenkrankheit) und Veränderungen am Gefäß- u. Nervensystem (z. B. Fehlhaltung des Kopfes) auf und durch Leberschäden und Veränderungen im Fettdepot zeigt sich eine Braunfärbung des Specks (Tengerdy 1990).

**Tabelle 8: Bedarf fettlöslicher Vitamine für die Schweinehaltung (van den Berg 1997)**

<i>Vitamin</i>	<i>Synonym</i>	<i>Bedarf</i>
Vitamin A	Antiinfektiöses-, Wachstumsvitamin	NT 12.000 I.E. LAK 14.000 I.E. Ferk. 20.000 I.E. MAST 12.000 I.E.
Vitamin E	Fruchtbarkeitsvitamin Stressvitamin	NT 60 mg/kg LAK 80 mg/kg Ferk. 80 mg/kg MAST 60 mg/kg

Vitamin D	Antirachitisches Vitamin	NT 1.600 I.E. LAK 2.000 I.E. Ferk. 2.000 I.E. MAST 1.500 I.E.
-----------	--------------------------	--

*NT = normales Tier*

*LAK = laktierende Sau*

*Ferk. = Ferkel*

*MAST = Mastschwein*

## **2.8 Interaktionen zwischen Mykotoxinen und den Vitaminen A und E**

In welchem Zusammenhang Mikronährstoffe wie die Vitamine mit dem Verzehr von Mykotoxinen bei Mensch und Tier stehen, wurde bislang wenig und unzureichend untersucht. Verschiedene Fütterungsversuche sind zu diesem Thema an verschiedenen Tierarten durchgeführt worden. Eine Reduktion des Vitamin-A-Gehalt im Serum von Legehennen beobachtete man durch eine Diät mit Ochratoxin A, Zearalenon, Deoxynivalenol und Nivalenol (Garaleviciene et al. 2001). Epidemiologische Studien deuten an, dass eine Aflatoxin B1-Aufnahme mit einem erhöhten Risiko für hepatozelluläre Karzinome beim Mann assoziiert ist (Yu et al. 1997). Bereits 1994 zeigte Yu et al. beim Waldmurmeltier, dass Mikronährstoffe eine komplexe Rolle im Prozess der chemischen Karzinogenese spielen (Yu et al. 1994). Genauso wie 1997 beim Mann zeigte die Arbeitsgruppe, dass protektive Effekte mit verschiedenen antioxidativen Vitaminen erreicht werden können, so z. B. durch  $\beta$ -Carotin und Vitamin E. Für Retinol konnte kein Zusammenhang nachgewiesen werden (Yu et al. 1997).

Einflüsse von T-2 Toxin im Futter auf den Vitamin-E-Status untersuchte man am Modell Maus und kam zu dem Ergebnis, dass T-2-Toxin assoziiert ist mit einem Abfall der Konzentration von  $\alpha$ -Tocopherol im Serum (Vila et al. 2002). Bei Untersuchungen am Schwein kam man zu dem Schluss, dass Aflatoxine den Serumretinolspiegel senken und ebenso die Serum- und Gewebekonzentrationen an Tocopherol (Harvey et al. 1990). Zusätzlich zeigte man in diesem Versuch, dass eine Fütterung von Vitamin E keinen protektiven Effekt auf mykotoxininduzierte Vorgänge hat (Harvey et al. 1994). Auch andere Studien beschäftigten sich mit der Frage, ob man durch die Fütterung von Mikronährstoffen, wie den Vitaminen, ein positives Resultat erzielen

kann in Bezug auf eine Reduktion der Effekte von Mykotoxinen. Retinol, Ascorbinsäure und  $\alpha$ -Tocopherol sind Superoxid-Anionen-Scavengers und wurden in ihrer Wirksamkeit bei Genotoxizität überprüft. Vitamin E reduziert die genotoxischen Wirkungen von Zearalenon in der Leber und in der Niere von Mäusen (Grosse et al. 1997). Diese Wirkung beruht auf dem „Fangen“ der Lipidhydroxylradikale durch das Vitamin, wodurch der Verlauf der Lipidperoxidation unterbrochen werden kann.

Seit einige Mykotoxine (unter anderem auch Deoxynivalenol) dafür bekannt sind, Zellmembranschäden während einer gesteigerten Lipidperoxidation auszulösen (Abel et al. 1998); (Gautier et al. 2001); (Rizzo et al. 1994), wurden schützende Effekte durch antioxidative Substanzen untersucht. Selen, einige Vitamine (A, C, E) und ihre Vorstufen haben antioxidative Eigenschaften und agieren als Superoxid-Anion-Radikalfänger (Atroschi et al. 2002). Aus diesem Grund wurde erforscht, inwieweit diese Substanzen sich positiv auf die toxischen Effekte von Mykotoxinen auswirken (Atroschi et al. 1999; Atroschi et al. 1998). Die meisten Studien wurden invitro durchgeführt und beschränken sich auf Aflatoxin B1. Sehr viel weniger Informationen gibt es über Ochratoxin, T-2 Toxin, Zearalenon und Zitrinin und die Wirkung von Antioxidantien. Das wichtigste Lipidphasen-Antioxidans ist vermutlich das Vitamin E (Esterbauer et al. 1991). Carotenoide sind eine Gruppe fettlöslicher Antioxidantien, das wichtigste unter ihnen ist das  $\beta$ -Carotin (Cooper et al. 1999). Ein weiterer Effekt von Vitamin E ist eine Verbesserung der durch Aflatoxine induzierten Veränderungen während der Steroidgenese, vor allem bei der testikulären (Verma et al. 2001).

## ***2.9 Blutlipide und Lipoproteinstoffwechsel***

Im Blut und in den Speichergeweben von Mensch und Tier befinden sich unter anderem die fettlöslichen Substanzen wie Cholesterin, Triglyceride und Phospholipide. Cholesterin ist eine Grundsubstanz des Körpers und wird sowohl durch die Nahrung zugeführt als auch vom Körper selbst in der Leber hergestellt. Es ist ein lebenswichtiger fettähnlicher Stoff, den der Körper benötigt, um stabile Zellwände aufzubauen, Gallensäuren herzustellen (ohne welche die Verdauung bestimmter Speisen nicht funktioniert), Vitamin D zu produzieren (das zum Aufbau der Knochen benötigt wird) und um Hormone (Aldosteron, Cortisol, Testosteron, Progesteron,

Östrogene) zu bilden (Kametani et al. 1987). Die Eigensynthese von Cholesterin findet in der Leber und in Geweben außerhalb der Leber, z. B. in der Nebennierenrinde und in den Geschlechtsorganen statt. Die Leber ist der Ort, an dem sich das Cholesterin aus der Nahrung und das aus der Eigensynthese mischen und somit der größte Cholesterinspeicher des Körpers (Schumaker et al. 1969). Der Blutcholesterinspiegel beim Schwein beträgt 2,0 – 3,3 mmol / L. Triglycerid ist der Fachbegriff für einen weiteren wichtigen Fettstoff im Blut, das eigentliche Blutfett. Die Fettmoleküle, die wir mit der Nahrung aufnehmen, bestehen aus Glycerin und jeweils drei Fettsäuren. Der Bluttriglyceridspiegel beim Schwein beträgt bis 0,5 mmol / L. Phospholipide (auch Glycerinphosphatide genannt) kommen fast ausschließlich in Zellmembranen vor. In Speicherfetten finden sich nur geringe Mengen an Phospholipiden. Die Grundsubstanz der Phospholipide ist die Glycerinphosphorsäure, ein Ester, gebildet aus einer OH-Gruppe des Glycerins und einer OH-Gruppe der Phosphorsäure. Eine weitere saure OH-Gruppe der Phosphorsäure wird nun mit dem Alkohol Cholin verestert. Die beiden anderen OH-Gruppen des Glycerins werden mit der Carboxylgruppe von höheren Fettsäuren verestert. Das am häufigsten vorkommende und strukturell bedeutendste Phospholipid ist Phosphatidylcholin. Es ist vor allem für die Leber, deren Zellen aufgrund ihrer hohen Stoffwechselaktivität den höchsten Anteil intrazellulärer Strukturen aus Membranen haben, sehr bedeutsam (Zilversmit 1971).

Bei Lipiden überwiegen die hydrophoben Eigenschaften. Es ist deswegen verständlich, dass ihr Transport in dem wässrigen Medium des Blutplasmas schwierig ist. Für die mengenmäßig unbedeutende Fraktion der nichtveresterten Fettsäuren steht als Transportvehikel das Serumalbumin zur Verfügung. Die meisten anderen Lipide des Plasmas müssen durch Bindung an spezifische Transportproteine in Form der Lipoproteine transportiert werden (Schumaker und Adams 1969). Die im Plasma vorkommenden Lipoproteine werden entsprechend ihrer Dichte in Plasmaproteine sehr geringer (VLDL), geringer (LDL) und hoher Dichte (HDL) unterschieden. Eine Dichte noch unterhalb der VLDL zeigen schließlich die besonders lipidreichen Chylomikronen. Chylomikronen und VLDL sind die besonders triacylglyceridreichen Lipoproteine. Die ersteren sind hauptsächlich für den Transport von mit der Nahrung aufgenommenen Triacylglyceriden, die letzteren hauptsächlich für den Transport von in der Leber aus endogenen Quellen synthetisiertem Cholesterin und Triacylglyceriden in die Peripherie verantwortlich (Schumaker und Adams 1969). VLDL-Partikel sind triacylglyceridreich, enthalten

daneben auch Cholesterol, Cholesterolester und Phosphoglyceride (Schumaker und Adams 1969). Von den Plasmalipoproteinen enthalten die LDL die höchste Konzentration an Cholesterol und Cholesterolestern, die entsprechend der Herkunft der LDL aus der Leber stammen und in extrahepatischen Geweben meist als Membranbestandteile Verwendung finden (Schumaker und Adams 1969). Für den reversen Cholesteroltransport sind die HDL verantwortlich. Im Gegensatz zu anderen Lipoproteinen ist die Fraktion der HDL nicht einheitlich (Schumaker und Adams 1969). Aufgrund eines unterschiedlichen Gehaltes an Apolipoproteinen sowie des unterschiedlichen Lipidgehaltes können mindestens drei HDL-Gruppen unterschieden werden, die als HDL<sub>1</sub>, HDL<sub>2</sub> und HDL<sub>3</sub> bezeichnet werden (Hata et al. 2000). Die HDL werden von der Leber aufgenommen und dort dem endgültigen Abbau zugeführt. In Bezug auf den Lipidmetabolismus weist die Spezies Schwein erstaunliche Ähnlichkeiten zum Menschen auf, wodurch das Tier auch exzellentes Modell für Untersuchungen ist. Das Lipoproteinprofil des Schweins und des Menschen ähneln sich ebenfalls stark und LDL ist das Haupttransportlipoprotein für Cholesterin in beiden Spezies (Carey 1997).

## **3 Material und Methoden**

### ***3.1 Probengewinnung, Probenaufarbeitung***

Das verwendete Probenmaterial stammt aus dem Institut für Tierernährung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft in Braunschweig. Es wurden zwei verschiedene Versuche an präpubertären weiblichen Schweinen durchgeführt: erstens wurde geprüft, ob Aluminiumsilicat als Detoxifikationsmittel für Deoxynivalenol und Zearalenon geeignet ist und zweitens wurde die Dosis dieser Mykotoxine im Futter variiert. Innerhalb der beiden Versuchsvarianten entsprachen je zwei Gruppen einander in der Futterzusammensetzung. In beiden Studien gibt es eine Gruppe, die keinerlei Mykotoxine verfüttert bekam. Weiterhin gibt es in beiden Versuchsansätzen die Konzentrationsstufe 2,120 mg Deoxynivalenol je kg Futter und 0,629 mg je kg Futter.

Versuch eins, die Aluminiumsilicatstudie, umfasste die Gabe von vier verschiedenen Futterzusammensetzungen, die in nachstehender Tabelle beschrieben sind (Tabelle 9). Jeder Versuchsansatz wurde an insgesamt 20 weiblichen Ferkeln durchgeführt, wobei jeweils vier Ferkel in einer Gruppenbucht untergebracht waren. Dies bedeutet, dass bei vier Varianten insgesamt 80 Ferkel je 35 Tage gefüttert wurden. Davon wurden randomisiert je 10 Ferkel auf ihren Gehalt an Vitamin E, Vitamin A und dessen Estern in Leber und Serum untersucht, sowie Gesamteiweiß, Cholesterinkonzentration und Triglyceridgehalt im Serum bestimmt.

Versuch zwei, die Sensitivitätsstudie, wurde an je 10 Ferkeln im Rahmen einer dosisabhängigen Fütterung von Deoxynivalenol und Zearalenon durchgeführt. Die Gehalte an Retinol und Retinylestern, sowie Protein-, Cholesterin- und Triglyceridgehalt im Plasma wurden bestimmt. Basis dieser Versuchsreihe war eine Fütterung von verschiedenen Konzentrationsstufen der beiden Mykotoxine Zearalenon und Deoxynivalenol (Tabelle 10).



**Tabelle 9: Aufteilung der Gruppenzugehörigkeiten der Aluminiumsilicatstudie; Zusammensetzung der Futtermischungen.**

<b>Gruppe</b>	<i>Deoxynivalenol</i> (mg/kg Futter) - kalkuliert -	<i>Zearalenon</i> (mg/kg Futter) - kalkuliert -	<i>Mykotoxin-Mais</i> % an der FM	<i>FAL-Mais</i> % der FM	<i>Adsorb. % der</i> <i>FM</i>
<b>1</b>			0	50	0
<b>2</b>			0	50	0,4
<b>3</b>	2,120	0,629	50	0	0
<b>4</b>	2,120	0,629	50	0	0,4

*Adsorb.* = Adsorbens = Aluminiumsilicat; *FM* = Futtermischung; *FAL-Mais* = Kontrollmais

**Tabelle 10: Aufteilung der Gruppenzugehörigkeiten der dosisabhängigen Fütterung von Deoxynivalenol und Zearalenon.**

<b>Gruppe</b>	<i>Deoxynivalenol</i> (mg/kg Futter) - kalkuliert -	<i>Zearalenon (mg/kg</i> <i>Futter)</i> - kalkuliert -	<i>Mykotoxin-Mais %</i> <i>an der FM</i>	<i>Mais – FAL</i> <i>% der FM</i>
<b>1</b>	2,120	0,629	50	0
<b>2</b>	1,060	0,315	25	25
<b>3</b>	0,530	0,157	12,5	37,5
<b>4</b>	0,265	0,078	6	44
<b>5</b>	0,000	0,000	0	50

*FM* = Futtermischung; *FAL-Mais* = Kontrollmais

Die Zusammensetzung der Basalfuttermischung geht aus der nachfolgenden Übersicht hervor. Die Mischung enthält zu 50 % Mais, der dem Versuchsdesign entsprechend so gemischt wurde, das die Summe aus Mykotoxin-kontaminiertem Mais (Mais Frankreich) und Mykotoxin-freiem Mais (Mais FAL) die in obenstehenden Tabellen angegebenen Mykotoxinkonzentrationen erreicht. Die Basalfuttermischung bleibt davon abgesehen während beider Versuchsläufe konstant.

**Tabelle 11: Zusammensetzung der Basalfuttermischung (%)**

<i>Komponenten:</i>		<i>Komponenten kalkuliert:</i>	
Mais	50,00	Rohprotein	18,98
Sojaextrationsschrot	23,30	Rohfett	3,79
Gerste	21,13	Umsetzbare Energie (MJ/ kg)	13,58
Sojaöl	1,00	Lysin	1,43
Vitamine und Mineralstoffe	3,00	Methionin/ Cystein	0,81
Dicalzium-Phosphat	0,20	Threonin	0,96
Viehsalz	0,07	Tryptophan	0,29
L-Tryptophan	0,10	Calcium	0,92
L-Lysin HCl	0,71	Phosphat	0,59
Threonin	0,35	Natrium	0,23
DL-Methionin	0,24		
Phytase	0,03		

### ***3.2 Bestimmung von Vitamin E, Retinol und Retinylestern in Serum und Leber mittels HPLC***

#### **3.2.1 Eichung der HPLC**

Jeder experimentell erzeugte Messwert ist mit Unsicherheiten behaftet, welche der Aussagekraft jeder Methode Grenzen setzen. Die Validierung untersucht und charakterisiert diese Leistungsgrenzen. Die Präzision drückt die individuelle Abweichung von Messwerten vom Mittelwert bei wiederholter Durchführung aus. Die Richtigkeit ist ein Lageparameter, die statistische Größe ist der Mittelwert. Die Präzision ist ein Streuparameter, die statistische Größe ist die Standardabweichung.

Für die Kalibrierung des Gerätes wurden Standards (Retinol (Sigma),  $\alpha$ -Tocopherol (Sigma), Retinyleoleat (Roche), Retinylpalmitat (Sigma), Retinylstearat (Roche)) als feste Einwaagen verwendet. Die Konzentrationen der Standards wurden sowohl anhand des Molekulargewichtes,

als auch photometrisch überprüft. Diese Standards konnten dann mit der HPLC vermessen werden und ihre Flächen wurden bestimmt. Die Durchführung der Eichung erfolgte vierfach. Die berechneten Faktoren (Tabelle 12) wurden dann als Grundlage für die weiteren Berechnungen der Konzentrationen in den jeweiligen Serum- und Leberproben verwendet. Die Wiederfindung der Extraktion von Retinol betrug 97,68% mit einem Variationskoeffizient  $V_k$  von 1,98 und die für Retinylpalmitat betrug 92,23% mit  $V_k$  von 2,99 (Forterre 2003).

**Tabelle 12: Mittels entsprechender Standards festgelegte Faktoren als Berechnungsgrundlage für die Retinol- und Retinylesterbestimmung**

<i>Standard</i>	<i>Faktor*</i>	<i>SD</i>
Retinol	0,01024413	0,00024481
$\alpha$ -Tocopherol	0,84098439	0,09441974
Retinyloleat	0,01830860	0,00100671
Retinylpalmitat	0,01646981	0,00023056
Retinylstearat	0,01352105	0,00012388

*SD = Standardabweichung; \*Faktor=Injektionsvolumen HPLC/1000\*Konzentration des eingewogenen Standards/ Peakfläche*

### 3.2.2 Probenvorbereitung

Die Serumproben wurden zu Beginn fünf Minuten (min) bei 3800 U zentrifugiert, um eventuelle Verunreinigungen abzutrennen. 200  $\mu$ l Probe wurden dann mit 200  $\mu$ l Ethanol versetzt, wodurch die Proteine ausgefällt wurden. Im Anschluss wurde 1 ml Hexan zugegeben, 10 min geschüttelt, bei 3800 U 10 min zentrifugiert und die unpolare Hexanphase vorsichtig mit einer Pipette abgezogen. Das zurückbleibende Pellet wurde nochmals mit 1 ml Hexan versetzt, die Prozedur wiederholt und die unpolaren Hexanphasen vereinigt. Nun wurden die vereinigten Hexanphasen mit Stickstoff eingengt und der entstehende Rückstand mit 200  $\mu$ l Isopropanol aufgenommen. Nach 5 min im Ultraschallbad erfolgte eine letzte Zentrifugation (3800 U; 5 min), wonach die aufgearbeiteten Serumproben in HPLC-Röhrchen.

Bei der Aufbearbeitung der Leberproben wurden zuerst 1,5 g grob zerkleinertes Gewebe mit 5 ml Extraktionsgemisch (n-Hexan + 0,05% Butylhydroxytoluol : Isopropanol, 3:2 v:v) in

Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Gewebeeinwaage wurde notiert. Dann wurden die Proben mittels Ultra-Turrax für 15 Sekunden homogenisiert und im Anschluss 10 min bei 3800 U zentrifugiert. Der Überstand wurde in 25 ml Blue Cups gegeben und die Extraktion nach diesem Schema wiederholt. Zu den vereinigten Überständen wurde 5 ml 0,1 M NaCl pipettiert. Nachdem geschüttelt wurde, wurden die Proben 30 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen, wobei sie abgedeckt waren. Die obere organische Schicht wurde nun in ein weiteres Blue Cup überführt. Zu der wässrigen Phase wurden 7,5 ml Hexan gegeben, das Ganze geschüttelt und 30 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurde die obere organische Schicht mit dem ersten Extrakt vereint. Nochmals erfolgte eine Zugabe von Hexan (5 ml) zur wässrigen Phase, wieder wurde geschüttelt und das Ganze 30 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Letztmalig wurde die organische Schicht abgezogen und danach mit dem Restextrakt vereinigt, der dann genau auf 20 ml mit Hexan aufgefüllt wurde. Der nach Einengung mit Stickstoff entstandene Rückstand wurde dann in 200 µl des Eluent A aufgenommen, gemixt (30 sec) und nach fünfminütigem Ruhen in die entsprechenden HPLC-Röhrchen überführt.

### **3.2.3 HPLC-Analyse**

Zur Analyse der Proben wurde die reversed phased HPLC (High Performance Liquid Chromatography) eingesetzt. Bei der reversed phased (RP) Chromatographie werden die Probeninhaltsstoffe auf Grund ihrer unterschiedlichen Hydrophobie verschieden stark von der Säulenmatrix (stationäre Phase) festgehalten und vom Lösungsmittelstrom (mobile Phase) nach bestimmten Zeiten (Retentionszeiten) wieder heruntergewaschen. Für die vorliegende Analyse wurde ein modifiziertes isokratisches RP-HPLC System (Bio-Tek Instruments, Neufahrn; Deutschland) verwendet. Dabei wurde Vitamin A über eine Ultra-Sphere-ODS Säule (5 µm, 4.6 x 45 mm; Beckmann, USA) aufgetrennt. Als Eluent wurde Acetonitril/ Dichlormethan/ Methanol (70/ 20/ 10; v/ v/ v) mit einer Durchflussrate von 1 ml pro Minute verwendet. Tocopherol, Retinol und Retinylester (Retinyloleat, Retinylpalmitat, Retinylstearat) wurden bei 325 nm detektiert (Spectroflow 783; ABI Analytical Kratos Division, Berlin, Deutschland) und über die Retentionszeiten und die Peakflächen quantifiziert, indem die externen Standards genutzt wurden (siehe 3.2.1).

### ***3.4 Enzymatischer Test zur Bestimmung von Triacylglyceriden***

Triacylglyceride, die Ester der freien Fettsäuren mit Glycerin, zirkulieren nicht frei im Plasma, sondern sind an Proteine gebunden und werden als makromolekulare Komplexe (Lipoproteine) transportiert. Das im folgenden beschriebene Verfahren ist eine Modifikation der Methode von *McGowan, 1982*. Die Triacylglyceride werden zuerst durch Lipoproteinlipase zu Glycerin und freien Fettsäuren hydrolysiert. Dann wird Glycerin durch ATP phosphoryliert und mittels Glycerokinase entstehen Glycero-1-phosphat sowie ADP. Glycero-1-phosphat wird durch Glycerophosphat-Oxidase zu Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid oxidiert. Durch die Peroxidase als Katalysator bildet sich ein Quinonimin-Farbstoff, der ein Absorptionsmaximum bei 540 nm aufweist.

Zur Bestimmung der Triacylglyceride wurde ein Testsystem von SIGMA-DIAGNOSTICS verwendet. Jeweils 5 µl der Glycerol-Standardreihen, Positivkontrolle (Universal-Kontrollserum Precinorm) und Probe wurden mit 200 µl Triglyceridreagenz für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgten Dreifachbestimmungen. Die Extinktionsmessung wurde mit dem Mikroplattenphotometer (BIORAD Model 550, Deutschland) durchgeführt. Der Absorbtionsanstieg ist direkt proportional zur Triglyceridkonzentration der Probe.

### ***3.5 Enzymatischer Test zur Bestimmung von Cholesterol***

Cholesterin ist der Hauptbestandteil der Lipoproteine niederer Dichte (LDL). In den Lipoproteinen sehr niederer Dichte (VLDL) sowie den Lipoproteinen hoher Dichte (HDL) kommt es hingegen nur in geringer Menge vor. Das Prinzip des Verfahrens beruht auf enzymatischen Reaktionen. Im ersten Schritt werden Cholesterinester durch Cholesterin-Esterase zu Cholesterin hydrolysiert. Das entstandene Cholesterin wird durch Cholest-4-en-3-on und Wasserstoffperoxid oxidiert. In Anwesenheit von Peroxidase wird das gebildete Wasserstoffperoxid dann an ein Chromogen gekoppelt. Das Ergebnis ist ein Chinonimin-Farbstoff mit einem Absorbtionsmaximum bei 550 nm.

Zur Bestimmung des Cholesteringehaltes wurde ein Testsystem von SIGMA-DIAGNOSTICS verwendet. Jeweils 5 µl der Cholesterol-Standardreihen, Positivkontrolle (Universal-Kontrollserum Precinorm) und Probe wurden mit 200 µl Cholesterol-Reagenz für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgten Doppelbestimmungen. Die Extinktionsmessung wurde mit dem Mikroplattenphotometer durchgeführt. Die Intensität der entstandenen Farbe ist direkt proportional zur Gesamtcholesterinkonzentration der Proben.

### **3.6 Proteinbestimmung mittels BCA**

BCA steht für Bicinchonininsäure. Protein bildet mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion). Die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen des Komplexes werden vermutlich zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert, die mit BCA einen violetten Farbkomplex bilden. Die Absorption ist direkt proportional zur Konzentration an Gesamtprotein. Die Extinktionsmessung wurde mit dem Mikroplattenphotometer bei einer Wellenlänge von 570 nm durchgeführt.

Das zur Verwendung kommende Arbeitreagenz wurde aus 100 Volumen Lösung A und 2 Volumen Lösung B hergestellt. Lösung A und B setzten sich wie folgt zusammen:

A:	1%	BCA – $\text{Na}_2$ (4,4'-Dicarboxy-2,2'-Biquinoline)
	2%	$\text{Na}_2\text{CO}_3$
	0,16 %	Na-tartrat
	0,4%	NaOH
	0,95 %	$\text{NaHCO}_3$

B:	4 %	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ – Lösung (Kupfer II sulfat-pentahydrat)
----	-----	---

Jeweils 10 µl der Protein-Standardreihen (aus Stammlösung 10 mg BSA/ml), Positivkontrolle (Universal-Kontrollserum Precinorm) und Proben wurden mit 200 µl Arbeitsreagenz für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Es erfolgten Doppelbestimmungen.

### ***3.7 SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese***

Mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine ausschließlich auf der Basis ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Durch die Beladung mit dem anionischen Detergenz werden die unterschiedlichen Eigenladungen von Polypeptiden so effektiv überdeckt, dass Anionen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen. Bei der Elektrophorese in einem Polyacrylamidgel, das wie ein Molekülsieb wirkt, sind die relativen Mobilitäten dieser SDS-Protein-Komplexe proportional zum Logarithmus der Molekülmassen. Mit Hilfe von Eichproteinen lassen sich die Fraktionen ihren Molmassen zuordnen.

Zuerst wurden das Trenngel und das Sammelgel hergestellt. Die Serumproben wurden für den unter 3.8 beschriebenen Westernblot 1:10, der Standard 1:30 mit Probenpuffer verdünnt. Als Standard wurde der Kaleidoskop-Standard verwendet. Sowohl Proben, als auch Standard wurden fünf Minuten sieden gelassen und dann 15 µl je Slot aufgetragen. Mit Hilfe einer 1:5 verdünnten 5x SDS-Elektrophorese-Stammlösung erfolgte der Lauf von circa einer Stunde Dauer bei einer Stromstärke von 30 – 40 mA.

Die verwendeten Gele und Lösungen wurden wie folgt hergestellt:

Trenngel:	4 ml 30% Stock Acrylamid/Bis ; 2,5 ml 1,5M Tris-HCl-SDS pH 8,8; 3,35 ml Aqua-bidest. 7,5 µl TEMED; 50 µl 10% Ammoniumpersulfat;
Sammelgel:	1,33 ml 30% Stock Acrylamid/Bis; 2,5 ml 0,5M Tris-HCl-SDS, pH 6,4; 6,1 ml Aqua-bidest.; 7,5 µl TEMED; 50 µl 10% Ammoniumpersulfat;

Probenpuffer:	4 ml Aqua-bidest. 0,152g Tris; 2 ml Glycerol; 0,2g SDS; 0,2 ml 2-Mercaptoethanol; 0,1 mg Bromphenolblau; pH-Wert 6,8 → 10 ml Aqua – bidest.
5x SDS – Elektrophorese – Stammlösung:	15,1g Tris; 72g Glycin; 5g SDS; → 1L Aqua-bidest.

### **3.8 Semiquantitativer RBP-Nachweis mittels Westernblot**

Towbin entwickelte eine Technik (Towbin et al. 1992), die es erlaubte, gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteinlösungen auf einer Nitrozellulosemembran zu immobilisieren und mit Hilfe spezifischer Antikörper, das jeweils zu untersuchende Protein nachzuweisen. Dabei werden die Proteine aus dem Gel positionsgenau übertragen (geblottet) und durch hydrophobe Wechselwirkungen immobilisiert. Auf diese Weise erhält man den *Westernblot*, auf welchem der spezifische Antikörper (RBP-Antiserum; DAKO) sich an das gesuchte Protein (Retinol-Bindungs-Protein – RBP) bindet. Um nun ein optisches Signal zu erhalten, erzeugt man eine Aussendung von Licht in Form von Chemolumineszenz. Auf diesem Wege erreicht man einen sehr sensitiven Nachweis des semiquantitativen Vorhandenseins des zu untersuchenden Proteins.

Die Blotmembran bestand aus Nitrozellulose (BA 85 von Schleicher & Müller). Der peroxidase markierte Antikörper katalysierte die Oxidation von Luminol und löste damit eine Chemolumineszenz aus. Das entstehende Licht wurde mit dem BIORAD Fluor-S Multimager festgehalten. Nach durchgeführter Elektrophorese (Prinzip siehe 3.7.) und nach Inkubation der Membran für 5 min in Methanol und Inkubation von Filterpapier, Pad und Membran in 1x Transferpuffer erfolgte die Übertragung auf die Nitrozellulosemembran (Laufbedingungen: 100



V, 60 min). Danach wurde die Membran in TBST (0,1%) gespült und mit 200 ml TBST (0,1%) + 10g Magermilchpulver geblockt. Im Anschluss wurde für 60 min ein 1:150 verdünnter Antikörper gegen RBP (DAKO A0040) inkubiert. Anschließend wurde 10 min gespült mit TBST 0,1%. Nun erfolgte die Inkubation des zweiten Antikörpers (Envision HRP-konj.; 1:15 verdünnt) ebenfalls für 60 min. Im Anschluss wurden durch einen dreimaligen Waschschrift (je 10 min) mit TBST (0,3%) alle Reste abgespült. Die Detektion des zweiten Antikörpers wurde mit Luminol (Boehringer Chemineszense Detektion Kit) erreicht. Die entstandenen Proteinbanden wurden mittels BioRad-Imager ausgewertet und ihre Dichte (*Density*) unter zu Hilfenahme eines Blank-Wertes bestimmt.

Die verwendeten Lösungen wurden wie folgt hergestellt:

10x Transferpuffer:	29,3g Glycin (48 mM); 58,1g Tris (39 mM); 3,8g SDS (0,038%); 800 ml Aqua-bidest.;
1x Transferpuffer:	80 ml 10x Transferpuffer + 720 ml Aqua-bidest. + 200 ml Methanol
10x TBS:	60,55g Tris; 87,66g NaCl;
TBST (TBS – Tween – Puffer):	0,05 %: 500 µl Tween20 → 1L 1x Trans- ferpuffer; 0,1 %: 1 ml Tween20 → 1L 1x Transferpuffer; 0,3 %: 3 ml Tween20 → 1L 1x Transferpuffer;

### ***3.9 Datenanalyse und Statistik***

Die im Ergebnisteil aufgeführten Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben und wurden mittels statistischer Methoden überprüft. Für die statistische Bewertung der Ergebnisse der HPLC und der enzymatischen Methoden wurde ein nicht-parametrischer Test verwendet, der Mann-Whitney-U-Test, da die Gruppengröße kleiner zwanzig ist. Als signifikanter Unterschied wird  $p < 0,05$  definiert. Zur statistischen Prüfung der RBP-Density-Daten wurde zunächst eine univariate Varianzanalyse durchgeführt, die den Vorteil hat, dass alle Daten gleichzeitig in den Test auf Unterschied eingehen. Die RBP-Density-Daten der verschiedenen Versuchsgruppen wurden weiterhin mit dem Dunnett-Test gegeneinander getestet, der für multiple Mittelwertsvergleiche ausgelegt ist.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der Aluminiumsilicatstudie

#### 4.1.1 Ergebnisse FAL (Döll et al. 2004a; Döll et al. 2003b)

Das verwendete Probenmaterial stammt aus dem Institut für Tierernährung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft in Braunschweig. Im Rahmen der Doktorarbeit von S. Döll mit dem Titel „*In vitro* and *in vivo* studies on the detoxification of *Fusarium* toxin contaminated grain“, erfolgte dort der tierexperimentelle Teil des Versuches. Ein Teil der vorliegenden Daten wurde bereits veröffentlicht (Döll et al., 2003b; Döll et al., 2004a; Döll et al., 2005).

Alle Tiere überlebten die Mykotoxinaufnahmen während des Versuchablaufes. In den Gruppen 3 und 4 waren die Futteraufnahme und das mittlere Lebendgewicht der Tiere reduziert im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Außerdem war für diese Gruppen (3,4) die relativen Gewichte von Uterus, Magen und Herz erhöht. Weiterhin waren bei den Tieren, die Zearalenon und Deoxynivalenol supplementiert bekamen die Serumalbuminkonzentrationen reduziert und die Aktivität des Enzyms Glutamatdehydrogenase signifikant reduziert. Auf all diese Parameter zeigte die Gabe des Aluminiumsilicats keinen Effekt.

Bei der Messung der Gehalte der Gallenflüssigkeit an Zearalenon und seiner Metabolite und der Serumkonzentrationen an Deoxynivalenol konnte jeweils ein Anstieg in den Gruppen verzeichnet werden, die diese Mykotoxine gefressen hatten. Auch diese Parameter wurden durch das Aluminiumsilicat nicht verändert. Es wurden aber Effekte gefunden, die auf dem Zusatz des Adsorbens beruhen. In den beiden Gruppen, die den Zusatz gefüttert bekamen, ist die Futteraufnahme leicht zurückgegangen und die Aktivität der Enzyme Aspartat-Aminotransferase und  $\gamma$ -Glutamyltransferase stieg in diesen Gruppen signifikant an.

#### 4.1.2 Ergebnisse zur Bestimmung von Retinol, Retinylestern und $\alpha$ -Tocopherol

Eine Fütterung von kontaminiertem Mais allein sowie auch die zusätzliche Supplementation der detoxifizierenden Substanz hatten keinen Einfluss auf die Konzentrationen von Retinol und Retinylestern im Serum (Tabelle 13). Retinyloleat und Retinylstearat konnten im Serum nicht detektiert werden. Die Serumkonzentrationen an Vitamin E sinken sowohl in Abhängigkeit von der Zufuhr des Adsorbens, als auch bei Mykotoxingabe. Der geringste  $\alpha$ -Tocopherolgehalt wurde in Gruppe 4 detektiert, also bei den Schweinen, die sowohl Mykotoxine, als auch Adsorbens gefüttert bekamen. Auch auf die Konzentrationen von Retinol und Retinylestern in der Leber hatte eine Fütterung von Mykotoxinen im Mais allein, sowie auch die zusätzliche Gabe von Aluminiumsilicat, keinen Einfluss (Abbildung 7). Für die statistische Berechnung wurde ein nicht-parametrischer Test verwendet, der Mann-Whitney-U-Test, da die Gruppengröße kleiner zwanzig ist. Als signifikanter Unterschied wird  $p < 0,05$  definiert. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen in Bezug auf den Gehalt an Retinol, Retinylestern und  $\alpha$ -Tocopherol in Serum oder Leber der Schweine.

**Tabelle 13:  $\alpha$ -Tocopherol, Retinol- und Retinylesterkonzentrationen im Serum ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) von mykotoxinkontaminierten Schweinen im Rahmen einer Aluminiumsilicatstudie**

<i>Gruppe</i>	<i>Retinol</i> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	<i>Retinyl-oleat</i> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	<i>Retinyl-palmitat</i> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	<i>Retinyl-stearat</i> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	<i><math>\alpha</math>-Tocopherol</i> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
1	0,31 $\pm$ 0,07	nd	0.03 $\pm$ 0.01	nd	1,43 $\pm$ 0,73
2	0,34 $\pm$ 0,08	nd	0.03 $\pm$ 0.01	nd	1,13 $\pm$ 0,39
3	0,34 $\pm$ 0,09	nd	0.03 $\pm$ 0.01	nd	1,19 $\pm$ 0,44
4	0,29 $\pm$ 0,06	nd	0.03 $\pm$ 0.01	nd	0,91 $\pm$ 0,45

*Gruppenzugehörigkeit 1-4 siehe 3.1*

*nd = nicht detektierbar*

*keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ( $p < 0,05$ )*

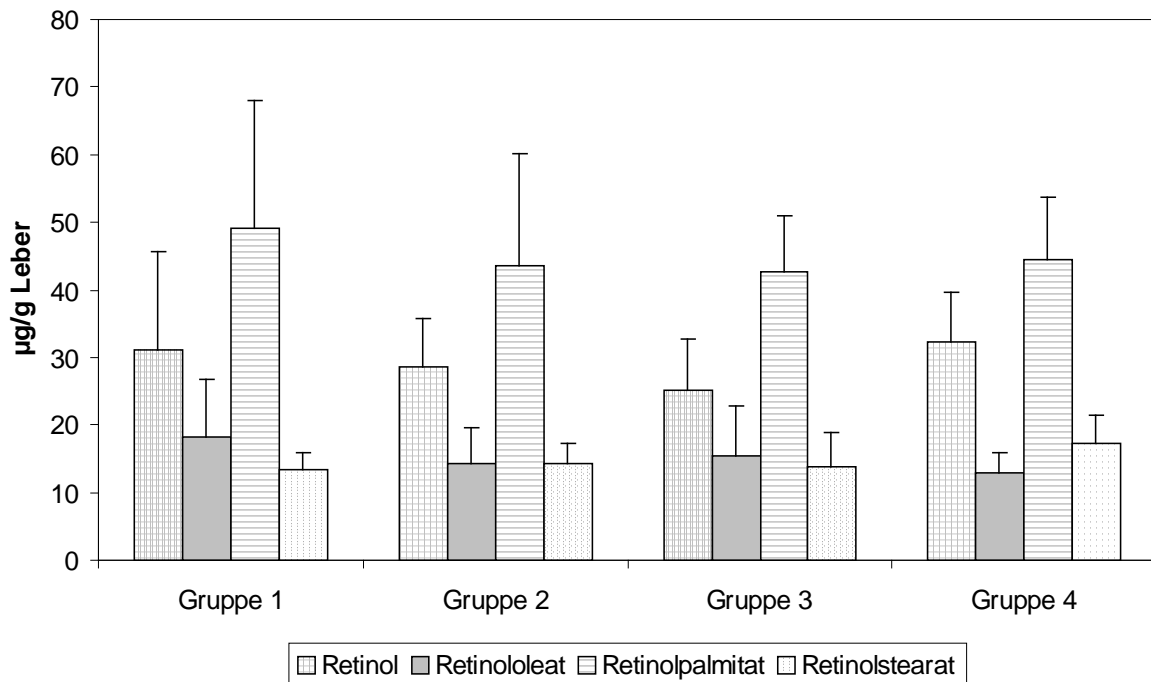


Abbildung 5: Retinol-, Retinoleat-, Retinopalmitat und Retinolstearatgehalt (in µg/ g) der Leber von mykotoxinkontaminierten Schweinen; Gruppenzugehörigkeit 1-4 siehe 3.1

#### 4.1.3 Ergebnisse der enzymatischen Methoden

Mittels enzymatischer Methoden wurden im Plasma der vier Gruppen die Gesamtkonzentrationen von Protein, Cholesterin und Triglyceriden bestimmt. In Abhängigkeit von der Futterzusammensetzung wurden Unterschiede im Gehalt dieser Inhaltsstoffe determiniert. Die Gesamtproteinkonzentration ist bei den Ferkeln, die kontaminierten Mais gefüttert bekamen, signifikant geringer als in den Kontrollgruppen. Dieses Ergebnis zeigt sich unabhängig davon, ob Adsorbens zugesetzt wurde oder nicht (Abbildung 8). Die Gehalte an Cholesterin und Triglyceriden zeigen keine Unterschiede in Abhängigkeit vom Zusatz von Aluminiumsilicat. Erfolgte im Futter eine Supplementation des adsorbierenden Inhaltstoffes, waren die Konzentrationen der Triglyceride zwar tendenziell geringer, als in den Gruppen, die keinen Zusatz erhielten, dieses Ergebnis ist aber nicht statistisch signifikant. Die Mykotoxinbelastung zeigt keinen Einfluss auf Cholesterin- und Triglyceridgehalt des Serum (Abbildung 9).

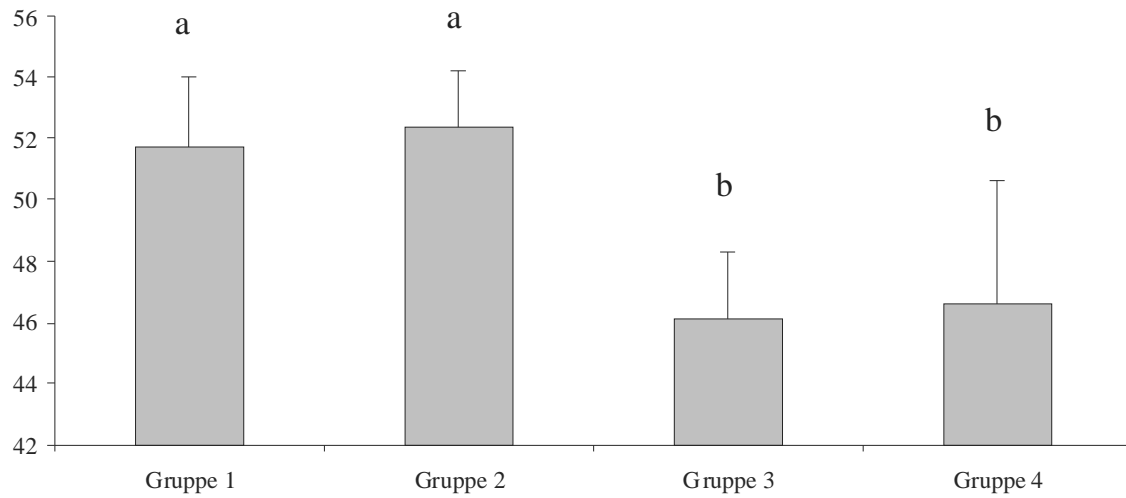


Abbildung 8: Proteingehalt des Plasma (in mg/ml) von mykotoxinkontaminierten Schweinen im Rahmen einer Aluminiumsilicatstudie; (unterschiedliche Buchstaben = signifikanter Unterschied); Gruppenzugehörigkeit 1-4 siehe 3.1

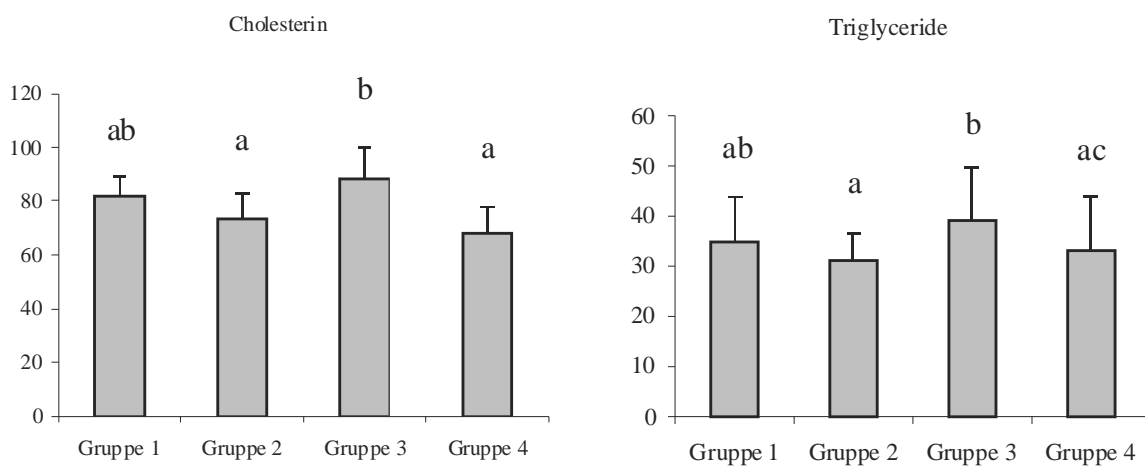


Abbildung 9: Cholesteringehalt und Triglyceridgehalt des Plasma von Schweinen in mg/dl; Darstellung der Unterschiede zwischen den Gruppen für die Gesamtproteinkonzentration und den Cholesteringehalt im Serum (unterschiedliche Buchstaben = signifikanter Unterschied); Gruppenzugehörigkeit 1-4 siehe 3.1

#### 4.1.4 Qualitativer RBP – Nachweis und Quantifizierung

Mit dem Western-Blot werden Proteinlösungen gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf einer PVDF-Membran immobilisiert und mit Hilfe spezifischer Antikörper spezifische Proteine nachgewiesen. So wurde semiquantitativ im Serum in allen vier Gruppen RBP nachgewiesen werden (Abbildung 10). Die entstandenen Proteinbanden wurden mittels BioRad-Imager ausgewertet und ihre Dichte (*Density*) unter zu Hilfenahme eines Blank-Wertes bestimmt. Der Wert für *Density* korreliert direkt mit dem Gehalt an RBP. Nach Abzug des Blank-Wertes ergaben sich die in Abbildung 11 dargestellten Gruppenunterschiede.

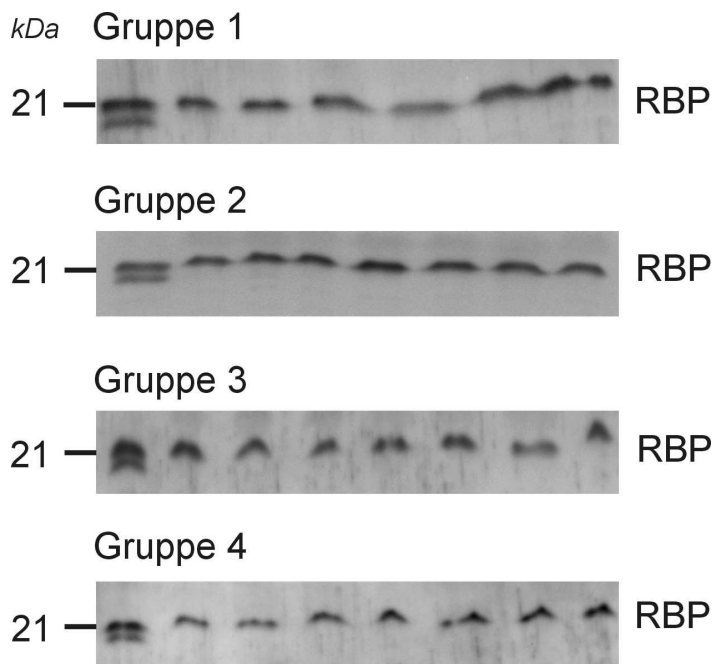


Abbildung 10: Nachweis des RBP im Serum von mykotoxinkontaminierten Schweinen im Rahmen einer Aluminiumsilicatstudie durch Detektion des zweiten Antikörpers mittels Luminol – Reagenz (erste Bande: Kontrollserum); Gruppenzugehörigkeit 1-4 siehe 3.1

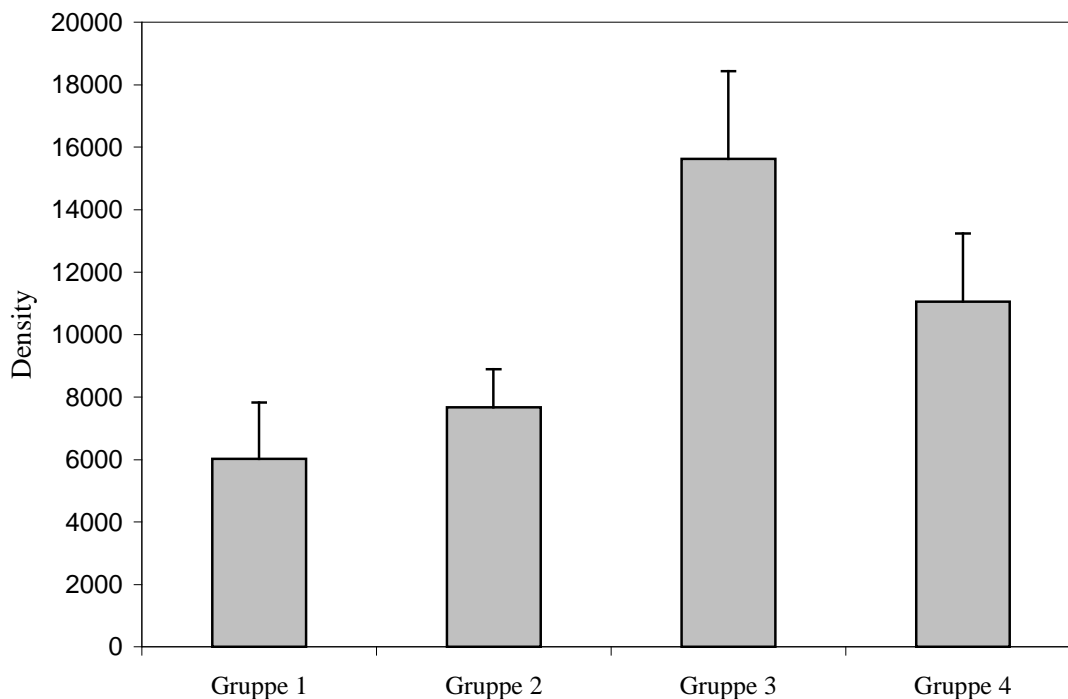


Abbildung 11: Indirekte Bestimmung des RBP-Gehaltes im Serum von mykotoxinkontaminierten Schweinen mittels Density-Bestimmung; Gruppenzugehörigkeit 1-4 siehe 3.1

Zur statistischen Prüfung der Density-Daten wurde zunächst eine univariate Varianzanalyse durchgeführt. Im Ergebnis sagt diese Analyse aus, dass die Gruppen sich unterscheiden ( $p < 0.001$ ). Die Gruppen wurden weiterhin mit dem Dunnett-Test gegeneinander getestet. Dabei wurde die Gruppe 1 als Kontrolle angesehen und alle anderen Gruppen wurden gegen diese getestet. Demnach unterscheidet sich Gruppe 1 von Gruppe 3 und 4, aber nicht von Gruppe 2 (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Ergebnisse des zweiseitiger Dunnett Test mit der Density als abhängige Variable**

<i>Testgruppe A</i>	<i>Testgruppe B</i>	<i>durschnittliche Abweichung (A-B)</i>	<i>Signifikanz</i>
Density 2	Density 1	1587	0.438
Density 3	Density 1	9900*	< 0.001
Density 4	Density 1	5029*	0.001

\* *durschnittliche Abweichung ist signifikant  $p > 0.05$ ; Gruppenzugehörigkeit 1-4 siehe 3.1*



## ***4.2 Ergebnisse der dosisabhängigen Fütterung von Deoxynivalenol und Zearalenon***

### **4.2.1 Ergebnisse FAL (Döll et al. 2003a)**

Das verwendete Probenmaterial stammt aus dem Institut für Tierernährung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft in Braunschweig. Im Rahmen der Doktorarbeit von S. Döll mit dem Titel „*In vitro* and *in vivo* studies on the detoxification of *Fusarium* toxin contaminated grain“, erfolgte dort der tierexperimentelle Teil des Versuches. Ein Teil der vorliegenden Daten wurde bereits veröffentlicht (Döll et al., 2003a).

Alle Tiere überlebten die Mykotoxinaufnahmen während des Versuchablaufes. Die Tiere erhielten ihr Futter ad libitum. Die Futteraufnahme der Kontrolltiere steigerte sich kontinuierlich in der Zeit der Intervention. Die Gruppen drei und vier verhielten sich während der ersten Versuchswoche wie die Kontrolltiere, dann stieg ihr Verzehr mehr an und in der letzten Versuchswoche stagnierte dieser Effekt. In den Gruppen eins und zwei war die Futteraufnahme signifikant reduziert, im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Effekte der Futteraufnahme werden im täglichen Körpergewicht der Tiere reflektiert. Das mittlere Körpergewicht der Tiere mit der höchsten Konzentration an Mykotoxinen im Futter ist geringer, als das der Kontrolltiere.

In alle Gruppen, die kontaminiertes Futter fraßen, konnten geschwollene Vulven beobachtet werden. Das mittlere Uterusgewicht der Tiere der Gruppe 4 war um bis zu 100% erhöht. Weiterhin zeigten alle kontaminierten Gruppen eine verringerte Aktivität des Leberenzym Glutamatdehydrogenase im Serum sowie reduzierte Serumgehalte an Follikel-Stimulierendem-Hormon. Die Immun-globuline zeigen keine Veränderung. In Abhängigkeit von der Konzentration der zugesetzten Toxine finden sich Zearalenon und dessen Metabolite in Gallenflüssigkeit, Leber und Urin und Deoxynivalenol in Serum, Gallenflüssigkeit und Urin.

#### 4.2.2 Daten zur Bestimmung von Retinol und Retinylestern

Die Fütterung von kontaminiertem Mais hatte in keiner Konzentration der vier verschiedenen Stufen zur fünften Gruppe (Kontrollgruppe) einen Unterschied erbracht, es zeigte sich kein Einfluss auf die Konzentrationen von Retinol und Retinylestern im Plasma (Tabelle 15). Retinyleoleat und Retinylestearat konnten nicht detektiert werden.

**Tabelle 15: Retinol- und Retinylesterkonzentrationen im Plasma ( $\mu\text{g/ml}$ ) von Schweinen, die unterschiedliche Mykotoxinkonzentrationen gefüttert bekamen**

<i>Gruppe</i>	<i>Retinol</i> ( $\mu\text{g/ml}$ )	<i>Retinyleoleat</i> ( $\mu\text{g/ml}$ )	<i>Retinylepalmitat</i> ( $\mu\text{g/ml}$ )	<i>Retinylestearat</i> ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	0,326	n.d.	$0.03 \pm 0.01$	n.d.
2	0,406	n.d.	$0.03 \pm 0.01$	n.d.
3	0,332	n.d.	$0.03 \pm 0.01$	n.d.
4	0,316	n.d.	$0.03 \pm 0.01$	n.d.
5	0,335	n.d.	$0.03 \pm 0.01$	n.d.

*n.d.* = nicht detektierbar; Gruppenzugehörigkeit 1-5 siehe 3.1

#### 4.2.3 Ergebnisse der enzymatischen Methoden

Mittels enzymatischer Methoden wurden im Plasma der vier Gruppen die Gesamtkonzentrationen von Protein, Cholesterin und Triglyceriden bestimmt. In Abhängigkeit von der Futterzusammensetzung wurden Unterschiede im Gehalt dieser Inhaltsstoffe determiniert. Die Cholesterinkonzentrationen zeigen in den Interventionsgruppen zum Teil signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zur Kontrollgruppe (Tabelle 16; Abbildung 12). Deutliche Unterschiede zeigen sich im Bereich der Gesamtproteinkonzentrationen (Tabelle 16). Mit steigenden Gehalten an Mykotoxinen im Futter steigt der Plasmaspiegel an Gesamtprotein nur bis zu einem bestimmten Mykotoxingehalt (0,530 mg Deoxynivalenol je kg Futter und 0,157 mg Zearalenon je kg Futter) im Futter und fällt danach wieder leicht. In der Gruppe mit der höchsten Intervention ist der Gesamtproteingehalt des Serum geringer als der in der Kontrollgruppe (Abbildung 12).

**Tabelle 16: Ergebnisse der enzymatischen Methoden der dosisabhängigen Fütterung von Deoxynivalenol und Zearalenon bei Schweinen; Darstellung der Unterschiede zwischen den Gruppen (unterschiedliche Buchstaben = signifikanter Unterschied)**

Gruppe	Proteingehalt in mg/ml	Triglyceridgehalt in mg/dl	Cholesteringehalt in mg/dl
1	44,9 ± 3,4 (a)	40,4 ± 11,3 (a)	91,3 ± 17,7 (a)
2	53,3 ± 4,2 (b)	47,3 ± 19,3 (b)	74,2 ± 12,4 (b)
3	57,0 ± 3,1 (c)	50,0 ± 17,6 (c)	79,1 ± 12,4 (bc)
4	52,8 ± 5,7 (bd)	53,7 ± 21,4 (d)	93,7 ± 19,2 (a)
5	49,8 ± 2,0 (e)	38,8 ± 8,6 (e)	89,2 ± 10,0 (ac)

Gruppenzugehörigkeit 1-5 siehe 3.1; unterschiedliche Buchstaben = signifikanter Unterschied

Für die Proteinkonzentrationen und den Cholesteringehalt sind signifikante Unterschiede vorhanden. Auch die Triglyceridwerte werden tendenziell reduziert mit steigendem Mykotoxinverzehr. Die Gruppe vier (geringster Mykotoxingehalt des Futters über Null) zeigt den größten Wert in Bezug auf die Triglyceridkonzentrationsbestimmung im Plasma. Alle Interventionsgruppen zeigen höhere Werte für die Triglyceridgehalte des Serum als die Kontrollgruppe. Allerdings sprechen hohe Standardabweichungen gegen eine grundsätzliche Aussage.

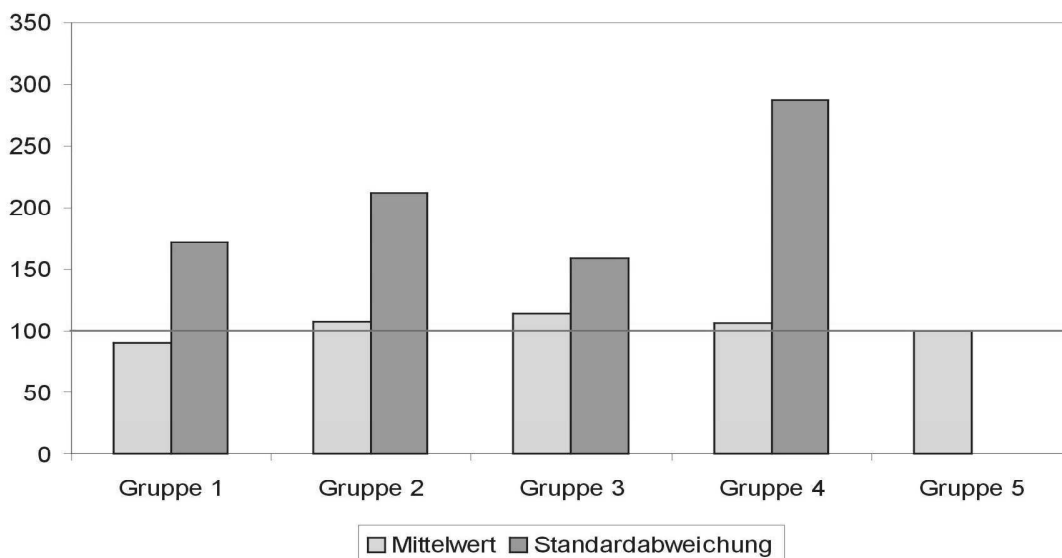


Abbildung 12: Plasmaspiegel an Gesamtprotein in Prozent (Berechnung beruht auf dem Bezug auf die Kontrollgruppe 5 = 100 %); Gruppenzugehörigkeit 1-5 siehe 3.1

## 5 Diskussion

Deoxynivalenol und Zearalenon gelten als Leittoxine bei der Einschätzung der Belastung mykotoxinbelasteter Futtermittel. Eine Deoxynivalenolintoxikation beim Schwein ist generell charakterisiert durch eine verringerte Futteraufnahme und eine Modulation der Immunantwort (Rotter et al. 1996). Zearalenon zeigt östrogene Wirkungen und kann zum Hyperöstrogenismus beim weiblichen Tier führen (Gajecki 2002). Weiterhin wurden gastrointestinale Läsionen, Effekte auf die Leber und Veränderungen klinischer Serumparameter beschrieben, die durch Fusarientoxine im Futter hervorgerufen wurden (Dänicke et al. 2000).

Im Auftrag des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz wurde in der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft eine Studie zum Thema „Risikofaktoren für die Fusarientoxinbildung in Futtermitteln und Vermeidungsstrategien bei der Futtermittelerzeugung und Fütterung“ angefertigt. Bei dem Teil der Studie, der sich mit der Risikoabschätzung der Verfütterung von kontaminierten Futtermitteln für landwirtschaftliche Nutztiere befasst, wurde zunächst hervorgehoben, dass eine Risikominimierung in der Tierernährung eine Einschätzung der Sensitivität der einzelnen Nutztierarten gegenüber Fusarientoxinen voraussetzt. Dabei wurde herausgearbeitet, dass den Toxinen Deoxynivalenol und Zearalenon unter den Produktionsbedingungen der Bundesrepublik Deutschland die größte ökonomische Bedeutung bei der Nutztierfütterung zukommt und das Schweine von allen landwirtschaftlichen Nutztieren am empfindlichsten auf diese Toxine reagieren (Bohm 1992). Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurde in der vorliegenden Studie einerseits getestet, in welchen Konzentrationen an den genannten Toxinen es zu welchen Effekten kommt und andererseits, in Hinblick auf Präventionsstrategien, die Wirkungen eines Detoxifikationsmittels untersucht. Der hier dargestellte Teil der Untersuchungen legt das Hauptaugenmerk auf den Einfluss der Toxine und des Detoxifikationsmittels auf Vitamin A und seine Ester, Vitamin E sowie auf den Plasmaspiegel an Cholesterin, Triglyceriden und Gesamtprotein.

## ***5.1 Wirkungen des Detoxifikationsmittels***

Mykotoxine in oder auf Futtermitteln können die Gesundheit und das Leistungsvermögen von Nutztieren beeinträchtigen. Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten der Minimierung von Mykotoxingehalten in der Fütterung, wodurch eine Reduktion des Risikos für Mensch und Tier erreicht werden kann. Oft werden Präventivmaßnahmen getroffen, um eine Toxinbildung in Futterpflanzen auf ein Minimum zu beschränken. Wenn diese Maßnahmen im Rahmen der Möglichkeiten ausgeschöpft sind, kann das gesundheitliche Risiko durch gezielte Detoxifikationsmaßnahmen verringert werden. Diese Detoxifikationsmittel müssen das Mykotoxin zerstören, inaktivieren oder unverfügbar machen, es dürfen keine neuen Toxine oder toxische Metabolite gebildet werden, Sporen müssen an Auskeimung und Wachstum gehindert werden und der Futterwert, ernährungsphysiologische und technologische Eigenschaften sollten möglichst erhalten bleiben (Karlovsky 1999). Das Detoxifikationsmittel muss tier- und umweltverträglich und sollte kostengünstig sein (Karlovsky 1999).

Die meisten Studien, die sich mit der Verminderung von Mykotoxikosen durch Detoxifikationsmittel beschäftigen, benutzen Aluminiumsilicat, hauptsächlich Zeolite und hydratisierte Sodium-, Calcium-, Aluminiumsilicate oder aber Mischungen, welche alle Aluminate, Silicate und einige austauschbare Ionen enthalten (Mumpton 1999). Die Eignung von Aluminiumsilicat als Adsorbens für Mykotoxine wird seit mehr als 20 Jahren studiert (Phillips et al. 1990). Die Relation von Adsorbens und Mykotoxin ist dabei schwer abzuschätzen und so muss die Effizienz eines Adsorbens in Abhängigkeit von der Mykotoxinmenge stets im Tierexperiment anhand der Parameter Gewichtszunahme, Futteraufnahme, Mortalität und Konzentration des entsprechenden Mykotoxin in Blut, Geweben und Organen untersucht werden (Huwig et al. 2001). Hinsichtlich der Wirksamkeit der Applikation von Aluminiumsilicat folgerte Huwig *et al.* anhand einer Metaanalyse, dass Aluminiumsilicat sehr wirksam ist bei Aflatoxinen, die Wirksamkeit bei Zearalenon, Ochratoxin und Trichothecenen aber limitiert ist (2001).

In der vorliegenden Studie wurde Aluminiumsilicat als Detoxifikationsmittel verwendet, welches in einer vorhergehenden Studie *in vitro* ein gutes Adsorptionsvermögen für Zearalenon zeigte, während es für Deoxynivalenol keine anwendungsbezogenen Effekte zeigte (Döll et al. 2004b). Positive Wirkungen, die eindeutig darauf hindeuten, dass die Toxine durch das

Detoxifikationsmittel unschädlich gemacht werden, konnten nun *in vivo* nicht beschrieben werden. In den beiden Gruppen, die mykotoxinbelastetes Futter gefüttert bekamen, waren die Futterraufnahme und in der Konsequenz das mittlere Lebendgewicht der Tiere reduziert im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Außerdem waren für diese Gruppen (kontaminierter Mais) die relativen Gewichte von Uterus, Magen und Herz erhöht, was bei Magen und Herz im gesunkenen Lebendgewicht der Tiere begründet liegt. Weiterhin waren bei den Tieren, die Zearalenon und Deoxynivalenol supplementiert bekamen, die Serumalbuminkonzentrationen tendenziell und die Aktivität des Enzyms Glutathiondehydrogenase signifikant reduziert. Auf all diese Parameter zeigte die Gabe des Aluminiumsilicats keinen Effekt.

Bei der Messung der Gehalte der Gallenflüssigkeit an Zearalenon und seiner Metabolite und der Serumkonzentrationen an Deoxynivalenol konnte jeweils ein Anstieg in den mykotoxinbelasteten Gruppen verzeichnet werden. Auch diese Parameter wurden durch das Aluminiumsilicat nicht verändert und reflektierten lediglich die Aufnahme der Giftstoffe. Es wurden aber Effekte gefunden, die auf dem Zusatz des Adsorbens beruhen. So ging in den beiden Gruppen, die den Zusatz gefüttert bekamen, die Futterraufnahme zurück und die Aktivität der Enzyme Aspartat-Aminotransferase und  $\gamma$ -Glutamyltransferase stieg in diesen Gruppen signifikant an. Inwieweit diese Effekte aber mit positiven Auswirkungen für die Schweine einhergehen ist unklar. Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass es dringend notwendig ist, *in vitro* getestete Detoxifikationsmittel in geeigneten Tierversuchen auf ihre Wirkungsweise zu prüfen.

Die in der vorliegenden Studie ermittelten Daten zum Gehalt an Retinol und Retinylestern in der Leber, sowie zum Gehalt an Retinol und  $\alpha$ -Tocopherol im Serum präpubertärer weiblicher Schweine ordnen sich in bereits veröffentlichte Studien ein. Der Vitamin-A-Gehalt der Leber von Schweinen korreliert stark mit dessen Aufnahme mit dem Futter und so differieren die Literaturangaben stark (Landes 1994). Für Deutschland wird eine mittlere Konzentration von 1000 IE/g mit einer Schwankung von 250-2900 IE/g Leber bei Schlachtschweinen angegeben (Schindler et al. 1987). Die ermittelten Daten (Kontrollgruppe) für den Lebergehalt der vorliegenden Studie ordnen sich mit 31  $\mu\text{g/g}$  Retinol, 18  $\mu\text{g/g}$  Retinyleat, 49  $\mu\text{g/g}$  Retinylpalmitat und 13  $\mu\text{g/g}$  Retinylstearat in diesen Bereich ein (entspricht 524 IE/g Leber). Eine kürzlich erschienene Studie zum Vitamin-A-Metabolismus bei laktierenden Sauen (n=14)

gibt an, dass die Retinylester ca. 3% des totalen Vitamin-A-Gehaltes im Serum ausmachen (Penniston und Tanumihardjo 2005). In der durchgeführten Untersuchung konnte lediglich Retinylpalmitat im Serum detektiert werden und macht nur einen hundertsten Teil des Gesamtgehaltes aus. Erstmals wurden die Retinylester in der Leber präpubertärer weiblicher Schweine bestimmt. Es zeigte sich folgende Verteilung am Gesamttergesteergehalt (Kontrollgruppe): 23% Retinyloleat, 61% Retinylpalmitat und 16% Retinylstearat. Dieses Verteilungsmuster wurde weder durch die Aufnahme von Mykotoxinen, noch durch das Adsorbens beeinflusst. Anderson et al. bestimmten im Rahmen einer Studie mit 84 juvenilen Schweinen einen Retinol-Serumgehalt von 0,34 µg/ml und einen Vitamin-E-Gehalt von 1,15 µg/ml (Anderson et al. 1995). In der vorliegenden Studie wurde für die Kontrollgruppe ein Retinolgehalt von 0,3 µg/ml und ein Vitamin-E-Gehalt von 1,4 µg/ml ermittelt.

Aufgrund der unter 4.3.2. dargestellten Ergebnisse kann man schlussfolgern, dass weder die Fütterung von Deoxynivalenol und Zearalenon, noch die Supplementation einer detoxifizierenden Substanz einen Effekt auf den Gehalt an Retinol im Plasma oder an Retinylestern in den Leberspeichern bei präpubertären weiblichen Ferkeln hat. Dagegen reduzierte sich der Vitamin-E-Gehalt im Serum der Tiere bei Aufnahme des Aluminiumsilicat, ebenso stellte sich bei den Schweinen, die Mykotoxine mit dem Futter aufnahmen, eine Reduktion des Vitamin-E-Gehaltes im Serum ein. Eine 1983 durchgeführte Studie zeigte einen Effekt des Detoxifikationsmittels Aluminiumsilicat auf den Vitamin-E-Gehalt im Schweineserum, der während einer Supplementation des Futters mit Ochratoxin A im Vergleich zu den Kontrolltieren reduziert war (Plank et al. 1990). In der Literatur wird beschrieben, dass T-2 Toxin mit einem Abfall der Konzentration von  $\alpha$ -Tocopherol im Serum (Vila et al. 2002) von Mäusen assoziiert ist. Bei Untersuchungen am Schwein beobachtete man, dass Aflatoxine die Serum- und Gewebekonzentrationen an  $\alpha$ -Tocopherol senken (Harvey et al. 1990). Zusätzlich zeigte man in einem weiteren Versuch, dass eine Fütterung von Vitamin E keinen protektiven Effekt auf mykotoxininduzierte Vorgänge hat, da aflatoxinbedingte Effekte wie reduziertes Körpergewicht, erhöhtes Lebergewicht, Änderung verschiedener biochemischer, hämatologischer und pathologischer Serumparameter sowie reduzierte Serumkonzentrationen an Retinol und Vitamin E nicht durch zusätzliche Vitamin-E-Supplementation beeinflusst werden konnten (Harvey et al. 1994). In vitro konnte dagegen gezeigt werden, dass die Genotoxizität von

Zearalenon durch Vitamin E positiv beeinflusst wird (Ghedira-Chekir et al. 1998). In einem weiteren Zellkulturversuch konnte eine tunesische Arbeitsgruppe eine Reduktion der gentoxischen Effekte von Zearalenon um 30-50% durch die Supplementation von Vitamin E belegen, indem in Nierenzellen von Affen und in Knochenmarkszellen von Mäusen dosisabhängig durch Zearalenon Micronuclei induziert wurden. Diese Effekte konnten durch Vitamin E beeinflusst werden, was durch die strukturelle Ähnlichkeit des Vitamins mit dem Mykotoxin und zusätzlich durch die antioxidative Wirkung erklärt wird (Ouanes et al. 2003). Über die antioxidative Wirkung hinaus werden für die Tocopherole aber auch direkte Membranwirkungen, Einflüsse auf die Proteinsynthese, Wirkungen bei hämatologischen Erkrankungen und Funktionen im neuromuskulären System diskutiert (Azzi und Stocker 2000). Es gibt außerdem Studien, die klar darauf hinweisen, dass Vitamin-E-Supplementation mit dem Futter aflatoxininduzierte Änderungen in der Steroidgenese verbessert (Verma und Nair 2001).

Die Mechanismen, die dem verringerten Vitamin-E-Gehalt zugrunde liegen können mit der vorliegenden Studie nicht geklärt werden. Tatsache ist, dass sowohl durch das Aluminiumsilicat, als auch durch die Mykotoxine eine Reduzierung des Vitamin-E-Gehaltes herbeigeführt wurde. Die geringste Serumkonzentration an Vitamin E findet sich bei den Schweinen, die die Mykotoxine und das Adsorbens mit dem Futter bekamen. Eine direkte Bindung des Aluminiumsilicates an das Vitamin im Darm könnte dessen Bioverfügbarkeit beeinflussen oder die Effizienz der Absorption könnte als Konsequenz einer gesteigerten Absonderung von Gallenflüssigkeit beeinträchtigt sein (Stedronsky 1994). Dies steht nicht notwendigerweise in Konflikt mit dem unbeeinflussten Vitamin-A-Status, da frühere Studien auf mögliche Unterschiede in den Absorptionsmechanismen dieser höchst lipophilen Mikronährstoffe hinweisen (Borel 2003). Untersuchungen zum Einfluss von Zearalenon oder Deoxynivalenol auf den Gehalt von Retinol im Plasma bei präpubertären weiblichen Ferkeln waren bisher nicht durchgeführt worden. Einen steigernden Effekt auf den Vitamin-A-Gehalt des Blutes beobachtete man bisher lediglich durch eine Diät mit Ochratoxin A, Zearalenon, Deoxynivalenol und Nivalenol bei Hennen (Garaleviciene et al. 2001). Beim Schwein wirkt Vitamin A antiinfektiös und erhöht die körperliche Widerstandskraft (Antikörperbildung), ist für Regeneration, Schutz und Aufbau von Haut und Schleimhaut verantwortlich und an der Regulation des Stoffwechsels beteiligt (Chew 1993; Cunha 1972). Da nahezu alle Zellen des Organismus Vitamin A benötigen,



muss das extrem hydrophobe Molekül des Retinol in Bindung an spezifische Proteine transportiert werden. Bis heute sind fünf Bindungsproteine isoliert und identifiziert worden (Liang et al. 2000). Der Transport von Retinol im Blut erfolgt über das Retinol-Bindungs-Protein (Liang und Xu 2000), und der Gehalt an RBP wird nachweislich durch die Aufnahme der Mykotoxine Deoxynivalenol und Zearalenon beeinflusst. Durch einen semiquantitativen Nachweis (die Dichte der RBP-Banden nach Westernblots) konnte gezeigt werden, dass der RBP-Gehalt im Serum der mykotoxinkontaminierten Schweine signifikant höher ist, als bei den Kontrolltieren, was durch eine univariante Varianzanalyse bestätigt wurde ( $p < 0.001$ ). Gleichzeitig bleibt, wie bereits ausgeführt, der Gehalt an Retinol und Retinylestern unbeeinflusst, wodurch es zum veränderten Verhältnis zwischen Vitamin und Transportprotein kommt. RBP ist ein negatives Akutphasenprotein und eigentlich wäre zu erwarten, dass sich seine Konzentration durch den Stress einer Mykotoxinbelastung reduziert. Außerdem wäre auch die geringere Nahrungsaufnahme der belasteten Tiere eher ursächlich für einen verminderten RBP-Gehalt gewesen. Außer in der Leber wurde bei Ratten auch in anderen extrahepatischen Geweben, z.B. in der Niere und Fettgewebe, mRNA für RBP nachgewiesen (Soprano et al. 1986, Makover et al. 1989). Eine Zellkultur luminaler Uteruszellen präpubertärer Schweine wies eine 25%ige Steigerung der Sekretion von RBP nach. Während sich die RBP-Synthese in der Leber unbeeinflusst durch östrogene Substanzen zeigt, konnte für die Niere eine Syntheseinduktion über den nukleären Östrogenrezeptor nachgewiesen werden (Whitman et al. 1990). Aufgrund des zearalenoninduzierten erhöhten Östrogenstatus der mykotoxinbelasteten Schweine ist anzunehmen, dass dadurch die RBP-Synthese in Niere und Uterus stimuliert wurde, was in der Folge zum erhöhten RBP-Gehalt im Serum führt. Weiterführende Studien zur Klärung dieses Sachverhaltes sollten sich auf quantitative ELISA-Daten stützen und auch den Gehalt an TTR erfassen, da der Retinol-RBP-Komplex zusätzlich an dieses tetramere Protein gebunden wird (Landes 1994). Nur so könnte die Ratioveränderung ganzheitlich beurteilt werden.

Es können außerdem Auswirkungen auf den Plasmagehalt an Protein, Cholesterin und Triglyceriden postuliert werden. Diese Wirkungen beruhen teilweise auf der Zugabe des Aluminiumsilicates. Der Gesamtproteingehalt wird durch die zusätzliche Gabe des Detoxifikationsmittels im Plasma nicht beeinflusst. Dafür zeigt sich im Rahmen der Aluminiumsilicatstudie eine Senkung der Plasmaproteinkonzentration in Abhängigkeit davon, ob

die Mykotoxine Zearalenon (0,629 mg/ kg) und Deoxynivalenol (2,120 mg/ kg Futter) dem Futter beigemischt waren oder nicht. Dieser Unterschied ist signifikant und gibt demnach einen deutlichen Hinweis auf die Toxinbelastung. Es ist bereits bekannt, dass Deoxynivalenol bei Schweinen die Apoptose von Leberzellen verursacht und die Albuminsekretion *in vitro* verringert (Pestka et al. 2005). Es gibt aber noch zwei weitere Mechanismen, die bei der Diskussion um einen reduzierten Proteingehalt beleuchtet werden müssen. Erstens bewirkt Deoxynivalenol zellulär eine Inhibition der Proteinbiosynthese (Rotter et al. 1996) und zweitens stehen beim Schwein bei akuter Deoxynivalenolintoxikation Erbrechen, Durchfall und Futterverweigerung bzw. in weniger akuten Fällen ein Rückgang im Futterverzehr und damit verbunden eine Verschlechterung der Zunahmen und Futterverwertung im Vordergrund (Pollmann et al. 1985), was auch in der vorliegenden Studie zu verzeichnen war. Die Proteinaufnahme ist demnach reduziert, was beim präpubertären Schwein zusätzlich in die Wachstumsphase fällt, wo der Proteinbedarf erhöht ist.

Weitere signifikante Unterschiede konnten in Bezug auf die Gehalte an Cholesterin und Triglyceriden gezeigt werden, in Abhängigkeit vom Zusatz des Futters mit Aluminiumsilicat. Erfolgte im Futter eine Supplementation des adsorbierenden Inhaltsstoffes, waren die Konzentrationen der Fette geringer (Cholesterin 16%, Triglyceride 7% bei Zusammenfassung der Gruppen), als in den Gruppen, die keinen Zusatz erhielten. Dies kann unter Umständen darauf zurückgeführt werden, dass das Aluminiumsilicat ähnliche Eigenschaften zeigt, wie Cholestyramin (Döll et al. 2004). Cholestyramin ist ein Medikament, das in der Humanmedizin bei Hypercholesterinämie angewandt wird, wodurch es zu einer gesteigerten Ausscheidung von Gallenflüssigkeit mit dem Fäzes kommt, was einerseits über komplexe Interaktionen mit dem Serumcholesterinspiegel gekoppelt ist (Stedronsky 1994) und andererseits direkt die Fettverdauung im Darm beeinträchtigen könnte. Die Mykotoxine Deoxynivalenol und Zearalenon haben keinen Einfluss auf den Cholesterin- und Triglyceridstoffwechsel.

## ***5.2 Dosisabhängigen Fütterung von Deoxynivalenol und Zearalenon***

Ziel der durchgeführten dosisabhängigen Fütterung von Deoxynivalenol und Zearalenon war es, zu prüfen, welche Effekte die einzelnen Konzentrationsstufen an Mykotoxinen auf den Vitamin-A-Stoffwechsel haben und ob Veränderungen der klinischen Parameter Serumcholesterol, Gesamtprotein und Triglyceridgehalt des Serum auftreten. Die unter 3.1. beschriebenen ansteigenden Konzentrationen an Deoxynivalonol und Zearalenon waren in einem Fütterungsexperiment dem Mais beigemischt, um zu prüfen, wie sensitiv die Tiere auf die Mykotoxine reagieren. Die Entwicklung der Tiere, klinische Serumparameter, Organgewichte und Reste der Mykotoxine in Körperflüssigkeiten und Geweben sind erste Anhaltspunkte dafür.

Die Betrachtung von Symptomen, die man im allgemeinen einer Vergiftung mit Fusarientoxinen zuschreibt, reicht nicht aus, um zu formulieren, dass eine solche Mykotoxikose auch vorliegt. Um spezifisch Beweise zu erbringen, müssen Reste der Toxine oder deren Metabolite nachgewiesen werden. Da Zearalenon und seine Metabolite dem enterohepatischen Kreislauf unterliegen (Biehl et al. 1993), findet eine Akkumulation dieser Substanzen in der Gallenflüssigkeit statt, so dass dort die höchsten Konzentrationen detektierbar sind. In Abhängigkeit von der Konzentration der zugesetzten Gifte fanden sich Zearalenon und dessen Metabolite in Gallenflüssigkeit, Leber und Urin und Deoxynivalenol in Serum, Gallenflüssigkeit und Urin. Der Urin wurde in verschiedenen Studien als Hauptausscheidungsweg für Deoxynivalenol beschrieben (Coppock et al. 1985; Dänicke et al. 2003; Prelusky et al. 1988).

Die Futteraufnahme der toxinbelasteten Tiere ging wie erwartet zurück. In Abhängigkeit von der Konzentration der Giftstoffe war dieser Effekt nicht linear, sondern quadratisch. Der Rückgang des mittleren Körpergewichts in den Interventionsgruppen ist im Rückgang der Futteraufnahme begründet. Das die Futteraufnahme durch die Belastung der Tiere mit den Mykotoxinen zurückgeht, ist bekannt. Dieser Effekt ist nicht nur durch orale Aufnahme, sondern auch durch intraperitoneale Applikation beobachtet worden (Prelusky 1997). Es ist anzunehmen, dass Änderungen in den Gehalten an Neurotransmittern im zentralen Nervensystem an der reduzierten Nahrungsaufnahme durch Deoxynivalenol beteiligt sind (Prelusky 1993). Außerdem wurden spezifische Serotonin-Rezeptor Antagonisten gefunden, wodurch das Deoxynivalenol-bedingte

Erbrechen von Schweinen unterbunden werden kann (Prelusky et al. 1993). Der Mechanismus anorektischer Reaktionen auf Deoxynivalenol ist bisher nicht geklärt. Zearalenon ist dafür bekannt, östrogene Wirkungen zu zeigen. Symptome wie Organvergrößerungen, größeres Uterusgewicht, ovarielle Atrophien oder vermehrte sichtbare Follikel sind in der Literatur beschrieben (Kuiper-Goodman et al. 1987). In allen Gruppen, die kontaminiertes Futter gefressen hatten, konnten geschwollene Vulven beobachtet werden. Das mittlere Uterusgewicht der Tiere, die die höchsten Gehalte an Fusarientoxinen im Futter erhielten, war um bis zu 100% erhöht. Weiterhin zeigten alle kontaminierten Gruppen eine verringerte Serumaktivität der Glutamatdehydrogenase, einem Enzym, das aus den Mitochondrien zerstörter Leberzellen stammt. Dieses Ergebnis induziert, dass keine akute Lebernekrose vorliegt. Es ist schwer zu interpretieren, wieso die Serumaktivität der Glutamatdehydrogenase sinkt, aber es kann vermutlich, bedingt durch Leberfibrosen, zu erhöhten Diffusionsbarrieren der Leber gekommen sein (Döll et al. 2003a). Die Fusarientoxine reduzierten weiterhin den Serumgehalt an Follikel-Stimulierendem-Hormon (FSH) und Triglyceriden. Die Variationen solcher Serumparameter könnten Resultat von Veränderungen in Synthese, Verbrauch oder Verteilung sein. Dies betrifft auch den klinischen Parameter Gesamtprotein.

Es wird beschrieben, dass bei einer Kontamination des Futters von Schweinen mit Aflatoxin B1 und Fumosin B1, der Gesamtproteinspiegel des Serum ansteigt, wobei ein signifikanter Anstieg von Albumin zu verzeichnen war (Dilkin et al. 2003). Eine andere Studie belegt, dass keine Änderung der Globulin-, Albumin- und Gesamtproteinkonzentrationen durch Aflatoxine hervorgerufen wird (Marin et al. 2002). 1993 führte eine norwegische Arbeitsgruppe ein ähnliches Experiment wie das der vorliegenden Studie mit sich ändernden Deoxynivalenolkonzentrationen (0, 0,7, 1,7, and 3,5 mg/kg Futter) in Hafer durch. Bei der Gruppe mit der höchsten Kontamination des Futters mit dem Toxin beobachtete man reduzierte Serumgehalte an Gesamtprotein und Albumin (Bergsjø et al. 1993). Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Mykotoxine Zearalenon und Deoxynivalenol kombiniert verabreicht, wobei deutliche Unterschiede im Bereich der Gesamtproteinkonzentrationen detektiert wurden. Mit steigenden Gehalten an Mykotoxinen im Futter steigt der Plasmaspiegel an Gesamtprotein (siehe auch 5.1). Bei der Konzentrationsstufe von 0,530 mg Deoxynivalenol je kg Futter und 0,157 mg Zearalenon je kg Futter erreicht der Proteingehalt des Serums sein Maximum. In der

Gruppe mit der höchsten Intervention ist der Gesamtproteingehalt des Serum dann aber geringer als der in der Kontrollgruppe, was den Ergebnissen der norwegischen Arbeitsgruppe entspricht. Anhand dieses Parameters zeigt sich deutlich, dass es essentiell ist, unterschiedliche Konzentrationsstufen zu untersuchen, um zu keiner Falschaussage zu kommen. Es ist wahrscheinlich, dass es bei den geringeren Mykotoxinbelastungen zu einer gesteigerten Synthese von Akutphasenproteinen, Immunglobulinen etc. kommt, während bei einer ausreichend starken Belastung des Organismus die allgemeine Proteinsynthese gestört wird. Die Trichothecene sind zytotoxische Substanzen. Sie hemmen die ribosomale Proteinsynthese durch Bindung an eine 60-S-Einheit eukaryontischer Zellen (Bennett und Klich 2003). Zusätzlich ist die Futteraufnahme der Schweine bedingt durch die Deoxynivalenolaufnahme signifikant reduziert.

Der Serumkonzentrationen an Cholesterin und Triglyceriden der Schweine zeigen sich stabil gegen eine Belastung der Tiere mit Zearalenon und Deoxynivalenol. Es gibt bisher keine Studie am Schwein, die den Einfluss irgendeines Mykotoxins auf diese Parameter zeigen konnte. Deoxynivalenol-kontaminierte Ratten zeigten einen signifikanten Anstieg des Insulinspiegels im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, während freie Fettsäuren und andere Blutparameter des Lipidstoffwechsels, wie Triglyceride, Cholesterin und Phospholipide sich auch hier nicht veränderten (Szkudelska et al. 2002). Der Einfluss von Zearalenon bzw. der Kombination von Zearalenon und Deoxynivalenol auf den Stoffwechsel von Cholesterin und Triglyceriden ist in der Literatur bisher für keine Spezies beschrieben worden.

Auch während dieses Experimentes konnte kein Einfluss der Mykotoxine Zearalenon und Deoxynivalenol auf den Gehalt des Serums an Retinol und auf die Leberspeicher bei den untersuchten Kontaminationismengen belegt werden. Es konnte kein Unterschied zur Kontrollgruppe gezeigt werden.

### ***5.3 Vergleichende und abschließende Betrachtungen***

In den beiden Studien wurden Tiere mit identischen Diäten gefüttert. Sowohl in der Aluminiumsilicatstudie, als auch bei der dosisabhängigen Fütterung von Deoxynivalenol und Zearalenon gab es eine Kontrollgruppe, bei der das verwendete Futter weder mit Mykotoxinen,

noch mit Aluminiumsilicat versetzt war und es gab je eine Gruppe, die 2.120 mg Deoxynivalenol/ kg Futter, 0.629 mg Zearalenon/ kg Futter und ohne den Zusatz von Aluminiumsilicat gefüttert bekamen. Bei allen Tieren wurden Retinol- und Retinylesterkonzentrationen des Serum, Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen und der Gesamtproteingehalt des Serum bestimmt. Die Ergebnisse der einander entsprechenden Versuchsansätze waren vergleichbar. Da es sich um getrennt durchgeführte Studien handelt, wurden die Daten somit reproduziert.

Die Diagnose der beiden untersuchten Toxine als Ursache von Problemen in Zucht und Viehbestand ist schwierig und kontrovers. Ist der Nachweis von Zearalenon und Deoxynivalenol in einer Futterprobe analytisch nicht möglich, ist dies nicht unbedingt aussagekräftig, da die Verteilung der Toxine im Getreide inhomogen ist. Außerdem können Symptome einer Intoxikation noch nach Elimination dieser Toxine im Futter vorhanden sein. Es ist weiterhin möglich, dass sich verschiedene Mykotoxine im Futter überlagern und sich dadurch eventuell ihre Wirkungen potenzieren, sie sich gegenseitig beeinflussen bzw. sich gänzlich andere Symptome zeigen. Durch Phytoöstrogene, welche die totale östrogene Aktivität des Futters verändern können, werden unter Umständen Symptome des Hyperöstrogenismus hervorgerufen (Bitsch et al. 2001). Durch den Nachweis von Zearalenon und seinen Metaboliten in der Gallenflüssigkeit kann man spezifisch eine Intoxikation nachweisen (Meyer et al. 1997), da Zearalenon dem enterohepatischen Kreislauf unterliegt und in der Galle akkumuliert wird (Biehl et al. 1993). Die Validierung des Nachweises von Resten von Deoxynivalenol in physiologischen Proben ist schwieriger, da das Molekül schnell wieder aus dem Organismus eliminiert wird (Coppock et al. 1985; Prelusky et al. 1988).

Es lässt sich aus den gewonnen Daten schlussfolgern, dass der Gesamtproteingehalt des Serums präpubertärer weiblicher Schweine einen deutlichen Hinweis auf eine Mykotoxinbelastung geben kann. Trotzdem kann man den Serumgehalt an Gesamtprotein nicht als Marker für eine Mykotoxinbelastung mit Zearalenon und Deoxynivalenol definieren, da es sich um eine unspezifische Wirkung handelt, die verschiedentlich beeinflusst wird (siehe 5.1, 5.2). Neben dem Proteingehalt des Serum wird der Vitamin-E-Gehalt in der vorliegenden Studie durch Belastung mit beiden Mykotoxinen negativ beeinflusst. Die Rolle von Antioxidantien, die über das Futter

der Tiere aufgenommen werden, wie z.B. Vitamin E, rückt nun zunehmend in den Mittelpunkt von Untersuchungen. Bei Untersuchungen am Schwein belegte man bereits früh, dass Aflatoxine die Serum- und Gewebekonzentrationen an Tocopherol senken (Harvey et al. 1990). Bis heute fehlten in diesem Zusammenhang Untersuchungen am Schwein für die Mykotoxine Zearalenon und Deoxynivalenol.

Bei allen diskutierten Ergebnissen ist zu beachten, dass auch der verwendete Kontrollmais nicht gänzlich frei von Mykotoxinen war. Außerdem litten die Tiere aufgrund der Mykotoxinbelastung an der bereits beschriebenen Verzehrsdepression. Dies ist in bezug auf die Änderung von Serumparametern, die im Zusammenhang mit Nahrungsaufnahme stehen stets als Störgröße (Confounder) zu betrachten. Günstig wäre es, in weiterführenden Studien eine Kontrollgruppe so zu konzipieren, dass die Tiere immer nur so viel Futter erhalten, wie die Tiere fressen, die mykotoxinbelastet sind.

## 6 Zusammenfassung

Hintergrund: Die Mykotoxine Deoxynivalenol und Zearalenon verursachen bei Schweinen u.a. Wachstumsdepressionen, Reproduktionsstörungen und beeinträchtigen die Futterraufnahme. Die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Einfluss von Mykotoxinen auf den Gehalt an Retinol und Retinylestern im Serum und in der Leber sowie auf ausgewählte Blutparameter beim präpubertären weiblichen Schwein“ beschäftigt sich mit den Auswirkungen der Toxine Deoxynivalenol und Zearalenon auf den Stoffwechsel der genannten fettlöslichen Vitamine und soll dabei sowohl eine Abhängigkeit von der Konzentration unterstreichen, als auch Wirkungen eines Detoxifikationsmittels beleuchten.

Material und Methoden: Die untersuchten Ferkel stammen aus dem Institut für Tierernährung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, wo umfangreiche Studien zu Strategien der Detoxifikation der Mykotoxine Deoxynivalenol und Zearalenon beim Schwein durchgeführt wurden. Um die Konzentrationsabhängigkeit der Mykotoxine zu untersuchen, wurden von 50 Tieren im Serum der Gehalt an Retinol und Retinylestern mittels rpHPLC analysiert. Die Wirkung des Detoxifikationsmittels wurde ebenso an 40 Tieren in Serum und Leber untersucht. Zusätzlich wurde hier der Vitamin-E-Gehalt ebenfalls mittels rpHPLC bestimmt. Enzymatisch wurden im Serum aller 90 Tiere Cholesterin-, Triglycerid- und Gesamtproteingehalt ermittelt.

Ergebnisse und Diskussion: Die in der vorliegenden Studie für die Kontrollgruppe ermittelten Gehalte an Retinol und Vitamin E ordnen sich in die in der Literatur beschriebenen Konzentrationsbereiche ein. Erstmals wurden die Retinylester in der Leber präpubertärer weiblicher Schweine bestimmt. Es zeigte sich folgende Verteilung am Gesamttergerhalt (Kontrollgruppe): 23% Retinyloleat, 61% Retinylpalmitat und 16% Retinylstearat. Dieses Verteilungsmuster wurde weder durch die Aufnahme von Mykotoxinen, noch durch das Adsorbens beeinflusst, sowie auch der Gehalt an Retinol im Plasma oder an Retinylestern in den Leberspeichern unbeeinflusst blieb. Neben einem geringeren Proteingehalt im Serum, entstanden durch die verminderte Futterraufnahme in Kombination mit einer gestörten Proteinsynthese, wird der Vitamin-E-Gehalt in der vorliegenden Studie durch die Belastung mit beiden Mykotoxinen sowie durch das Detoxifikationsmittel negativ beeinflusst, was alleine durch eine veränderte



Bioverfügbarkeit oder Absorptionsstörungen begründet sein könnte. Der RBP-Gehalt im Serum der mykotoxinbelasteten Schweine ist signifikant höher als bei den Kontrolltieren, möglicherweise aufgrund einer östrogeninduzierten gesteigerten Synthese von RBP u.a. in der Niere, wodurch es zu einem veränderten Verhältnis zwischen Vitamin und Transportprotein kommt. Insbesondere der Serumcholesteringehalt wird durch das Detoxifikationsmittel gesenkt. Als Ursache wird der direkte Einfluss auf den enterohepatischen Kreislauf und die biliäre Sekretion diskutiert. Die Mykotoxine Deoxynivalenol und Zearalenon haben keinen Einfluss auf den Cholesterin- und Triglyceridstoffwechsel.

## 7 Summary

### **The influence of mycotoxins on the amount of retinol and retinylesters in serum and in the liver as well as their affect on several blood parameters for prepubertal female piglets**

*Background:* The mycotoxins deoxynivalenol and zearalenol are considered to be responsible for poor nutrient intake, growth depression and reproduction disturbances. The present study, titled “The effect of mycotoxins on the amount of retinol, retinyl esters and selective parameters in liver and serum of prepubertal female piglets“ was conducted to study the effects of these mycotoxins on the metabolism of the fat soluble vitamins A and E and therewith underlining the relationship between toxin concentration and effect as well as showing the impact of a detoxifying agent.

*Material and methods:* The piglets were from the “Institut für Tierernährung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft”, Braunschweig, Germany, where extensive studies on detoxification of the mycotoxins deoxynivalenol and zearalenon took place. In order to examine the concentration dependence of mycotoxins, the amount of retinol and retinyl esters in serum was determined by rpHPLC. The effect of the detoxifying agent was shown the same way in serum and liver of 40 animals. Additionally the concentration of vitamin E was also measured by rpHPLC. The concentrations of cholesterol, triglycerids and proteins in serum were analysed enzymatically.

*Results and discussion:* The amounts of retinol and  $\alpha$ -tocopherol in the control group were in accordance with previous studies described in the literature whilst retinyl esters in liver of prepubertal female piglets were determined for the first time. The distribution of hepatic retinyl esters in the control group was as follows: 23% retinyloleate, 61% retinylpalmitate and 16% retinylstearate. This pattern was neither affected by the admission of mycotoxins, nor by the adsorbens. Furthermore the content of retinol in the plasma as with that of retinyl esters in liver remained unaffected. Besides the decreased protein concentration in serum, which may be due to the decreased food intake in combination with impaired protein synthesis, the amount of vitamin E in serum was also negatively influenced by mycotoxins and aluminiumsilicate. This could be caused by an impaired bioavailability or a disordered absorption. The amount of retinol-binding

protein in serum of mycotoxin fed piglets was significantly higher compared to the controls. The higher amount may be caused by an estrogen induced synthesis of retinol-binding protein in the kidneys. The amount of cholesterol and triglycerids in serum was influenced by the detoxifying agent. This could be due to an interaction between aluminiumsilicate and the metabolism of cholesterol or a direct interference with the digestion of fat in the intestine. The mycotoxins deoxynivalenol and zearalenon do not have any effect on the metabolism of cholesterol and triglycerids.

## 8 Literaturverzeichnis

Abel S, Gelderblom WC. Oxidative damage and fumonisin B1-induced toxicity in primary rat hepatocytes and rat liver in vivo. *Toxicology* 1998; 131:121-31.

Anderson LE, Myer RO, Brendemuhl JH, McDowell LR. The effect of excessive dietary vitamin A on performance and vitamin E status in swine fed diets varying in dietary vitamin E. *J Anim Sci*; 73: 1093-1098.

Atroschi F, Rizzo A, Biese I, Veijalainen P, Saloniemi H, Sankari S, Andersson K. Fumonisin B1-induced DNA damage in rat liver and spleen: effects of pretreatment with coenzyme Q10, L-carnitine, alpha-tocopherol and selenium. *Pharmacol Res* 1999; 40:459-67.

Atroschi F, Rizzo A, Westermarck T, Ali-vehmas T. Antioxidant nutrients and mycotoxins. *Toxicology* 2002; 180:151-67.

Atroschi F, Rizzo A, Westermarck T, Ali-vehmas T. Effects of tamoxifen, melatonin, coenzyme Q10, and L-carnitine supplementation on bacterial growth in the presence of mycotoxins. *Pharmacol Res* 1998; 38:289-95.

Azzi A, Stocker A. Vitamin E: non-antioxidant roles. *Prog Lipid Res* 2000; 39:231-55.

Bata A, Vanyi A, Lasztity R. Simultaneous detection of some fusariotoxins by gas-liquid chromatography. *J Assoc Off Anal Chem* 1983; 66:577-81.

Bauer J, Heinritzi K, Gareis M, Gedek B. Änderungen im Genitaltrakt des weiblichen Schweins nach Fütterung praxisrelevanter Mengen an Zearalenon. *Tierärztliche Praxis* 1987; 15:33-6.

Beasley VR, Lambert RJ. The apparently minimal hazard posed to human consumers of products from animals fed trichothecene-contaminated grains. *Vet Hum Toxicol* 1990; 32:27-39.

Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16:497-516.

Berger T, Esbenshade KL, Diekman MA, Hoagland T, Tuite J. Influence of prepubertal consumption of zearalenone on sexual development of boars. *J Anim Sci* 1981; 53:1559-64.

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

Biehl ML, Prelusky DB, Koritz GD, Hartin KE, Buck BW, Trenholm HL. Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; 121:152-9.

Biesalski HK, Nohr D. New aspects in vitamin A metabolism: the role of retinyl esters as systemic and local sources for retinol in mucous epithelia. *J Nutr* 2004; 134.

Birzele B, Prange A, Kramer J. Deoxynivalenol and ochratoxin A in German wheat and changes of level in relation to storage parameters. *Food Addit Contam* 2000; 17:1027-35.

Bitsch N, Korner W, Postupka S, Brunn H. Application of the E-screen assay to test for oestrogenically active substances in swine feed. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2001; 85:369-77.

Bohm J. Die Bedeutung der Mykotoxine Desoxynivalenol, Zearalenon und Ochratoxin A für landwirtschaftliche Haustiere. *Arch Tierernähr* 1992; 42:95-111.

Borel P. Factors affecting intestinal absorption of highly lipophilic food microconstituents (fat-soluble vitamins, carotenoids and phytosterols). *Clin Chem Lab Med* 2003; 41:979-94.

Boulton M, Rozanowska M, Rozanowski B. Retinal photodamage. *J Photochem Photobiol B* 2001; 64:144-61.

Carey GB. The swine as a model for studying exercise-induced changes in lipid metabolism. *Med Sci Sports Exerc* 1997; 29:1437-43.

Chew BP. Effects of supplemental beta-carotene and vitamin A on reproduction in swine. *J Anim Sci* 1993; 71:247-52.

Clark L. Hypervitaminosis A: a review. *Aust Vet J* 1971; 47:568-71.

Cooper DA, Eldridge AL, Peters JC. Dietary carotenoids and certain cancers, heart disease, and age-related macular degeneration: a review of recent research. *Nutr Rev* 1999; 57:201-14.

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

Creppy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett* 2002; 127:19-28.

Cunha TJ. Vitamins for swine feeding and nutrition. (A summary of new developments). *Vet Med Small Anim Clin* 1972; 67:263-8.

Czerwiecki L, Czajkowska D, Witkowska-Gwiazdowska A. On ochratoxin A and fungal flora in Polish cereals from conventional and ecological farms - Part 1: occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1997. *Food Addit Contam* 2002a; 19:470-7.

Czerwiecki L, Czajkowska D, Witkowska-Gwiazdowska A. On ochratoxin A and fungal flora in Polish cereals from conventional and ecological farms. Part 2: occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1998. *Food Addit Contam* 2002b; 19:1051-7.

Dänicke S, Matthes S, Halle I, Ueberschar KH, Döll S, Valenta H. Effects of graded levels of Fusarium toxin-contaminated wheat and of a detoxifying agent in broiler diets on performance, nutrient digestibility and blood chemical parameters. *Br Poult Sci* 2003; 44:113-26.

Dänicke S, Swiech E, Buraczewska L, Ueberschar KH. Kinetics and metabolism of zearalenone in young female pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2005; 89:268-76.

Dänicke S, Valenta H, Ueberschar KH. Risikoabschätzung und Vermeidungsstrategien bei der Fütterung. Risikofaktoren für die Fusariumtoxinbildung und Vermeidungsstrategien bei der Futtermittelerzeugung und Fütterung. *Landbauforsch. Völk., Sonderheft* 2000; 216:35 - 139.

Dawson MI. The importance of vitamin A in nutrition. *Curr Pharm Des* 2000; 6:311-25.

Dilkin P, Zorzete P, Mallmann CA, Gomes JD, Utiyama CE, Oetting LL, Correa B. Toxicological effects of chronic low doses of aflatoxin B(1) and fumonisin B(1)-containing Fusarium moniliforme culture material in weaned piglets. *Food Chem Toxicol* 2003; 41:1345-53.

Döll S, Dänicke S. In vivo detoxification of Fusarium toxins. *Arch Anim Nutr* 2004a; 58:419-41.

Döll S, Dänicke S, Ueberschar KH, Valenta H, Schnurrbusch U, Ganter M, Klobasa F, Flachowsky G. Effects of graded levels of fusarium toxin contaminated maize in diets for female weaned piglets. *Arch Anim Nutr* 2003a; 57:311 - 34.

Döll S, Dänicke S, Valenta H, Flachowsky G. In vitro studies on the evaluation of mycotoxin detoxifying agents for their efficacy on deoxynivalenol and zearalenone. *Arch Anim Nutr* 2004b; 58:311-24.

Döll S, Gericke S, Dänicke S, Raila J, Ueberschar KH, Valenta H, Schnurrbusch U, Schweigert FJ, Flachowsky G. The efficacy of a modified aluminosilicate as a detoxifying agent in Fusarium toxin contaminated maize containing diets for piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2005; 89:342-58.

Drochner W. Das Auftreten von Fusarientoxinen im Futter. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 1989; 96:350-2.

Europäische Kommission; Reports on Task for scientific cooperation. Report of experts participating in Task 3.2.10. Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States, April 2003

Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Striegl G, Wäg G. Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am J Clin Nutr* 1991; 53.

Etienne M, Jemmali M. Effects of zearalenone (F2) on estrous activity and reproduction in gilts. *J Anim Sci* 1982; 55:1-10.

Fawzi W. Micronutrients and human immunodeficiency virus type 1 disease progression among adults and children. *Clin Infect Dis* 2003; 37:S112-6.

Fitzpatrick DW, Picken CA, Murphey LC, Buhr MM. Measurement of the relative binding affinity of zearalenone, alpha-zearalenol and beta-zearalenol for uterine and oviduct estrogen receptors in swine, rats and chicken: an indicator of estrogenic potencies. *Comp. Biochem. Physiol.* 1989; 94c:691 - 4.

Flisiak R. Role of Ito cells in the liver function. *Pol J Pathol* 1997; 48:139-45.

Forterre S. Vorkommen und diagnostische Bedeutung von Harnpeptiden und -proteinen bei Hunden mit Nierenerkrankungen und Harnsteinen. Inaugural-Dissertation zu Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin. 2003; 37-38.

Gajecki M. Zearalenone--undesirable substances in feed. *Pol J Vet Sci* 2002; 5:117-22.

Garaleviciene D, Pettersson H, Augonyte G, Elwinger K, Lindberg JE. Effects of mould and toxin contaminated barley on laying hens performance and health. *Arch Tierernähr* 2001; 55:25-42.

Gautier JC, Holzhäuser D, Markovic J, Gremaud E, Schilter B, Turesky RJ. Oxidative damage and stress response from ochratoxin a exposure in rats. *Free Radic Biol Med* 2001; 30:1089-98.

Gerlach T, Biesalski HK, Bässler KH. Vitamin-A-Bestimmungen im Serum und ihr Wert bei der Beurteilung des Vitamin-A-Status. *Z Ernährungswiss* 1988; 27:57-70.

Ghedira-Chekir L, Maaroufi K, Zakhama A, Ellouz F, Dhouib S, Creppy EE, Bacha H. Induction of a SOS repair system in lysogenic bacteria by zearalenone and its prevention by vitamin E. *Chem Biol Interact* 1998; 113:15-25.

Green J. Vitamin E and the biological antioxidant theory. *Ann N Y Acad Sci* 1972; 203:29-44.

Grosse Y, Chekir-Ghedira L, Huc A, Obrecht-Pflumio S, Dirheimer G, Bacha H, Pfohl-Leszkowicz A. Retinol, ascorbic acid and alpha-tocopherol prevent DNA adduct formation in mice treated with the mycotoxins ochratoxin A and zearalenone. *Cancer Lett* 1997; 114:225-9.

Harrison EH, Hussain MM. Mechanisms involved in the intestinal digestion and absorption of dietary vitamin A. *J Nutr* 2001; 131:1405-8.

Harvey RB, Kubena LF, Elissalde MH. Influence of vitamin E on aflatoxicosis in growing swine. *Am J Vet Res* 1994; 55:572-7.

Harvey RB, Kubena LF, Huff WE, Corrier DE, Rottinghaus GE, Phillips TD. Effects of treatment of growing swine with aflatoxin and T-2 toxin. *Am J Vet Res* 1990; 51:1688-93.

Hata Y, Nakajima K. Life-style and serum lipids and lipoproteins. *J Atheroscler Thromb* 2000; 7:177-97.

Herrera E, Barbas C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J Physiol Biochem* 2001; 57:43-56.

Hidiroglou N, Cave N, Atwall AS, Farnworth ER, McDonnel ER. Comparative vitamin E requirements and metabolism in livestock. *Ann Rech Vet* 1992; 23:337-59.

Hsia CC, Wu JL, Lu XQ, Li YS. Natural occurrence and clastogenic effects of nivalenol, deoxynivalenol, 3-acetyl-deoxynivalenol, 15-acetyl-deoxynivalenol, and zearalenone in corn from a high-risk area of esophageal cancer. *Cancer Detect Prev* 1988; 13:79-86.

Huwig A, Freimund S, Kappeli O, Dutler H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicol Lett* 2001; 122:179-88.

Jackson LS, Bullerman LB. Effect of processing on Fusarium mycotoxins. *Adv Exp Med Biol* 1999; 459:243-61.

Kametani T, Furuyama H. Synthesis of vitamin D<sub>3</sub> and related compounds. *Med Res Rev* 1987; 7:147-71.

Kappus H, Diplock AT. Tolerance and safety of vitamin E: a toxicological position report. *Free Radic Biol Med* 1992; 13:55-74.

Karlovsky P. Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Nat Toxins* 1999; 7:1-23.

Kolb E. Das Problem eines hohen Vitamin-A-Gehalt in der Leber von Kälbern, Rindern, Schafen und Schweinen für den Konsumenten. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 1994; 107:342-7.

König T. Entwicklung der Ernährungsforschung beim Schwein - Inaugural-Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover 2004.

Kuiper-Goodman T, Scott PM, Watanabe H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul Toxicol Pharmacol* 1987; 7:253-306.

Landes E. Die Konzentrationen von Vitamin A in der Leber von Rindern und Schweinen. *Übersicht Tierernährung* 1994; 22: 281-320.

Makover A, Soprano DR, Wyatt ML, Goodman DS. Localization of RBP mRNA in the rat kidney and in perpheric fat tissue. *J Lipid Res* 1989; 30: 171-180.

Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA, Evans RM. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 1990; 345:224-9.

Marasas WF. Fumonisin: history, world-wide occurrence and impact. *Adv Exp Med Biol* 1996; 392:1-17.



Marin DE, Taranu I, Bunaciu RP, Pascale F, Tudor DS, Avram N, Sarca M, Cureu I, Criste RD, Suta V, Oswald IP. Changes in performance, blood parameters, humoral and cellular immune responses in weanling piglets exposed to low doses of aflatoxin. *J Anim Sci* 2002; 80:1250-7.

Marx H, Gedek B, Kollarczik B. Vergleichende Untersuchungen des mykotoxiko-logischen Status von alternativem und herkömmlich gewachsenem Getreide. *Z Lebensm Unters Forsch* 1995; 201:83-6.

McLellan GJ, Cappello R, Mayhew IG, Elks R, Lybaert P, Watte C, Bedford PG. Clinical and pathological observations in English cocker spaniels with primary metabolic vitamin E deficiency and retinal pigment epithelial dystrophy. *Vet Rec* 2003; 153:287-92.

Meyer K, Usleber E, Martlbauer E, Bauer J. Nachweis von Zearalolon-Metaboliten in der Galle von Zuchtsauen mit Fertilitätsstörungen. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 1997; 110:281-3.

Middleton E, Jr., Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000; 52:673-751.

Miller ER, Kornegay ET. Mineral and vitamin nutrition of swine. *J Anim Sci* 1983; 57:315-29.

Miller JD. Aspects of the ecology of *Fusarium* toxins in cereals. *Adv Exp Med Biol* 2002; 504:19-27.

Miller JD. Factors that affect the occurrence of fumonisin. *Environ Health Perspect* 2001; 109:321-4.

Mirocha CJ, Pathre SV, Robison TS. Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Food Cosmet Toxicol* 1981; 19:25-30.

Mumpton FA. La roca magica: uses of natural zeolites in agriculture and industry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:3463-70.

Nagao A. Oxidative conversion of carotenoids to retinoids and other products. *J Nutr* 2004; 134:237-40.

Napoli JL. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1440:139-62.

Napoli JL, Beck CD. Alpha-tocopherol and phylloquinone as non-competitive inhibitors of retinyl ester hydrolysis. *Biochem J* 1984; 223:267-70.

Olsen M, Pettersson H, Sandholm K, Visconti A, Kiessling K.H. Metabolism of zearalenone by sow intestinal mucosa in vitro. *Food Chem Toxicol* 1987; 25:681-3.

Olson JA. Carotenoids and human health. *Arch Latinoam Nutr* 1999; 49:7S-11S.

Ouanes Z, Abid S, Ayed I, Anane R, Mobio T, Creppy EE, Bacha H. Induction of micronuclei by Zearalenone in Vero monkey kidney cells and in bone marrow cells of mice: protective effect of Vitamin E. *Mutat Res* 2003; 538:63-70.

Penniston KL, Tanumihardjo SA. Elevated serum concentrations of beta-glucuronide metabolites and 4-oxoretinol in lactating sows after treatment with vitamin A: a model for evaluating supplementation in lactating women. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 851-8.

Pestka JJ, Smolinski AT. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2005; 8:39-69.

Phillips TD, Clement BA, Kubena LF, Harvey RB. Detection and detoxification of aflatoxins: prevention of aflatoxicosis and aflatoxin residues with hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Vet Hum Toxicol* 1990; 32:15-9.

Pieters MN, Freijer J, Baars BJ, Fiolet DC, van Klaveren J, Slob W. Risk assessment of deoxynivalenol in food: concentration limits, exposure and effects. *Adv Exp Med Biol* 2002; 504:235-48.

Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000; 63:1035-42.

Plank G, Bauer J, Grunkemeier A, Fischer S, Gedek B, Berner H. Der schützende Effekt von Adsorbentien gegen Ochratoxin A beim Schwein. *Tierärztl Prax* 1990; 18:483-9.

Pollmann DS, Koch BA, Seitz LM, Mohr HJ, Kennedy GA. Deoxynivalenol-contaminated wheat in swine diets. *J Anim Sci* 1985; 60:239-47.

Prelusky DB. Effect of intraperitoneal infusion of deoxynivalenol on feed consumption and weight gain in the pig. *Nat Toxins* 1997; 5:121-5.

Prelusky DB. The effect of low-level deoxynivalenol on neurotransmitter levels measured in pig cerebral spinal fluid. *J Environ Sci Health B* 1993; 28 (6):731-61.

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

Prelusky DB, Trenholm HL. The efficacy of various classes of anti-emetics in preventing deoxynivalenol-induced vomiting in swine. *Nat Toxins* 1993; 1:296-302.

Raila J, Schweigert FJ. Die Rolle der Niere im Vitaminstoffwechsel. *Berl Munch Tierärztl Wochenschr* 2001; 114:257-66.

Rizzo AF, Atroshi F, Ahotupa M., Sankari S., Elovaara E. Protective effect of antioxidants against free radical-mediated lipid peroxidation induced by DON or T-2 toxin. *Zentralbl Veterinärmed A* 1994; 41:81-90.

Roberts AB, Sporn MB. The retinoids: Cellular biology and biochemistry of retinoids. Sporn, M. B. Academic Press, Orlando; 1984.

Ross AC, Gardner EM. The function of vitamin A in cellular growth and differentiation, and its roles during pregnancy and lactation. *Adv Exp Med Biol* 1994; 352:187-200.

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

Schindler R, Scholz M, Feldheim W. Quantitative Bestimmung von Vitamin A in Leber und Leberwurst unter Anwendung von HPLC. *Z Lebensm Unters Forsch* 1987; 185: 208-212.

Schisler DA, Khan NI, Boehm MJ. Biological control of Fusarium head blight of wheat and deoxynivalenol levels in grain via use of microbial antagonists. *Adv Exp Med Biol* 2002; 504:53-69.

Schoknecht PA. Swine nutrition: nutrient usage during pregnancy and early postnatal growth, an introduction. *J Anim Sci* 1997; 75:2705-7.

Schollenberger M, Suchy S, Jara HAT, Drochner W, Muller HM. A survey of Fusarium toxins in cereal-based foods marketed in an area of southwest Germany. *Mycopathologia* 1999; 147:49-57.

Schothorst RC, van Egmond HP. Report from SCOOP task 3.2.10 "collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states". Subtask: trichothecenes. *Toxicol Lett* 2004; 153:133-43.

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

Schumaker VN, Adams GH. Circulating lipoproteins. *Annu Rev Biochem* 1969; 38:113-36.

Schweigert FJ, Klingner J, Hurtienne A, Zunft HJ. Vitamin A, carotenoid and vitamin E plasma concentrations in children from Laos in relation to sex and growth failure. *Nutr J* 2003; 2:17.

Schweigert FJ, Raila J. Mechanisms involved in the intestinal digestion and absorption of dietary vitamin A. *J Nutr* 2002; 132:324-5.

Schweigert FJ, Zucker H. Individuelle Unterschiede des Vitamin-A-Metabolismus bei Carnivoren - ein Überblick. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 1991; 104:89-90; 5-8.

Scott PM. Fumonisin. *Int J Food Microbiol* 1993; 18:257-70.

Sklan D. Vitamin A in human nutrition. *Prog Food Nutr Sci* 1987; 11:39-55.

Sklan D, Donoghue S. Vitamin E response to high dietary vitamin A in the chick. *J Nutr* 1982; 112:759-65.

Sommer A. Vitamin A: its effect on childhood sight and life. *Nutr Rev* 1994; 52:S60-6.

Soprano DR, Soprano KJ, Goodman DS. RBP mRNA levels in the liver and extrahepatic tissues of the rat. *J Lipid Res* 1986; 27: 166-171.

Stedronsky ER. Interaction of bile acids and cholesterol with non-systemic agents having hypocholesterolemic properties. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1210: 255-287.

Szkudelska K, Szkudelski T, Nogowski L. Short-time deoxynivalenol treatment induces metabolic disturbances in the rat. *Toxicol Lett* 2002; 136:25-31.

Tengerdy RP. Immunity and disease resistance in farm animals fed vitamin E supplement. *Adv Exp Med Biol* 1990; 262:103-10.

Thompson DA, Gal A. Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium: genes, mutations, and diseases. *Prog Retin Eye Res* 2003; 22:683-703.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 1992; 24:145-9.

Underwood BA, Arthur P. The contribution of vitamin A to public health. *Faseb J* 1996; 10:1040-8.

van den Berg H. Principles of vitamin status assessment and the present state of art of the methodology. 6. Symposium "Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung bei Mensch und Tier" 1997.

Verma RJ, Nair A. Ameliorative effect of vitamin E on aflatoxin-induced lipid peroxidation in the testis of mice. *Asian J Androl* 2001; 3:217-21.

Vila B, Jaradat ZW, Marquardt RR, Frohlich AA. Effect of T-2 toxin on in vivo lipid peroxidation and vitamin E status in mice. *Food Chem Toxicol* 2002; 40:479-86.

Whitman MM, Harnish DC, Soprano KJ, Soprano DR. RPB mRNA is induced by estrogen in the kidney but not in the liver. *J Lipid Res* 1990; 31: 1483-1490.

Wolf G. The intracellular vitamin A-binding proteins: an overview of their functions. *Nutr Rev* 1991; 49:1-12.

Wollenhaupt K, Dänicke S, Brussow KP, Tiemann U. In vitro and in vivo effects of deoxynivalenol (DNV) on regulators of cap dependent translation control in porcine endometrium. *Reprod Toxicol* 2005; 10:10.

Yamaguchi M, Nakamoto M, Honda H, Nakagawa T, Fujita H, Nakamura T, Hirai H, Narumiya S, Kakizuka A. Retardation of skeletal development and cervical abnormalities in transgenic mice expressing a dominant-negative retinoic acid receptor in chondrogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:7491-6.

Yu MW, Lien JP, Chiu YH, Santella RM, Liaw YF, Chen CJ. Effect of aflatoxin metabolism and DNA adduct formation on hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers in Taiwan. *J Hepatol* 1997; 27:320-30.

Yu MW, Zhang YJ, Blaner WS et al. Influence of vitamins A, C, and E and beta-carotene on aflatoxin B1 binding to DNA in woodchuck hepatocytes. *Cancer* 1994; 73:596-604.

Zilversmit DB. Exchange of phospholipid classes between liver microsomes and plasma: comparison of rat, rabbit, and guinea pig. *J Lipid Res* 1971; 12:36-42.

Zmudzki J, Wisniewska-Dmytrow H. Limits and regulations for mycotoxins in food and feed. *Pol J Vet Sci* 2004; 7:211-6.

Zouboulis CC. Retinoids-which dermatological indications will benefit in the near future? *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001; 14:303-15.

## **Danksagung**

Diese Dissertation erlangt ihre besondere Bedeutung in meinem Leben durch das Glück, mich mit meiner heutigen Frau zusammengeführt zu haben, was die Weichen für eine junge Familie stellte. So danke ich dem glücklichen Umstand, im richtigen Moment die wegweisende Anleitung und Unterstützung von nachfolgenden Personen erhalten zu haben.

Ich danke

Prof. Dr. F.J. Schweigert für die Überlassung dieses interessanten Themas, die unkomplizierte Unterstützung und seine Anregungen.

Prof. Dr. H. Martens für die Bereitschaft, die Dissertation zu begutachten und über das Institut für Veterinär – Physiologie der FU Berlin einreichen zu dürfen.

Dr. J. Raila dafür, dass er als Ansprechpartner zu allen Belangen der Durchführung und Koordination dieser wissenschaftlichen Arbeit zur Verfügung stand.

Prof. Dänicke vom FAL in Braunschweig für die Nutzung der gewonnenen Proben aus den genannten Versuchsreihen.

Susanne Döll aus dem FAL in Braunschweig für Anregungen und den Austausch von ergänzenden Daten.

Andrea Hurtienne und Elisabeth Pilz für die Hilfe bei der Einarbeitung und Durchführung der Labormethoden.

allen Mitarbeitern der Abteilung Physiologie und Pathophysiologie des Institutes für Ernährungswissenschaften für eine angenehme Arbeitsatmosphäre.

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Ferch, den 28.02.2006

## **Publikation**

Teile dieser Dissertation wurden bereits publiziert:

Döll S, Gericke S, Dänicke S, Raila J, Ueberschar KH, Valenta H, Schnurrbusch U, Schweigert FJ, Flachowsky G. The efficacy of a modified aluminosilicate as a detoxifying agent in Fusarium toxin contaminated maize containing diets for piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2005; 89:342-58.