

**Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Untersuchung des möglichen Einflusses von
Umweltchemikalien auf die lymphatischen Organe
von Schweinswalen aus der Nord- und Ostsee
sowie dem Atlantik unter besonderer
Berücksichtigung der Zytokin-Expression**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

ANDREAS ALFONS BEINEKE

Gießen 2003

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2003

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2003

© 2003 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE
www.vvb-ips.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. W. Baumgärtner, Ph.D.

**Untersuchung des möglichen Einflusses von Umweltchemikalien auf die lymphatischen
Organe von Schweinswalen aus der Nord- und Ostsee sowie dem Atlantik unter
besonderer Berücksichtigung der Zytokin-Expression**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
ANDREAS ALFONS BEINEKE
Tierarzt aus Haan (Nordrhein-Westfalen)

Gießen 2003

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Baumgärtner, Ph.D.

2. Berichterstatter: PD Dr. Klaus Steger

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Oktober 2003

Die vorliegende Arbeit wurde unter Verwendung von Mitteln des Deutschen
Umweltbundesamtes (FE-Vorhaben 299 65 221/01) und der Deutschen Bundesstiftung
Umwelt erstellt.

Meiner Frau Silke

1. Einleitung.....	1
2. Literaturübersicht	3
2.1. Der Schweinswal (<i>Phocoena phocoena</i>).....	3
2.1.1. Taxonomie	3
2.1.2. Merkmale und Biologie	5
2.1.3. Verbreitung der Schweinswale	6
2.1.4. Schadstoffbelastung der Schweinswale in der Nord- und Ostsee.....	6
2.2. Das Immunsystem der marinen Säuger.....	9
2.2.1. Funktionelle Testsysteme zur Untersuchung der zellulären und humoralen Immunantwort bei marinen Säugern.....	9
2.2.2. Untersuchungen der immuntoxischen Wirkung von Umweltchemikalien in marinen Säugern.....	12
2.2.3. Morphologie der lymphatischen Organe mariner Säuger	14
2.2.4. Pathologische Veränderungen in lymphatischen Organen mariner Säuger.....	16
2.2.5. Immunphänotypisierung von lymphatischen Zellen und lymphatischen Organen mariner Säuger	17
2.2.6. Nachweis von Zytokinen mariner Säuger	19
3. Material und Methoden	23
3.1. Untersuchte Schweinswale und Probenentnahme	23
3.2. Histologische Untersuchungen.....	25
3.3. Mikrobiologische Untersuchungen	26
3.4. Altersbestimmung	26
3.5. Immunhistologische Untersuchungen	27
3.5.1. Antikörper	27
3.5.2. Durchführung der ABC-Methode	29
3.5.3. Auswertung der Befunde in den lymphatischen Organen.....	30
3.6. Lymphozytenstimulationstest.....	31
3.6.1. Kulturmedium	31
3.6.2. Isolierung der Lymphozyten aus Vollblutproben mittels einstufiger Percoll®-Dichtegradientenzentrifugation	32
3.6.3. Verwendete Mitogene	33

3.6.4.	Durchführung des Lymphozytenstimulationstests (LST)	33
3.6.5.	Bromdeoxyuridin (BrdU)-Test.....	33
3.6.5.1.	Reagenzien.....	34
3.6.5.2.	Durchführung des BrdU-Test	34
3.6.5.3.	Stimulationsindex (SI).....	35
3.7.	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	36
3.7.1.	RNS-Isolierung	36
3.7.1.1.	RNS-Isolierung aus lymphatischen Organen und Lymphozyten-Suspensionen	36
3.7.1.2.	RNS-Isolierung aus Vollblut mittels RNaid®PLUS KIT.....	37
3.7.2.	Selektion der Primer.....	38
3.7.3.	Durchführung der reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	39
3.7.3.1.	DNase-Behandlung.....	40
3.7.3.2.	Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion	41
3.7.3.3.	Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	42
3.7.3.3.1.	Gelelektrophorese.....	42
3.7.3.3.2.	DNS-Sequenz-Analyse und Homologievergleich.....	43
3.7.3.4.	Echtzeit-PCR	44
3.7.3.4.1.	Reaktionsphasen der Echtzeit-PCR.....	44
3.7.3.4.2.	Quantifizierung mit externem Standard	46
3.8.	Analyse und Quantifizierung organischer Schadstoffe.....	46
3.9.	Statistische Auswertung	47
4.	Ergebnisse.....	49
4.1.	Etablierung der Methoden zur Untersuchung des Immunsystems der Schweinswale	49
4.1.1.	Immunhistologische Untersuchungen über die Kreuzreaktivität verschiedener Lymphozytenmarker unterschiedlicher Spezies zur Charakterisierung lymphatischer Gewebe des Schweinswales	49
4.1.2.	Ermittlung der optimalen Mitogenkonzentrationen für den Lymphozyten- stimulationstest (LST).....	54
4.1.2.1.	Leukozytenisolierung	54
4.1.2.2.	Mitogene.....	57

4.1.3.	Beurteilung der Zytokin-mRNS-Expression in peripheren Blutlymphozyten mittels konventioneller RT-PCR.....	59
4.2.	Untersuchungen der Lymphozyten-Subpopulationen und Zytokin-Expression in Thymus und Milz	62
4.2.1.	Immunphänotypische Veränderungen im Thymus	62
4.2.2.	Immunphänotypische Veränderungen in der Milz.....	70
4.2.3.	Ergebnisse der Echtzeit-RT-PCR.....	74
4.2.3.1	Qualitativer und semiquantitativer Zytokin-mRNS-Nachweis im Thymus	74
4.2.3.1.1.	Qualitative Auswertung.....	74
4.2.3.1.2.	Semiquantitative Auswertung	75
4.2.3.2.	Qualitativer und semi-quantitativer Nachweis der Zytokin-mRNS in der Milz	78
4.2.3.2.1.	Qualitative Auswertung.....	78
4.2.3.2.2.	Semiquantitative Auswertung	79
4.2.3.3.	Korrelation zwischen Thymusatrophie und Zytokin-mRNS-Menge im Blut	81
4.2.3.3.1.	Qualitative Auswertung.....	81
4.2.3.3.2.	Semiquantitative Auswertung	82
4.2.3.4.	Korrelation zwischen Milzdepletion und Zytokin-mRNS-Menge im Blut ...	86
4.2.3.4.1.	Qualitative Auswertung.....	86
4.2.3.4.2.	Semiquantitative Auswertung	87
4.3.	Ergebnisse der pathologischen und mikrobiologischen Untersuchungen.....	92
4.3.1.	Pathologische Untersuchungen	92
4.3.2.	Mikrobiologische Untersuchungen	100
4.4.	Auswertung der histologischen Veränderungen in Thymus und Milz.....	101
4.4.1.	Thymus.....	101
4.4.2.	Milz	104
4.4.3.	Gegenüberstellung von Thymusatrophie und Milzdepletion	107
4.5.	Zusammenhang zwischen Thymusatrophie und Schadstoffbelastung.....	108
4.6.	Zusammenhang zwischen Milzdepletion und Schadstoffbelastung.....	112

5. Diskussion.....	117
5.1. Etablierung der Methoden.....	117
5.1.1. Kreuzreaktionen verschiedener Leukozytenmarker unterschiedlicher Spezies zur Charakterisierung lymphatischer Organe des Schweinswales.....	117
5.1.2. Lymphozytenstimulationstest und Zytokin-Nachweis mittels RT-PCR.....	118
5.2. Immunphänotypische Veränderungen in Thymus und Milz unter besonderer Berücksichtigung der Zytokin-Expression.....	121
5.3. Untersuchungen des Einflusses von Umweltchemikalien auf das Immunsystem der Schweinswale.....	127
5.4. Schlußbetrachtung.....	135
6. Zusammenfassung.....	137
7. Summary.....	140
8. Literaturverzeichnis.....	143
9. Anhang.....	162
9.1. Bezugsquellen für Chemikalien, Enzyme und Antikörper.....	162
9.2. Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel.....	164
9.3. Lösungen und Puffer.....	167
9.4. Abkürzungen.....	169
9.5. Abbildungen und Tabellen.....	170
10. Danksagung.....	184

1. Einleitung

Von den 17 verschiedenen Kleinwalarten, welche in der Nord- und Ostsee vorkommen, ist der Schweinswal (*Phocoena phocoena*) die am häufigsten anzutreffende und in deutschen Gewässern die einzige wirklich heimische Art (Mohr, 1935; Schulze, 1996).

Verschiedenen Strandungsberichten und Beobachtungen zufolge ist die Nord- und Ostseepopulation der Schweinswale in den letzten 30 Jahren deutlich zurückgegangen (Andersen, 1982). Als Todes- bzw. Strandungsursachen werden neben hohen Beifangzahlen die Reduktion des Nahrungsangebotes durch Überfischung, zunehmend parasitäre Infestationen sowie bakterielle Infektionen verantwortlich gemacht. Laut Sektionsstatistiken handelt es sich vorwiegend um respiratorische Erkrankungen, gefolgt von Erkrankungen des Magen-Darmtraktes und der Leber (Siebert et al., 2001). Zusätzlich konnte eine Korrelation zwischen dem erhöhten Quecksilbergehalt in den Organen und dem Ausmaß der pathologischen Veränderungen bei Schweinswalen der Nord- und Ostsee (Siebert et al., 1999) gezeigt werden. Weiterhin fand sich ein Zusammenhang zwischen der PCB-Belastung und dem vermehrten Auftreten von Infektionen bei Schweinswalen aus britischen Gewässern (Jepson et al., 1999).

Weltweit wurden seit 1988 bei Robben und Delfinen verheerende Massensterben durch Infektionen mit verschiedenen Morbilliviren festgestellt (Kennedy, 1998). Untersuchungen von Streifendelfinen (*Stenelle coeluroalba*) während der Morbillivirus-Epidemie im Mittelmeer 1990-91 zeigten deutlich erhöhte Gehalte an Organochloriden in den Organen und Fettdepots der verendeten Tiere (Aguilar und Borrel, 1994). Vergleichbar hohe Schadstoffgehalte wurden in verstorbenen Robben während der Seehund-Staupeepidemie in der Nordsee 1988 gemessen (Hall et al., 1992). Dieser Zusammenhang zwischen einer hohen Schadstoffbelastung einerseits und dem Ausbruch von Seuchenzügen andererseits gaben Anlass zu Spekulationen über einen möglichen immunsuppressiven Effekt der nachgewiesenen Umweltchemikalien.

Toxikologischen Studien zufolge akkumuliert der Schweinswal als ein Endglied der marinen Nahrungskette verschiedene lipophile, polyhalogenierte, aromatische Kohlenwasserstoffverbindungen und Schwermetalle im Laufe seines Lebens, welche aus Industrie und Landwirtschaft in die Deutsche Nord- und Ostsee gelangen. Bei der chemischen Analyse setzen sich diese persistierenden Chlorkohlenwasserstoffe hauptsächlich aus verschiedenen Kongeneren von chlorierten Biphenylen sowie chlorierten Pestiziden zusammen. Im Vergleich zu Schweinswalen der grönländischen Arktis weisen die Tiere in der Deutschen

Nord- und Ostsee einen zehnfach erhöhten Gehalt an chlorierten Biphenylen (CB) in den Organen auf (Bruhn et al., 1999; Siebert et al., 1999).

Der Schweinswal ist durch mehrere internationale Schutzabkommen und Konventionen, wie zum Beispiel ASCOBANS (Abkommen zur Erhaltung von Kleinwalen in der Nord- und Ostsee; 1991) und die so genannte EU-Habitatsrichtlinie (Richtlinie 92/43/EWG des EU-Rates zur Erhaltung der natürlichen Lebensräume sowie der wildlebenden Tiere und Pflanzen), geschützt. Auch die Internationale Walfangkommission (IWC) hat dem Schutz des Schweinswales eine besondere Priorität eingeräumt. Der Schweinswal ist zudem in der Roten Liste der Weltnaturschutzunion (IUCN; „International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources“) als bedroht eingestuft und im Washingtoner Artenschutzabkommen (CITES) in Anhang II aufgeführt. Die ASCOBANS-Mitglieder und der IWC kamen darin überein, dass der Beifang inklusive anderer anthropogener Einflüsse auf keinen Fall 1,7 % der geschätzten Populationsgröße übersteigen sollte, um die Art in ihrem langfristigen Fortbestand nicht zu gefährden.

Im Mittelpunkt der Diskussion steht eine durch die Anreicherung von Umweltchemikalien bedingte Beeinträchtigung des Immunsystems (Ross et al., 1996a). Trotz gewisser Fortschritte in der Immunologie mariner Säugetiere in den letzten Jahren ist das Wissen über das lymphatische System bei Zahnwalen und seine funktionellen Charakteristika, insbesondere der Schweinswale noch lückenhaft. Der Thymus stellt ein zentrales Organ in der Lymphopoese dar, welches auf verschiedene pathologische Prozesse mit einer Volumen- und Gewichtsreduktion reagiert (Durchfeld et al., 1989). Hierbei kann es entweder durch die direkte, oft virale Erregerwirkung (Godfraind et al., 1995; Wünschmann et al., 2000) oder durch bakterielle Toxine zu einer Zerstörung der unreifen, kortikalen Thymozyten kommen (Ozeki et al., 1997). Die Exposition von verschiedenen Umweltchemikalien führt ebenfalls zu einer Thymusatrophie und damit zur Hemmung der Immunantwort in sekundären lymphatischen Organen (De Heer et al., 1994). Ziel dieser Arbeit ist es, den möglichen Zusammenhang zwischen der Schadstoffbelastung und Veränderungen im Immunsystem der Schweinswale zu untersuchen. Weiterhin sollten immunphänotypische Veränderungen und die Zytokin-Expression im Verlauf der Thymusatrophie und Milzdepletion des Schweinswales charakterisiert werden.

2. Literaturübersicht

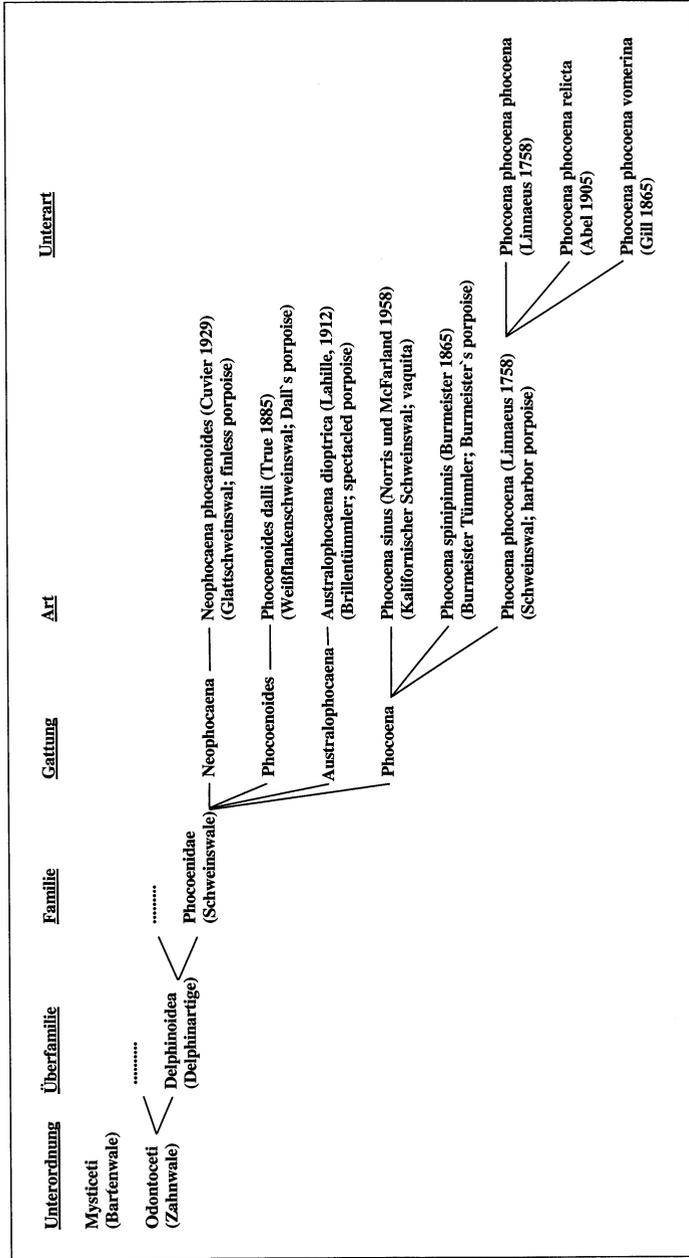
2.1. Der Schweinswal (*Phocoena phocoena*)

2.1.1. Taxonomie

Aufgrund morphologischer und molekularbiologischer Untersuchungen werden die Schweinswale (*Phocoenidae*) in die Überfamilie der Delphinartigen (*Delphinoidea*) und in die Unterordnung der Zahnwale (*Odontoceti*) eingestuft (Abbildung 1). Diese bildet zusammen mit den Bartenwalen (*Mysticeti*) die Ordnung der Walfiere (*Cetacea*) (Milinkovitch et al., 1993, Waddell et al., 2000). Zur Familie der *Phocoenidae* gehören die vier Gattungen *Phocoena*, *Neophocaena*, *Australophocaena* und *Phocoenoides*. Die Art der Schweinswale (*Phocoena phocoena*) wird in drei Unterarten gegliedert. Die Unterart *Phocoena phocoena phocoena* ist im Nordatlantik beheimatet, während Vertreter im Nordpazifik der Unterart *Phocoena phocoena vomerina* und im Schwarzen Meer der Unterart *Phocoena phocoena relicta* zugeordnet werden (Schulze, 1996).

Eine Unterscheidung der Subpopulationen beim Schweinswal wird anhand mitochondrialer DNS, Mikrosatelliten-DNS, nicht-metrischer Schädelcharakteristika, Schädelvermessungen und/oder Ultrastruktur der Zähne durchgeführt (Tolley et al., 1999, 2001; Huggenberger und Benke, 2002). Die Schweinswale im Nordatlantik werden von der Internationalen Walfangkommission (IWC) in 13 Subpopulationen unterteilt. Die Schweinswale der Nord- und Ostsee und auf dem Keltischen Schelf lassen sich aufgrund der Daten in fünf Subpopulationen unterteilen (Kashner, 2001; Tolley et al., 1999). Untersuchungen der mitochondrialen DNS verdeutlichten eine reduzierte genetische Variabilität der Schweinswal-Population der Ostsee, hervorgerufen durch den limitierten Genfluss zwischen dieser Population und den Beständen der Nordsee (Tiedemann et al., 1996). Schweinswale aus grönländischen und isländischen Gewässern sowie der Barentsee stellen ebenfalls separate Subpopulationen dar (Tolley et al. 2001).

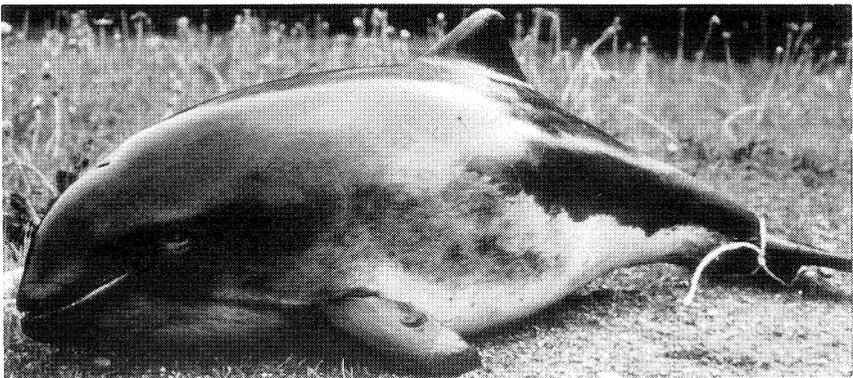
Abbildung 1: Einordnung der Schweinswale in der Ordnung der Waltiere (Cetacea)



2.1.2. Merkmale und Biologie

Der Schweinswal hat einen gedrungeneren Körper mit einem rundlichen Kopf, was ihn deutlich von den Delphinen mit ihrem schnabelförmigen Kopfprofil unterscheidet. Der Unterkiefer mit den charakteristischen spatelförmigen Zähnen steht kaum merklich hervor. Die braune bis blauschwarze Körperfarbe am Rücken wechselt über eine graue Übergangszone unterschiedlicher Ausdehnung an den Flanken in einen grauweißen Farbton am Bauch. Ein dunkelgrauer Streifen erstreckt sich vom Mundwinkel bis zur Basis der Brustflosse. Rückenfinne, Brustflosse, Fluke und Flukenstil sind vollständig schwarz (Abbildung 2; Schulze, 1996).

Abbildung 2: Beigefangener adulter Schweinswal



Mit einer Körperlänge von 130 bis 180 cm (Geburtslänge ca. 70-80 cm) gehören die Schweinswale zu den kleinsten Zahnwalen. Die Weibchen sind oft einige Zentimeter größer als die Männchen. Dieser Geschlechtsdimorphismus spiegelt sich auch im durchschnittlichen Gewicht von 57 kg bei Weibchen und 48 kg bei Männchen wider. Schweinswale erreichen die Geschlechtsreife mit drei bis vier Jahren bei einer durchschnittlichen Körperlänge von 133 (♂) bzw. 145 cm (♀). Aufgrund einer saisonalen Tätigkeit der Gonaden liegt der Höhepunkt der Brunst in den Sommermonaten (Fisher und Harrison, 1970). Die Literaturangaben über die Trächtigkeitsdauer variieren zwischen acht und elf Monaten, wobei regionale Unterschiede nicht

ausgeschlossen werden (Bandomir-Krischak, 1993; Schulze, 1996). Die Kälber werden ungefähr acht Monate gesäugt, beginnen vermutlich aber bereits nach fünf Monaten mit der Aufnahme fester Nahrung. Als Endglied der marinen Nahrungskette ernährt sich der Schweinswal hauptsächlich von fettreichen Fischen wie Hering, Makrele und Sprotte. Die Nahrungszusammensetzung der Tiere aus der Nord- und Ostsee ist jedoch unterschiedlich (Benke et al., 1998).

2.1.3. Verbreitung der Schweinswale

Schweinswale leben in den Küstengewässern des nördlichen Pazifiks und Atlantischen Ozeans und deren angrenzenden Gewässern. Sie bevorzugen kalte bis mäßig kalte Bereiche. Die südliche Grenze ihres Vorkommens bildet die sommerliche Oberflächenwasser-Isotherme von +25°C. In tropischen Gebieten ist die Art nicht anzutreffen. Schweinswale treten entweder als Einzeltiere oder in kleinen Gruppen von zwei bis drei Tieren auf (Benke et al., 1998). *Phocoena phocoena* hat von allen Arten der Familie *Phocoenidae* die weiteste Verbreitung. Die Bestände kommen im Verbreitungsgebiet jedoch nicht gleichmäßig verteilt vor, sondern sind in mehr oder weniger isolierte Subpopulationen unterteilt (Schulze, 1996). Auf den saisonalen Wanderungen, in denen sie ihren Nahrungstieren folgen, bewegen sich die Schweinswale in einem Gebiet von ungefähr 210 km² (Watts und Gaskin, 1985).

2.1.4. Schadstoffbelastung der Schweinswale in der Nord- und Ostsee

Die europäische Studie „Small Cetacean Abundance of the North Sea and Adjacent Waters“ (SCANS) aus dem Jahre 1994 erbrachte die zuverlässigsten Bestandsgrößenabschätzungen in der Nord- und Ostsee lebender Schweinswale. So befinden sich in der östlichen Ostsee 599, in der westlichen Ostsee und im Kattegatt 36 916, in der südlichen und zentralen Nordsee 17 4620 und in der nördlichen Nordsee 10 4747 Tiere. Zusätzlich wurden in dieser Studie regionale Unterschiede in der Populationsdichte (Anzahl der Tiere pro km²) der Schweinswale festgestellt (Hammond et al., 1995).

Verschiedenen Strandungsberichten, Fangstatistiken und Einzeltiersichtungen zufolge ist die Schweinswalpopulation in den letzten 30 Jahren deutlich zurückgegangen (Andersen, 1982; Benke et al., 1998). Aus historischen Aufzeichnungen geht hervor, dass der Schweinswal noch

zu Beginn des letzten Jahrhunderts in großer Zahl und regelmäßig beobachtet wurde (Mohr, 1935). Eine von 1991 bis 1996 angelegte Studie beschäftigte sich mit den Erkrankungs- und Todesursachen der Schweinswale in der Deutschen Nord- und Ostsee (Siebert et al., 2001). Insgesamt 10% der beigefangenen und 30% der gestrandeten Tiere zeigen eine deutliche Abmagerung. Am häufigsten finden sich Erkrankungen der Lunge, gefolgt von pathologischen Veränderungen am Magen-Darm-Trakt und der Leber. Hochgradige katarrhalisch-eitrige bis eitrig-nekrotisierende Bronchopneumonien infolge von Infestationen mit den Lungenwürmern *Pseudalius inflexus* und *Torynurus convolutus* (Fam. *Pseudaliidae*) sowie von sekundären bakteriellen Infektionen mit vorwiegend β -hämolisierenden Streptokokken sind in 46% der Fälle als Todesursache von gestrandeten, subadulten und adulten Schweinswalen nachweisbar (Siebert et al., 2001). Der Gesundheitsstatus der Bestände entlang der Küste von England und Wales weist eine vergleichbare Situation auf. Neben der hohen Beifangrate sind auch hier Bronchopneumonien eine häufige Ursache für die Mortalität (Baker und Martin, 1992; Jepson et al., 2000). Außerdem sind in einer Studie von 1990 bis 2000 Abmagerungen, schwerwiegende Parasitosen und Pneumonien die häufigsten Befunde bei gestrandeten Schweinswalen entlang der Küste von Belgien und Nordfrankreich (Jauniaux et al., 2002). Im Vergleich zeigen beigefangene Schweinswale aus arktischen Gewässern um Grönland weit weniger pathologische Veränderungen und einen guten Ernährungszustand. Der parasitäre Befall der arktischen Wale, insbesondere Infestationen der Lunge, war in keinem Fall mit schwerwiegenden Erkrankungen vergesellschaftet (Wünschmann et al., 2001). Hinweise auf eine Epidemie mit Schweinswal-spezifischen Erregern, wie beispielsweise Morbilliviren, konnten in diesen Arbeiten nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Morbillivirus-Seuchenzügen in 2002 (Seehund-Staupevirus, PDV) und den Epidemien bei Seehunden (*Phoca vitulina*) in der Nord- und Ostsee von 1988-1989 sind beim Schweinswal bisher nur sporadische Erkrankungen in den Gewässern um Großbritannien und Irland dokumentiert (Kennedy et al., 1991, 1992; Kennedy, 1998; Jensen et al., 2002). Serologische Untersuchungen zeigten jedoch, dass Schweinswale der Deutschen Nord- und Ostsee eine hohe Inzidenz von Morbillivirus-spezifischen Antikörpern (Schweinswal-Morbillivirus, PMV) aufweisen, was für eine permanente Zirkulation des Virus innerhalb dieser Population spricht (Müller et al., 2000).

Als Endglied der marinen Nahrungskette akkumuliert der Schweinswal im Laufe seines Lebens verschiedene lipophile Umweltchemikalien, deren negativer Einfluss auf das Immunsystem in Feldstudien, Tierversuchen und *in vitro*-Experimenten bestätigt werden konnte (Reijnders et al., 1994; Ross et al., 1996a). Toxikologische Untersuchungen belegen, dass die Schweinswale aus

der deutschen Nord- und Ostsee eine zehnfach höhere Belastung mit PCBs aufweisen als Tiere aus arktischen Gewässern um Grönland. In der Risikoabschätzung spielen vor allem die koplanaren Kongenere 118 und 170 mit dioxinähnlicher Toxizität die größte Rolle. Zusätzlich finden sich im Ökosystem der Nord- und Ostsee relativ große Mengen an Hexachlorobenzol, *pp'*-DDE, *pp'*-DDD und γ -Hexachlorocyclohexan (Bruhn et al., 1999).

Im Vergleich zu Tieren aus arktischen Gewässern und dem Schwarzen Meer weisen Schweinswale in Gewässern um Deutschland eine höhere Belastung mit Schwermetallen auf (Joiris et al., 2001). Siebert et al. (1999) untersuchten die Bioakkumulation von Quecksilber in Schweinswalen aus der deutschen Nord- und Ostsee und deren Auswirkungen auf den Gesundheitsstatus der Tiere. Trotz des Fehlens akuter oder chronischer Intoxikationen bestand ein Zusammenhang des Schadstoffgehaltes in den Organen mit dem Schweregrad der pathologischen Veränderungen. Ein ähnlicher Sachverhalt fand sich in toxikologischen Studien an Schweinswalen um England und Wales. Während Kuiken et al. (1994) keinen negativen Einfluss von PCBs auf den Gesundheitsstatus der Wale feststellen konnten, zeigen Jepson et al. (1999), dass Tiere, die aufgrund infektiöser Ursachen verendeten, eine signifikant höhere Belastung mit PCBs aufwiesen als beifangene, gesunde Schweinswale. Als Ursache dieser vermehrten Krankheitsanfälligkeit wird eine mögliche immunsuppressive Wirkung der verschiedenen Schadstoffklassen diskutiert (Jepson et al., 1999; Siebert et al., 1999; Wünschmann et al., 2001).

2.2. Das Immunsystem der marinen Säuger

Trotz gewisser Fortschritte auf dem Gebiet der Immunologie mariner Säugetiere in den letzten Jahren ist das Wissen über das lymphatische System der Zahnwale, insbesondere der Schweinswale, noch lückenhaft. Im folgenden Kapitel soll ein Überblick über den gegenwärtigen Stand der Forschung auf dem Gebiet des Immunsystems der marinen Säugetiere gegeben werden.

2.2.1. Funktionelle Testsysteme zur Untersuchung der zellulären und humoralen Immunantwort bei marinen Säugern

Der Lymphozytenstimulationstest ermöglicht die qualitative und quantitative Erfassung der zellulären Immunantwort nach unspezifischer oder Antigen-spezifischer Aktivierung (Kristensen et al., 1982). De Guise et al. (1996) untersuchten die Dosis-Wirkung-Beziehung der Mitogen-induzierten Proliferation von isolierten peripheren Blutlymphozyten, Thymozyten und Milzzellen des Belugawals (*Delphinapterus leucas*). Concanavalin A (Con A) und Phytohämagglutinin (PHA) waren die effektivsten Mitogene in Zellen des Blutes und des Thymus, während Lipopolysaccharid (LPS) vor allem Milzzellen stimulierte. Die ausgeprägte Stimulation der Thymozyten durch Con A und PHA und die verhältnismäßig starke Wirkung von LPS auf Milzzellen mit einem hohen Prozentsatz an B-Zellen verdeutlicht die Spezifität der Substanzen als T- und B-Zellmitogene beim Belugawal. Ebenfalls wurde durch die Co-Inkubation mit humanem rekombinanten Interleukin (IL)-2 gezeigt, dass Con A, PHA und „Pokeweed Mitogen“ (PWM) eine Aktivierung der T-Zellen und damit eine Aufregulation des IL-2-Rezeptors hervorrufen. Im Gegensatz zum Seehund, bei dem Con A und PWM die stärksten Mitogene darstellten (De Swart et al., 1993), bewirkte PWM nur eine geringe Proliferation lymphatischer Zellen des Belugawals. Mittels 2-Mercaptoethanol kann die geringe Zellteilungsrate durch PWM erhöht werden, während die Stimulation durch Con A, PHA und LPS unbeeinflusst bleibt. Aufgereinigte T-Lymphozyten aus der Milz des Belugawals zeigten einen einhundertfachen Anstieg des intrazytoplasmatischen Kalziumspiegels nach Stimulation mit Con A und PHA. Zusätzlich konnten durch die spezifische Bindung des CD4-Oberflächenantigens eine Steigerung der Tyrosinkinase-Aktivität sowie eine Reduktion der Mitogen-induzierten Zellproliferation demonstriert werden (Bernier et al., 2000). Colgrove (1978) untersuchte den Einfluss von Phytomitogenen auf periphere Blutlymphozyten des großen Tümmlers (*Tursiops truncatus*). Die Zelldichte im Untersuchungsansatz zeigte keinen Einfluss

auf den ermittelten Stimulationsindex. Con A bewirkte die stärkste Aktivitätssteigerung der Lymphozyten. PHA und PWM wiesen eine vergleichsweise niedrige Effektivität auf. Der Einsatz von verdünntem Vollblut in diesem Versuchsansatz spiegelt die natürlichen Verhältnisse im Blut der Tiere wider, erschwert jedoch durch die individuelle Zusammensetzung des weißen Blutbildes die Standardisierung der Untersuchungen (Koopmann et al. 1999). Zusätzlich hat ein erhöhter Blutkortisolspiegel im Verlauf der Fangaktion der Wale möglicherweise einen negativen Einfluß auf die Zellproliferation *in vitro* (De Guise et al., 1996). Frühere Untersuchungen zur Mitogen-Stimulation lymphatischer Zellen von Delphinen (*Delphinus delphis*), Schwertwalen (*Ocinus orca*) und Pilotwalen (*Globicephala melaena*) verwendeten ebenfalls Vollblutproben. In diesen Arbeiten wurden jedoch keine optimalen Mitogenkonzentrationen ausgetestet (Mumford et al., 1975). De Swart et al. (1993) untersuchten die Dosis-Wirkung-Beziehung sowie die Kinetik von Mitogen-stimulierten peripheren Blutlymphozyten des Seehundes. Nach Inkubation mit rekombinatem IL-2 kam es zu einer selektiven Stimulation von T-Zellen durch Con A und PHA. Durch die Messung der Antikörperproduktion *in vitro* (ELISA) und die Bindung von B-Zellen an Protein-A (spot-ELISA) wurde gezeigt, dass PWM sowohl T- als auch B-Zellen stimuliert, während LPS ein reines B-Zellmitogen für den Seehund darstellt. Zusätzlich wurde der Anstieg der Antigen-spezifischen Zellproliferation und Antikörperproduktion von vakzinierten Tieren (inaktivierte Tollwut-Vakzine und Tetanus-Toxoid) *in vitro* bestimmt. Durch die Affinitäts-Chromatographie konnte demonstriert werden, dass Protein-A spezifisch an das Fc-Stück von Immunglobulin (Ig)G der Seehunde bindet (Ross et al., 1994).

Als Ausdruck einer relativ früh ausgeprägten Immunkompetenz zeigen neugeborene Seehunde eine höhere Mitogen-induzierte Proliferation der Blutlymphozyten als ihre Muttertiere bzw. gleichaltrige Hunde- oder Katzenwelpen. Wie auch bei anderen Robbenarten spielt der transplazentale Immunglobulin-Transfer im Gegensatz zur kolostralen Aufnahme eine untergeordnete Rolle (Carter et al., 1990; Ross et al., 1994). Mittels kreuzreagierender Antiseren wurden verschiedene Antikörper-Klassen (IgG, IgM und IgA) und -Subklassen bei unterschiedlichen Delphin- und Robbenarten identifiziert (Nash und Mach, 1971; Travis und Sanders, 1972; Cavagnolo, 1979; Andresdottier et al., 1987). Eine altersabhängige Akkumulation von genomischen Schäden und reduzierte DNS-Reparaturmechanismen führten zu einem vermehrten Auftreten von Mikronuklei in peripheren Blutlymphozyten des Großen Tümmlers. Diese DNS-Schäden waren jedoch nicht mit einer verminderten Mitogen-induzierten Zellproliferation vergesellschaftet (Gauthier et al., 1999).

Natürliche Killer (NK)-Zellen spielen eine bedeutende Rolle in der unspezifischen Abwehr von Virus-infizierten Zellen und Tumoren. Die Zytotoxizität der NK-Zellen des Belugawals wurde auf einer murinen Lymphomzelllinie (YAC-1) und einer humanen erythroleukämischen Zelllinie (K-562) als Zielzelle untersucht. Sowohl die Freisetzung von radioaktiv markiertem Chrom („Chromium release assay“), als auch die Messung abgetöteter Zellen im Durchflusszytometer erwiesen sich als geeignete Nachweissysteme der NK-Zellaktivität. NK-Zellen des Belugawals zeigten eine größere zytotoxische Aktivität gegen K-562-Zellen. Die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen wurde durch Co-Inkubation mit humanem rekombinantem IL-2 gesteigert (De Guise et al., 1997b).

Einen weiteren unspezifischen Abwehrmechanismus des Immunsystems stellt die Phagozytose und Freisetzung von Sauerstoffradikalen („Respiratory burst“) durch vorwiegend neutrophile Granulozyten dar. De Guise et al. (1995a) untersuchten die Kinetik dieser Funktionen im Blut von Belugawalen mittels Durchflusszytometrie. Neutrophile Granulozyten des Großen Tümmlers zeigen eine temperatur- und zeitabhängige Aufregulation der Superoxid-Bildung (O_2^-) durch die Stimulation mit Phorbolmyristatazetat. Eine spezifische Hemmung der NADPH-Oxidase durch Diphenyl-iod konnte ebenfalls durch das Luciferin-Chemolumineszenz-Verfahren („Cypridina luciferin analog-dependent chemiluminescent assay“) festgestellt werden. Zusätzlich fand sich eine Dismutation der Sauerstoff-Radikale durch die Inkubation der Zellen mit der Superoxid-Dismutase (SOD). Mittels RT-PCR konnte die mRNS der verschiedenen Komponenten der NADPH-Oxidase gp91^{phox}, p22^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox} und p67^{phox} detektiert werden (Itou et al., 2001). Sequenzanalysen der mRNS der Flavocytochrom-b-Untereinheiten gp91^{phox} und p22^{phox} des Großen Tümmlers (GenBank accession numbers: AB034192 und AB034193) zeigten weitgehende Homologien zu den Sequenzen der Wiederkäuer. Aufgrund des Vorhandenseins hydrophober Domänen handelt es sich bei dem Heterodimer um Membran-assoziierte Moleküle des Elektronentransport-Systems, während p40^{phox}, p47^{phox} und p67^{phox} zytosolische Komponenten der NADPH-Oxidase darstellen (GenBank accession numbers: AB038267, AB035594 und AB035593). Mittels Western Blot-Analyse wurden die Molekulargewichte der einzelnen Komponenten der NADPH-Oxidase in den neutrophilen Granulozyten des Großen Tümmlers festgestellt (Inoue et al., 2000, 2001a).

2.2.2. Untersuchungen der immuntoxischen Wirkung von Umweltchemikalien in marinen Säugern

In einer Feldstudie mit freilebenden Großen Tümmlern (*Tursiops truncatus*) vor der Westküste Floridas wurde der immunsuppressive Effekt verschiedener Umweltchemikalien untersucht. Die Tiere zeigten eine Abnahme der Mitogen-induzierten Proliferation von T-Zellen mit steigenden PCB- und DDT-Konzentrationen im Serum. Die geringe Probandenzahl (n=5) lässt jedoch keine abschließende Aussage über einen möglichen Zusammenhang mit einer erhöhten Krankheitsempfindlichkeit in der Population zu (Lahvis et al., 1995).

In einem Experiment wurden Seehunde über einen Zeitraum von 2,5 Jahren mit schadstoffbelasteten Fischen gefüttert. Periphere Blutlymphozyten von schadstoffbelasteten Tieren zeigten eine signifikante Abnahme der zellulären Immunantwort nach Stimulation mit Con A, PHA und PWM sowie der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen auf die YAC-1-Zelllinie. Unbelastete Kontrolltiere (gefüttert mit atlantischen Fischen) zeigten keine Veränderungen der Immunantwort. Nach Immunisierung der Seehunde gegen Tollwut und Tetanus zeigte auch die Antigen-spezifische Proliferation peripherer Blutlymphozyten *in vitro* eine signifikante Reduktion. Durch die gemischte Lymphozyten-Reaktion mit einer Seehund-spezifischen Lymphosarkomzelllinie als Stimulatorzellen (PV1.P1; „one way mixed lymphocyte reaction“) wurde ebenfalls eine Reduktion der zellulären Immunantwort in der belasteten Gruppe festgestellt. Zusätzlich verdeutlichten die Abnahme der zellvermittelten Allergie vom verzögerten Typ (Typ IV-Überempfindlichkeit) und die Antikörperreaktion *in vivo* nach intradermaler Injektion von Ovalbumin eine Hemmung der T-Helferzellen bzw. der Gedächtnisfunktion des Immunsystems durch Umweltchemikalien. Im Vergleich hierzu fanden sich keine Gruppenunterschiede in der Zellproliferation mit dem B-Zellmitogen LPS, der *in vitro* Immunglobulin-Produktion und der Antigen-spezifischen Antikörperproduktion immunisierter Probanden. Die Mobilisation von persistenten Organochloriden aus den Fettdepots der Seehunde, hervorgerufen durch kurzzeitiges Fasten (15 Tage), bewirkte eine nur geringe Abnahme der Blutlymphozytenzahl und der NK-Zellaktivität *in vitro*, während die Mitogen- und Antigen-induzierte Lymphozytenproliferation unbeeinflusst blieb (De Swart et al., 1995, 1996). Die Autoren folgerten, dass eine chronische Exposition mit PCB vor allem die zelluläre Immunantwort negativ beeinflusst, während die humorale Immunantwort weitgehend unbeeinflusst bleibt (De Swart et al., 1995; Ross et al., 1995; De Swart et al., 1996).

Weiterhin wurden PVG-Ratten mit gleich hohen Dosen an schadstoffbelasteten Heringen aus der Ostsee und weniger belasteten Heringen aus dem Atlantischen Ozean gefüttert. Adulte Versuchstiere zeigten eine schadstoffbedingte Abnahme der Zellularität sowie des CD4/CD8-Verhältnisses im Thymus. Zusätzlich zeigten schadstoffbelastete Ratten eine verminderte Resistenz gegenüber einer experimentellen Zytomegalovirus-Infektion. Die perinatale Exposition bewirkte dagegen eine Entwicklungshemmung der Thymozyten bzw. deren Vorläuferzellen in Verbindung mit einer deutlich reduzierten T-Mitogen-induzierten Proliferation von Milzzellen und Thymozyten. Ferner fand sich in den schadstoffbelasteten Neonaten eine reduzierte Virus-assoziierte NK-Aktivität und eine reduzierte spezifische Antikörperproduktion (Ross et al., 1996b und 1997). Verschiedene wildlebende Seehundpopulationen in der Nord- und Ostsee weisen höhere PCB-Gehalte als die belasteten Versuchstiere auf, so dass eine schadstoffbedingte Immunsuppression für die erhöhte Krankheitsanfälligkeit der Tiere wahrscheinlich einen prädisponierenden Faktor darstellt (Ross et al., 1996a; Van Loveren et al., 2000). Die orale Applikation von Belugawal-Fettgewebe an C57Bl/6-Mäusen führte zu einer Abnahme an CD8⁺ T-Zellen in Verbindung mit einer Hemmung der humoralen Immunantwort in der Milz der Versuchstiere. Zusätzlich fand sich eine Suppression der phagozytischen Aktivität von Peritonealmakrophagen durch die Verfütterung von Fettgewebe. In der Untersuchung bestanden jedoch keine Unterschiede zwischen der Verfütterung von stark schadstoffbelasteten Fettgewebsproben der Belugawale aus dem St.-Lawrence-Fluss und denen der weniger belasteten Wale aus arktischen Gewässern, so dass andere Faktoren, wie z.B. Fettsäuren, für die Immunsuppression verantwortlich sein können (Fournier et al., 2000). Das Ausbleiben eines immuntoxischen Effektes in Fisher-Ratten nach Verfütterung von unterschiedlich stark schadstoffbelastetem Belugawal-Fettgewebe aus diesen Gebieten wird unter anderem mit einer verminderten Sensitivität der Versuchstiere gegenüber Organochloriden, der geringen Expositionsdauer (2 Monate) bzw. einer antagonistischen Wirkung des Organochloridgemisches erklärt (Lapierre et al., 1999). De Guise et al. (1998b) untersuchten die akute toxische Wirkung verschiedener Xenobiotika auf isolierte Blutlymphozyten und Milzzellen des Belugawals *in vitro*. Während keine Effekte auf die phagozytische Aktivität der lymphatischen Zellen festgestellt werden konnten, zeigte vor allem das PCB-Kongener 138 und *pp*-DDT eine deutliche Hemmung der spontanen und Mitogen-induzierten Zellproliferation.

2.2.3. Morphologie der lymphatischen Organe mariner Säuger

Das Immunsystem der Säugetiere wird in die primären lymphatischen Organe, Thymus und Knochenmark sowie in die sekundären Organe, Lymphknoten, Milz und das Schleimhaut-assoziierte lymphatische Gewebe (MALT) einschließlich der Tonsillen, unterteilt (Friess und Schlüns, 1990).

Der Schweinswal und der Gemeine Delphin weisen einen inversen Aufbau der Lymphknoten mit zentral gelegenen Follikeln auf (Moskov et al., 1969). Viszerale Lymphknoten des Großen Tümmlers unterscheiden sich aufgrund der ausgeprägten glatten Muskulatur in der Kapsel und den Trabekeln von den somatischen Lymphknoten. Sie sind damit zu einer aktiven Bewegung und Filtration der Lymphe befähigt. Ein ähnliches Netzwerk an glatter Muskulatur findet sich in den Lymphknoten des Belugawals (Romano et al., 1993; Cowan und Smith, 1999).

Die Milz und die häufig vorkommenden Nebenzmilzen der Wale weisen ebenfalls zahlreiche glatte Muskelzellen in der Kapsel und den Trabekeln auf und entsprechen damit dem Aufbau einer Speichermilz. Die Milz der Wale ist im Vergleich zu der Milz landlebender Säugetiere und Robben mit nur ungefähr 0,2% des relativen Körpergewichtes sehr klein. Die Speicherung von Blut kann folglich nur eine untergeordnete Rolle spielen (Zwillenberg, 1959). Die weiße Pulpa der Belugawale besteht vorwiegend aus der Periarteriolen Lymphatischen Scheide (PALS). Die Follikel dieser Tiere sind wenig ausgeprägt bzw. fehlen im adulten Tier fast vollständig (Romano et al., 1993). Neben der Funktion als sekundärem lymphatischem Organ ist die Milz des Großen Tümmlers zur extramedullären Hämatopoese befähigt (Cowan und Smith, 1999).

Die oropharyngealen Tonsillen der Wale sind lymphoepitheliale Organe mit zahlreichen verzweigten Krypten und sekretorischen Drüsen. Sie stellen das Äquivalent zum Waldeyerschen Rachenring dar. Smith et al. (1999) beschrieben zusätzlich eine komplexe lymphoepitheliale Drüse im Kehlkopf verschiedener Walspezies. Diese ungewöhnliche Lokalisation eines lymphatischen Gewebes wird als Anpassung an die vollständige Trennung des Respirations- und Digestionstraktes angesehen. Antigene gelangen so in der eingeatmeten Luft in Kontakt mit lymphatischen Zellen. Ob diese Struktur in allen *Cetaceen* vorkommt, ist noch nicht geklärt. Die Milz und das Schleimhaut-assoziierte lymphatische Gewebe der Wale ist in der Lamina propria und Submukosa des distalen Magen-Darm-Traktes am stärksten ausgebildet. Im Gegensatz zum Belugawal weist der Darm des Großen Tümmlers große konfluierende Peyersche Platten auf. Als eine besondere Ausbildung der Milz und des Schleimhaut-assoziierten lymphatischen Gewebes

findet sich im Analkanal verschiedener Wale ein komplexes lymphoepitheliales bzw. lymphoglanduläres Organ. Diese sogenannte „anale Tonsille“ wurde bisher beim Kalifornischen Grauwal (*Eschrichtius robustus*), Ganges-Delphin (*Platanista gangetica*), Streifendelphin (*Stenella coeruleoalba*) Rauhzahndelphin (*Steno bredanensis*), Borneo-Delphin (*Lagenodelphis hosei*) und dem Chinesischen Glattschweinswal (*Neophocaena asiaeorientalis*) beschrieben. Ob diese lymphatischen Einrichtung universell bei Walen vorkommt, ist noch ungeklärt. Die „anale Tonsille“ dient wahrscheinlich der Antigen-Präsentation von Fremdmaterial, welches durch einen Reflux von Wasser während der Tauchgänge in den Analkanal gelangt. Während die Milz und das Schleimhaut-assoziierte lymphatische Gewebe sowie die „anale Tonsille“ im juvenilen Tier zahlreiche Sekundärfollikel aufweisen, kommt es im Alter der Tiere zur zunehmenden Lymphozytendepletion und in der „analen Tonsille“ zusätzlich zu einer zystischen Erweiterung der Krypten. (Cowan und Smith, 1995 und 1999).

Der Thymus junger Wale entspricht dem typischen Thymus-Aufbau der Säugetiere. Der Kortex weist vorwiegend dicht gepackte Lymphozyten auf, während in der Medulla große Lymphozyten, epitheliale Retikulumzellen, interdigitierende Zellen, Hassallsche Körperchen und Gefäße histologisch sichtbar sind. Im Verlauf der Altersinvolution kommt es zur Depletion kortikaler Lymphozyten und zur Zunahme des interglobulären Fettgewebes (Romano et al., 1993). Als Ausdruck der Thymusrückbildung zeigen Schweinswale und Große Tümmler eine zunehmende Kondensation epithelialer Retikulumzellen mit lymphozytärer Depletion und zunehmender Zystenbildung des Organs. Größere kolloidgefüllte Thymuszysten sind mit einem ein- bis mehrschichtigen Plattenepithel ausgekleidet und verdrängen im Endzustand das ursprüngliche Gewebe nahezu vollständig. Dennoch kann beim Schweinswal noch bis ins hohe Alter lymphatisches Gewebe im Thymus nachgewiesen werden, was für einen langsamen physiologischen Prozess der Thymusinvolution spricht (Cowan, 1994; Wünschmann et al., 1999a).

Trotz einer weitgehend übereinstimmenden Morphologie zwischen marinen und landlebenden Säugetierspezies gibt es einige lymphatische Strukturen der Wale ohne Äquivalent in der *Nomina Anatomica Veterinaria* (Cowan und Smith, 1999).

2.2.4. Pathologische Veränderungen in lymphatischen Organen mariner Säuger

Im Verlauf von Morbillivirus-Infektionen mariner Säugetiere finden sich ausgeprägte pathologische Veränderungen in sämtlichen lymphatischen Organen (Kennedy, 1998; Jensen et al., 2002). Als Ausdruck einer Immunsuppression zeigen diese Tiere eine Leukopenie in Verbindung mit bakteriellen Sekundärinfektionen der Lunge sowie gelegentlichen parasitären und mykotischen Infektionen des ZNS (Domingo et al., 1992). Robben, die mit dem Seehund-Staupevirus (PDV) bzw. dem kaninen Staupevirus (CDV) infiziert sind, zeigen eine ausgeprägte Lymphozytolyse mit lymphozytärer Depletion in Lymphknoten, Milz, Thymus, Tonsillen und Schleimhaut-assoziierten lymphatischen Geweben (MALT). Diese Veränderungen entsprechen der lymphozytären Depletion im akuten Verlauf der Hundestaube (Wünschmann et al., 2000). Die Infektion von Streifendelphinen mit dem Delphin-Morbillivirus (DMV) und von Schweinswalen mit dem Schweinswal-Morbillivirus (PMW) führen ebenfalls zur massiven Nekrose und Schwund von lymphatischen Zellen. Bei diesen Tierarten finden sich typische mehrkernige Riesenzellen bzw. Synzytien-Bildungen der lymphatischen Zellen in Verbindung mit zytoplasmatischen und intranukleären Einschlusskörperchen. Diese Veränderungen entsprechen dem pathologischen Bild der Morbillivirus-Infektionen des Wiederkäuers (Rinderpest; Peste-des-petits-ruminants; Kennedy, 1998).

Neben tumorösen Veränderungen in Lymphknoten und Milz im Verlauf der lymphogenen Metastasierung finden sich in marinen Säugetieren zusätzlich primäre lymphoproliferative Erkrankungen. Beim Großen Tümmler und Pazifischen Weißseitendelphin wurden Lymphosarkome und eine erythroische Leukämie beschrieben. Zusätzlich wurde beim Schwertwal ein Lymphosarkom vom Hodgkin-Typ diagnostiziert (Yonezawa et al., 1989; Martineau et al., 1999). Turnbull und Cowan (1999) beschrieben die stark zunehmende Inzidenz einer progressiven, vaskulären Proliferation in der Lunge und in den viszerale Lymphknoten (Angiomatose) von Großen Tümmlern am Golf von Mexiko. Zusätzlich wiesen diese Tiere Hämangiome und lymphozytäre Depletionen in den Lymphknoten auf. Die Ursache der Angiomatose ist unklar, jedoch gehen die Autoren von einem bisher nicht identifizierten Virus aus. Des Weiteren wurde ein Fall von Lymphangiomyomatose in der Lunge sowie in den mediastinalen und mesenterialen Lymphknoten des Großen Tümmlers beschrieben (Rawson et al., 1992).

Die Infiltrationen mit eosinophilen Granulozyten in den mesenterialen Lymphknoten und MALT des Belugawals sind als Reaktion auf intestinale Parasiten anzusehen (Romano et al., 1993). In

der Untersuchung von 445 gestrandeten und beigefangenen Schweinswalen aus der deutschen Nord- und Ostsee fanden sich granulomatöse Lymphadenitiden infolge einer parasitären Infestation der Lunge und des Magen-Darm-Traktes (Siebert et al., 2001). Während die mikroskopischen, zystischen Veränderungen im Thymus eine normale Altersinvolution des Schweinswals darstellen, finden sich Makrozysten des Thymus als Folge schwerer Allgemeinerkrankungen (Wünschmann et al., 1999a). Ätiologisch lassen sich die Zysten auf eine Degeneration epithelialer Retikulumzellen (Sequesterzysten) oder auf eine zystische Dilatation der Hassallschen Körperchen (Plattenepithelzysten) zurückführen. Cowan (1994) machte in seinen Arbeiten keine abschließende Aussage darüber, ob die zystischen Veränderungen im Verlauf der Thymusinvolution des Großen Tümmlers als pathologischer oder physiologischer Prozess zu bewerten sind. Infestationen mit *Toxoplasma gondii* werden im Verlauf von Morbillivirus-Infektionen und anderen immunsuppressiven Zuständen bei marinen Säugetieren beobachtet (Domingo et al., 1992). Tachyzoiten und Bradyzoiten von *Toxoplasma gondii* in Verbindung mit einer ausgeprägten Histiozytose und Depletion von lymphatischen Zellen konnten in lymphatischen Organen von Belugawalen nachgewiesen werden (Mikaelian et al., 2000). Eine granulomatöse, teils nekrotisierende Entzündung der Lymphknoten mit mehrkernigen Riesenzellen wurde beim Schweinswal im Verlauf einer Rhizopusmykose beschrieben (Wünschmann et al., 1999b). Schweinswale mit einer *Staphylococcus aureus*-Septikämie zeigen eine eitrig-nekrotisierende Entzündung verschiedener Lymphknoten. Als Ausdruck einer gesteigerten Immunreaktion findet sich bei diesen Tieren zusätzlich eine ausgeprägte folliculäre Hyperplasie der Milz (Siebert et al., 2002).

2.2.5. Immunphänotypisierung von lymphatischen Zellen und lymphatischen Organen mariner Säuger

Morphologisch nicht zu unterscheidende Immunzellen exprimieren in Abhängigkeit ihres Aktivierungs- bzw. Reifestadiums unterschiedliche Antigenstrukturen an der Oberfläche, die mittels immunologischer Methoden nachgewiesen werden können (Cobbold und Metcalfe 1994). Veränderungen in dieser Immunphänotypisierung bzw. der Verlust bestimmter Lymphozytensubpopulationen werden im Verlauf von immunsuppressiven Erkrankungen beobachtet (Wünschmann et al., 2000). Zur Vereinheitlichung werden humane Oberflächenantigene in internationalen „Workshops“ katalogisiert („Cluster of Differentiation“ [CD]). Homologien dieser Marker wurden bisher für Hund, Katze, Schwein, Wiederkäuer und

das Pferd beschrieben (Hopkins et al., 1993; Howard und Nassens, 1993; Cobbold und Metcalfe, 1994; Saalmüller et al., 1994; Lunn et al., 1996). Es liegen jedoch nur wenige Berichte über kreuzreagierende oder speziesspezifische Antikörper bei Walen, Delphinen und Robben vor.

Verschiedene bovine, humane, ovine und murine monoklonale Antikörper wurden auf ihre Kreuzreaktivität mit peripheren Blutlymphozyten des Belugawals und Großen Tümmlers untersucht. Durch Immunpräzipitation wurde die Spezifität der kreuzreagierenden Antikörper bestätigt (Romano et al., 1992; De Guise et al., 1997a; Shirai et al., 1998a). Wie bei anderen Säugetierspezies wird das Haupthistokompatibilitätsantigen (MHC) Klasse I auf allen Blutlymphozyten exprimiert. Die Sequenz des MHC Klasse I-Gens des Großen Tümmlers weist eine große Homologie zur Sequenz landlebender Säugetiere auf (Shirai et al., 1998b). Der Belugawal und der Große Tümmler zeigen eine konstitutive Expression des MHC Klasse II-Antigens durch T-Zellen (Romano et al., 1992; Shirai et al., 1998a). Hierfür wird eine permanente T-Zellaktivierung durch die veränderte Sekundärstruktur des CD4-Moleküls der Wale verantwortlich gemacht (Romano et al., 1999). Zusätzlich zeigen Mitogen-aktivierte T-Zellen des Belugawales eine Aufregulation der MHC Klasse II-Moleküldichte auf der Zellmembran (Bernier et al., 2000). Im Vergleich zu landlebenden Säugetieren besitzen verschiedene Wal- und Robbenarten eine reduzierte genetische Variabilität des MHC Klasse II-Genlocus. Dieser geringe MHC Klasse II-Polymorphismus wurde mit einem niedrigen Selektionsdruck auf das Immunsystem im marinen Lebensraum in Verbindung gebracht (Slade, 1992). Neuere Untersuchungen gehen jedoch hauptsächlich von genetischen Engpässen bzw. einer reduzierten Basensubstitution in den Allelen des MHC Klasse II-Gens der Wale und Robben aus. Ob diese reduzierte MHC Klasse II-Variabilität mit einer erhöhten Empfänglichkeit gegenüber verschiedenen Pathogenen vergesellschaftet ist, bleibt spekulativ (Murray und White, 1998; Hoelzel et al., 1999).

Die $\gamma\delta$ -Form des T-Zellrezeptors (TCR) findet sich auf 31% der Blutlymphozyten des Belugawals. Zusätzlich werden 30% der peripheren Blutlymphozyten aufgrund ihrer CD4-Expression als T-Helferzellen identifiziert (De Guise et al., 1997a). Die molekulare Charakterisierung der CD4-mRNS zeigt, dass sowohl eine membrangebundene als auch eine lösliche Form des Oberflächenantigens beim Belugawal vorkommt (Romano et al., 1999). Der Anteil an B-Zellen im Blut dieser Tierart (3-12%) ist im Vergleich zum Großen Tümmler (10-15%) und landlebenden Säugetieren relativ niedrig (De Guise et al., 1997a; Romano et al., 1992). Durchflußzytometrische Untersuchungen mit T- (CD2) und B-Zellmarkern (CD19,

CD21) bei 10 verschiedenen Walarten zeigen, dass prozentual deutlich mehr T- als B-Lymphozyten im peripheren Blut der Tiere vorkommen (De Guise et al., 2002). Mittels Immunhistochemie werden CD30-positive Histiozyten im lymphatischen Gewebe und MB2-positive B-Zellen in den Follikelzentren des Großen Tümmlers nachgewiesen. Zusätzlich findet sich das Akute-Phase-Protein α -1 Antitrypsin und das Enzym Lysozym in den Lymphknoten. Die Myeloperoxidase findet sich vorwiegend in polymorphkernigen Granulozyten dieser Tierart (Kumar und Cowan, 1994).

De Guise et al. (1998a, 2002) produzierten monoklonale Antikörper gegen die Homologe der CD2-, CD19-, CD21- und CD45R-Antigene des Großen Tümmlers. Mittels Immunpräzipitation, Durchflußzytometrie und Immunhistologie wurden die verschiedenen Antikörper charakterisiert. Der CD2-Marker erkennt T-Zellen, während die monoklonalen anti-CD19- und -CD21-Antikörper vorwiegend B-Zellen markieren. Alle B-Zellen und eine Subpopulation der T-Zellen exprimieren das CD45R-Oberflächenantigen. Durch *in vitro* Stimulation mit Con A und PHA kommt es zu einem Verlust der CD45R-Expression durch T-Zellen. Die monoklonalen Antikörper zeigen eine weitreichende Kreuzreaktivität mit Immunzellen unterschiedlicher Walspezies.

Immunhistochemische Untersuchungen des Belugawals bezüglich der Verteilung der Tryrosinhydroxylase und des Neuropeptides Y demonstrieren die noradrenerge und peptiderge Innervation lymphatischer Organe. Die Nervenfasern stehen in direkter Verbindung zu lymphatischen Zellen, was für eine Interaktion des ZNS mit primären und sekundären lymphatischen Organen im Verlauf einer Immunantwort dieser Tierart spricht (Romano et al., 1994).

2.2.6. Nachweis von Zytokinen mariner Säuger

Zytokine sind einfache Polypeptide oder Glykoproteine mit einem niedrigen Molekulargewicht, die der Kommunikation der Zellen des Immunsystems dienen und damit eine bedeutende Rolle in der Erregerabwehr spielen. Darüber hinaus sind Zytokine an der Pathogenese verschiedener Erkrankungen sowie der Fieberinduktion beteiligt (Gröne et al., 1998, Frisk et al., 1999). Die bisher bei Meeressäugern bekannten Nukleotidsequenzen verschiedener pro- und anti-inflammatorischer Zytokine sind in Tabelle 1 dargestellt.

Inoue et al. (1999c und 2001b) klonierten und sequenzierten die cDNAs der Interleukin (IL)-1 α - und IL-1 β -mRNAs sowie der IL-1-Rezeptor Antagonisten (ra)-mRNAs aus mitogenstimulierten Lymphozyten des Großen Tümmlers. Während die Primärstrukturen der drei Zytokine untereinander relativ geringe Homologien (21-30%) aufweisen, stellen die Bindungsregionen für den IL-1-Rezeptor deutlich konservierte Regionen dar. Zur Untersuchung der biologischen Aktivität der Zytokine wurde rekombinantes IL-1 β und IL-1ra in *Escherichia (E.) coli* als Vektorsystem exprimiert. Der zytotoxische Effekt von IL-1 β auf die humane Melanom-Zelllinie A375S2 wird durch IL-1ra kompetitiv gehemmt. *In vitro* Untersuchungen an Seehunden und Kegelrobben zeigen eine LPS-induzierte Aufregulation von IL-1 in peripheren Blutlymphozyten. Die biologische Aktivität auf ein IL-1-empfindliches Zellsystem (murine D10 T-Zelllinie) wird spezifisch durch IL-1ra blockiert (King et al., 1995).

Die mRNA des IL-2-Vorläufermoleküls verschiedener Robbenarten und des Belugawals wurde molekularbiologisch charakterisiert. Darüber hinaus wurde die Kinetik der Con A-induzierten IL-2-Expression in peripheren Blutlymphozyten des Nördlichen See-Elefanten (*Mirounga angustirostris*) mittels RT-PCR untersucht (Shoda et al., 1998; St-Laurent et al., 1999). Zur Herstellung von rekombinanten Zytokinen des Schwertwals wurde ein Fragment der IL-2-kodierenden Region in Primatennierenzellen (Cos-1) transferiert (Ness et al., 1998). Die vollständige mRNA von IL-4, Interferon (IFN)- γ und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α des Großen Tümmlers wurden ebenfalls kloniert und die Aminosäure- und Nukleotidsequenzen in der Genbank veröffentlicht (Inoue et al., 1999a; Inoue et al., 1999b, Shoji et al., 2001). Strukturanalysen zeigen, dass TNF- α in einer löslichen und membrangebundenen Form im Großen Tümmler vorkommt. In *E.coli* exprimierte rekombinante TNF- α zeigte eine zytotoxische Aktivität auf die TNF-empfindliche murine Fibroblasten-Zelllinie L929. Die Spezifität des rekombinanten Zytokins wurde zusätzlich durch die Kreuzreaktion mit humanem anti-TNF- α -Antikörper bestätigt (Shoji et al., 2001). King et al. (1996) detektierten die partielle Sequenz der IL-6-mRNA des Schwertwals, Seehundes und Seeotters (*Enhydra lutris*). Sequenzanalysen zeigen, dass die Rezeptorbindenden Abschnitte (gp80, gp130) weitgehende Homologien zueinander aufweisen. Das spricht für eine konservierte biologische Aktivität des Zytokins. Der vollständige kodierende Genabschnitt des IL-6 des Belugawals wurde kloniert und rekombinantes Zytokin in *E.coli* exprimiert. Zur Herstellung eines IL-6-spezifischen Antiserums wurden Kaninchen mit dem rekombinanten IL-6 immunisiert (St-Laurent und Archambault, 2000). King et al. (1993) untersuchten die biologische Aktivität von IL-6 des Seehundes und der

Kegelrobbe mittels Bioassay. Systemische Infektionen führen bei Robben zu einem Anstieg von IL-6 im Blutplasma. Aufgrund der IL-6-bedingten Induktion der Akuten-Phase-Reaktion in Hepatozyten kommt es im Verlauf einer Infektion zu einer Aufregulation des C-reaktiven Proteins im Seehund (Funke et al., 1997).

Vergleiche mit bekannten Zytokin-mRNS- und Aminosäuresequenzen anderer Säugetiere zeigen, dass die Zytokine innerhalb der verschiedenen Walspezies eine monophyletische Gruppe bilden. Aufgrund ihrer genetischen Verwandtschaft bestehen große Homologien zwischen den Sequenzen der Paarhufer und der Wale, während humane, murine, kanine und feline Zytokine relativ große Unterschiede aufweisen (King et al., 1996; Ness et al., 1998; St-Laurent et al., 1999; Inoue et al., 1999 a,b,c und 2001; St-Laurent und Archambault, 2000; Shoji et al., 2001). Im Vergleich besitzen die Zytokine der Robben weitgehende Strukturgleichheiten mit den Zytokinen anderer Karnivoren (King et al., 1996; Shoda et al., 1998; St-Laurent et al., 1999). Konservierte Regionen finden sich vorwiegend in den biologisch aktiven Abschnitten der Moleküle, wie z.B. den rezeptorbindenden Regionen (King et al., 1996). Durch die Identifizierung der kodierenden Genabschnitte kann die Funktion der Zytokine in der zellulären Immunantwort der marinen Säugetiere untersucht werden. Darüber hinaus ermöglichen rekombinante Zytokine die Herstellung speziesspezifischer Antikörper sowie einen möglichen therapeutischen Einsatz bei marinen Säugetieren (Ness et al., 1998).

Tabelle 1: In der Gendatenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) veröffentlichte mRNS-Sequenzen verschiedener pro- und anti-inflammatorischer Zytokine von marinen Säugetieren

Zytokin	Spezies	Länge des Amplikons	“ Accession number“
IL-1ra	<i>Tursiops truncatus</i>	1693 bp ¹	AB038268
IL-1α	<i>Tursiops truncatus</i>	906 bp ¹	AB028215
IL-1β	<i>Tursiops truncatus</i>	818 bp ¹	AB028216
IL-2	<i>Orcinus orca</i>	455 bp ²	AF009570
IL-2*	<i>Delphinapterus leucas</i>	465 bp ¹	AF072870
IL-2*	<i>Halichoerus grypus</i>	468 bp ¹	AF072871
IL-2*	<i>Mirounga angustirostris</i>	664bp ¹	U79187
IL-4	<i>Tursiops truncatus</i>	528 bp ¹	AB020732
IL-6*	<i>Delphinapterus leucas</i>	627 bp ¹	AF076643
IL-6	<i>Orcinus orca</i>	670 bp ²	L46803
IL-6	<i>Phoca vitulina</i>	682 bp ²	L46802
IL-6	<i>Enhydra lutris</i>	672 bp ²	L46804
IL-10	<i>Orcinus orca</i>	548 bp ²	U93260
IFN-γ	<i>Tursiops truncatus</i>	548 bp ¹	AB022044
TNF-α	<i>Delphinapterus leucas</i>	1690 bp ²	AF320323
TNF-α*	<i>Tursiops truncatus</i>	1700 bp ¹	AB049358

bp = Basenpaare

* = Vorläufermolekül

¹ = komplette mRNS-Sequenz

² = partielle mRNS-Sequenz

3. Material und Methoden

3.1. Untersuchte Schweinswale und Probenentnahme

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden 61 Schweinswale vollständig seziiert. Von den seziierten Tieren stammen 30 aus der Nord- und Ostsee, 12 aus isländischen und 19 aus norwegischen Gewässern. Die Schweinswale wurden verendet an den Küsten gefunden und anschließend geborgen (Strandfund, n=10) oder verstarben als Beifänge in Fischernetzen (Beifang, n=51; Anhang 1). Die immunhistologischen Untersuchungen auf das Vorhandensein von Morbillivirus-Antigen verlief bei allen Tieren mit negativem Ergebnis (Müller et al., 2000; Dr. G. Müller; Institut für Veterinär-Pathologie; Justus-Liebig-Universität Giessen: persönliche Mitteilung).

Für die mikrobiologischen Untersuchungen wurden von 57 Schweinswalen während der Obduktionen verschiedene Gewebe und Tupferproben entnommen und bis zur Weiterbearbeitung bei -25°C eingefroren (Anhang 1).

Die in Schleswig-Holstein und Dänemark gefundenen Tiere wurden über ein etabliertes Strandungsnetz gemeldet. Zum Teil wurden die an den Küsten aufgefundenen Schweinswale von den zuständigen Seehundjägern oder Naturschutzorganisationen in Gefriertruhen der Sammelstellen des Strandungsnetzes zwischengelagert und von dort zum Forschungs- und Technologiezentrum Westküste der Christian-Albrecht-Universität Kiel in Büsum transportiert. Schweinswale, die erst wenige Stunden zuvor verendet waren, wurden direkt zum Forschungs- und Technologiezentrum Westküste transportiert.

Im Rahmen einer Forschungsreise nach Reykjavík (Island) wurden 12 beigefangene Schweinswale obduziert. Die Schweinswale waren versehentlich in Netzen gefangen worden und verendet. Die Tiere wurden direkt nach dem Fang von den Fischern am „Marine Research Institute“, Reykjavík, abgegeben.

Während einer Forschungsreise nach Norwegen wurden 19 Schweinswale seziiert. Bei den Tieren aus norwegischen Gewässern handelte es sich ebenfalls um Beifänge, die von Fischern im „Institute of Marine Research“, Bergen, Norwegen abgegeben wurden. Aus logistischen Gründen wurden die Tiere unmittelbar nach dem versehentlichen Fang auf den Schiffen

tiefgefroren. Ein Tier aus norwegischen Gewässern konnte ohne vorheriges Einfrieren sezziert werden.

Die an der niederländischen Küste gestrandeten Schweinswale wurden am „Dolphinarium Harderwijk“ aufgrund ihres moribunden Zustandes euthanasiert. Die Sektion erfolgte anschließend durch Dr. Niels van Elk und Dr. Thijs Kuiken am „Department of Virology“, Erasmus University Rotterdam, Die Niederlande.

Die Obduktionen wurden nach den Standardmethoden des Forschungs- und Technologiezentrums Westküste durchgeführt. Die Technik basiert auf den Empfehlungen zur Sektion von Kleinwalen der „European Cetacean Society“ (ECS) (Kuiken und Hartmann, 1993). Im Rahmen der Obduktion wurden Gewebeprobe zur bakteriologischen und histologisch-pathologischen Untersuchung sowie Blutproben gewonnen. Für die toxikologischen Analysen wurden 20g Unterhautfettgewebe kaudal der Rückenfinne asserviert. Zusätzlich wurden für die Altersbestimmung vier mesiale Zähne im Unterkiefer entnommen (Anhang 2).

Der Ernährungszustand wurde aufgrund der Dicke des Unterhautfettgewebes an vier verschiedenen Lokalisationen (sternal, kaudodorsal, kaudolateral und kaudoventral der Rückenfinne) und dem Grad der Muskelatrophie ermittelt (Anhang 2). Die Referenzwerte der Fettgewebisdicke der vier Lokalisationen lagen bei 20-50 mm (gut); 15-30 mm (mäßig) und 5-20 mm (schlechter Ernährungszustand; Siebert et al., 2001).

Basierend auf dem Schweregrad der pathologischen Hauptveränderungen und des Ernährungszustandes wurde der Gesundheitsstatus der Schweinswalen ermittelt (Wünschmann et al., 1999a).

Zur Etablierung des Lymphozytenstimulationstests und des Zytokin-Nachweises mittels RT-PCR wurden heparinisierte Vollblutproben durch Punktion der Schwanzvene von vier klinisch gesunden Schweinswalen entnommen. Jeweils zwei Tiere stammten aus dem Fjord- und Beltcenter in Kerteminde (Dänemark; „Eigel“ [SW-1]; „Freja“ [SW-2]) und dem Dolphinarium Harderwijk (Die Niederlande; „Daan“ [SW-3]; „Johan“ [SW-4]). Die Blutproben wurden innerhalb von 18 Stunden an das Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Giessen transportiert (4°C) und sofort weiterverarbeitet.

3.2. Histologische Untersuchungen

Gewebeproben wurden mindestens 24 Stunden in nicht-gepuffertem 10%igem Formalin fixiert (Tabelle 2). Nach Entwässerung der Gewebeproben in einer aufsteigenden Alkoholreihe erfolgte die Einbettung bei 58°C in einem Paraffin-Paraplast®-Gemisch. 3 µm dicke Schnitte wurden auf Star Frost Objektträger (Menzel Gläser®) aufgezogen und mit Hämatoxylin-Eosin (HE; Merck, E.) gefärbt.

Für die Gefrierblockherstellung wurden Teile von Thymus, Milz und Tonsillen sowie Mandibular-, Bronchial- und Mesenterial-Lymphknoten bei der Sektion entnommen (Tabelle 2). Von den Organen wurden ca. 0,5 x 0,5 x 0,5 cm große Blöcke hergestellt und in Aluminiumhütchen gelegt, mit Tissue-Tec® OCT (Vogel GmbH & Co KG) bedeckt und in Isopentan (Fluka Chemie AG) mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Gefrierblöcke erfolgte bei -80°C. Für die histologische und immunhistologische Untersuchung wurden 10 µm dicke Schnitte auf einem Kryotom (Reichert-Jung GmbH) angefertigt, auf Superfrost Plus®-Objektträger (Menzel Gläser, Glasbearbeitungswerk GmbH & CoKG) aufgezogen, 10 Minuten luftgetrocknet und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur in Aceton fixiert. Die Aufbewahrung der Schnitte erfolgte bei -80°C.

Tabelle 2: Gewebeproben für die histologische und immunhistologische Untersuchung

<i>Organ</i>	<i>Formalin-fixiertes Paraffin- eingebettetes Gewebe</i>	<i>Gefrierblöcke</i>
Augen	+	-
Bronchial-Lymphknoten	+	+
Darm	+	-
Gehirn, Rückenmark	+	-
Harnblase	+	-
Haut	+	-
Herz, Aorta	+	-
Leber	+	-
Lunge, Trachea	+	-
Magen (1., 2. und 4. Komp.)	+	-
Mamma	+	-
Mandibular-Lymphknoten	+	+
Mesenterial-Lymphknoten	+	+
Milz	+	+
Nieren	+	-
Ösophagus	+	-
Ovarien bzw. Hoden	+	-
Pankreas	+	-
Penis	+	-
Rete mirabilis	+	-
Skelettmuskulatur	+	-
Thymus	+	+
Tonsille	+	+
Zunge	+	-

+ = Probe wurde asserviert; - = keine Probe entnommen

3.3. Mikrobiologische Untersuchungen

Die mikrobiologischen Untersuchungen der Organproben erfolgten durch Herrn Dr. R. Weiß am Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität, Giessen. Dazu wurden die Proben zunächst in 70%iges Propanol getaucht, abgeflammt, halbiert und die Schnittflächen auf Schafblutagarplatten ausgestrichen. Die Inkubation der Schafblutagarplatten erfolgte für 24 bis 48 Stunden 37°C in einem CO₂-Brutschrank.

3.4. Altersbestimmung

Die Altersbestimmung erfolgte anhand der Jahreszuwachsringe der Zähne nach der Methode von Lockyer (1995). Das Alter von 45 Schweinswalen aus deutschen, dänischen und norwegischen Gewässern wurde von Dr. C. Lockyer, „Institute for Fisheries Research“,

Charlottenlund, Dänemark, bestimmt. Die Altersbestimmung von 10 Tieren aus isländischen Gewässern erfolgte durch Dr. G. Víkingsson, „Marine Research Institute“, Reykjavík. Das Alter von vier Schweinswalen wurde anhand der Körperproportionen bestimmt (HDW1; HDW7, HDW14; HDW15; Anhang 1).

3.5. Immunhistologische Untersuchungen

In einer Vorversuchsreihe wurden 26 Antikörper verschiedener Spezies auf ihre Kreuzreaktivität mit Thymus, Milz, Tonsillen und verschiedenen Lymphknoten auf Gefrierschnitten und Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Geweben (Paraffinschnitte) von drei Schweinswalen (pp420, pp421, pp649) ausgetestet. Weiterhin wurden die optimalen Konzentrationen zur Darstellung der Lymphozyten-Subpopulationen ermittelt (Tabelle 3). Als Positivkontrollen dienten lymphatische Gewebe von Hund, Rind und Pferd.

Im Hauptversuch wurden phänotypische Veränderungen von Milz und Thymus immunhistologisch charakterisiert. Hierzu wurden von insgesamt 29 Schweinswalen Gefrierschnitte der lymphatischen Organe hergestellt (Tabelle 4).

3.5.1. Antikörper

Primär-, Sekundär- und Tertiärantikörper wurden in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) (Fluka Chemie AG) verdünnt.

Primärantikörper:

In der Vorversuchsreihe wurden alle 26 Primärantikörper zunächst 1: 10 verdünnt (Tabelle 3). Die kreuzreagierenden Antikörpern wurden anschließend von 1:50 bis 1:3200 verdünnt (zweifache Verdünnungsreihe). Für den Hauptversuch wurden monoklonale Antikörper gegen das CD2-, CD3ε- und CD45R-Antigen sowie der bovine, kanine und walspezifische MHC Klasse II-Marker sowie der equine Pan-Leukozytenmarker eingesetzt (Klon [Verdünnung]; F21 I2 D3 [1:200]; CD3-12 [1:200], F21 H2 E10 [1:400]; 171 D3 [1:200]; Dog 26-1 [1:10]; F21 K2 B6 [1:200]; F6B [1:400])

Tabelle3: Antigen, Bezeichnung, Spezies-Spezifität und Herkunftsspezies der monoklonalen und polyklonalen Antikörper zur immunhistologischen Darstellung von lymphatischen Zellen des Schweinswales

Antigen	Klon/ Antiserum	Spezies- Spezifität	Herkunftsspezies	Referenz
MHC II	F21 K2 B6	<i>Orcinus orca</i>	m	Dr. J. Stott [†]
CD2	F21 I2 D3	<i>Orcinus orca</i>	m	Dr. J. Stott [†]
CD2	F21 C2 D3	<i>Orcinus orca</i>	m	Dr. J. Stott [†]
CD45R	F21 H2 E10	<i>Orcinus orca</i>	m	Dr. J. Stott [†]
Pan-Leukozyten	F6B	<i>Equus caballus</i>	r	Dr. J. Stott [†]
CD8	CC 63	<i>Bos taurus</i>	m	Dr. J. Stott [†]
MHC II	171 D3	<i>Bos taurus</i>	m	Dr. J. Stott [†]
CD2	IL-A 43	<i>Bos taurus</i>	m	Dr. J. Naessens [‡]
CD4	IL-A 11	<i>Bos taurus</i>	m	Dr. J. Naessens [‡]
CD8 α	IL-A 105	<i>Bos taurus</i>	m	Dr. J. Naessens [‡]
CD21	IL-A 65	<i>Bos taurus</i>	m	Dr. J. Naessens [‡]
CD3e	CD3-12	Weit*	r	Connex [§]
CD8 α	Dog 10-1-1	<i>Canis familiaris</i>	m	Dr. C. Vogl [¶]
MHC II	Dog 12-1	<i>Canis familiaris</i>	m	Dr. C. Vogl [¶]
Thy-1	Dog 14-2	<i>Canis familiaris</i>	r	Dr. C. Vogl [¶]
Granulozyten + Monozyten	Dog 15-7	<i>Canis familiaris</i>	r	Dr. C. Vogl [¶]
CD5	Dog 17-4-8	<i>Canis familiaris</i>	r	Dr. C. Vogl [¶]
TCR	Dog 18-6	<i>Canis familiaris</i>	m	Dr. C. Vogl [¶]
Pan-T-Zellen	Dog 19-3	<i>Canis familiaris</i>	m	Dr. C. Vogl [¶]
CDw41	Dog 20-4	<i>Canis familiaris</i>	m	Dr. C. Vogl [¶]
Reife T + B-Zellen	Dog 24-8	<i>Canis familiaris</i>	r	Dr. C. Vogl [¶]
MHC II	Dog 26-1,	<i>Canis familiaris</i>	r	Dr. C. Vogl [¶]
CD45	Dog 32-2	<i>Canis familiaris</i>	r	Dr. C. Vogl [¶]
CD45R	Dog 35-4	<i>Canis familiaris</i>	r	Dr. C. Vogl [¶]
CD4	YKIX 302.9.3.7	<i>Canis familiaris</i>	r	Dr. S. Cobbold [¶]
CD45	2B11	<i>Homo sapiens</i>	m	Dako Diagnostika ^{**}
CD3	A 0452 (pAK)	<i>Homo sapiens</i>	kan	Dako Diagnostika ^{**}

r = Ratte; m = Maus; kan = Kaninchen; pAK = polyklonaler Antikörper.

* weitreichende Spezies-übergreifende Kreuzreaktivität

[†]University of California Davis, Davis, CA, USA

[‡]International Livestock Research Institute, Nairobi, Kenia

[¶]GSF-National Research Center for Environment and Health, München, Deutschland

[¶]University of Cambridge, UK

[§]München, Deutschland

^{**}Hamburg, Deutschland

Sekundärantikörper:

Biotiniliertes Pferd-anti-Maus-Immunglobulin (Vector Laboratories Inc.); 9 μ l/ml TBS

Biotiniliertes Kaninchen-anti-Ratte-Immunglobulin (Vector Laboratories Inc.); 9 μ l/ml TBS

Tertiärantikörper:

Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC, Vector Laboratories Inc.); 9 μ l Avidin und 9 μ l Biotin/ml TBS

3.5.2. Durchführung der ABC-Methode

Die immunhistochemische Untersuchung der lymphatischen Organe wurde nach einem Protokoll von Wünschmann et al. (2000) zur Darstellung von kaninen Lymphozyten-Subpopulationen durchgeführt. Soweit keine abweichenden Angaben beschrieben sind, wurden die Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

1. Trocknen der bei -80°C gelagerten Gefrierschnitte ($10\ \mu\text{m}$) für 30 Minuten bzw. Entparaffinieren der Paraffinschnitte ($5\ \mu\text{m}$) in Xylol-Ersatz (Roti[®]-Histol; Roth C.) für dreimal 5 Minuten, in 100%igem Isopropanol (Merck E.) für zweimal 5 Minuten und in einer absteigenden Alkoholreihe (96-, 80-, 70-, 50%iges Äthanol; Merck, E.) für jeweils 3 Minuten
2. Umranden der einzelnen Schnitte mittels Pap-Pen[®] (Science Service)
3. Zweimaliges Waschen der Schnitte in TBS für je 5 Minuten
4. Inaktivieren der endogenen Peroxidase in 0,03%igem H_2O_2 (Merck, E.) verdünnt in TBS (Gefrierschnitte) bzw. in 0,5%igem H_2O_2 (Merck, E.) verdünnt in Methanol (Roth C.; Paraffinschnitte) für 30 Minuten
5. Dreimaliges Waschen der Schnitte in TBS für 5 Minuten
6. Inkubation der Paraffinschnitte in PBS und 0,05%iger Protease-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie) für jeweils 5 Minuten bei 37°C und anschließendes dreimaliges Waschen in eiskaltem TBS für jeweils 5 Minuten
7. Inkubation der Schnitte mit dem Primärantikörper für 16 Stunden bei 4°C
8. Absaugen des Primärantikörpers
9. Dreimaliges Waschen der Schnitte in TBS für 5 Minuten
10. Inkubation der Schnitte mit dem Sekundärantikörper für 30 Minuten
11. Absaugen des Sekundärantikörpers
12. Dreimaliges Waschen der Schnitte in TBS für 5 Minuten
13. Inkubation der Schnitte mit dem ABC für 30 Minuten
14. Absaugen des ABCs
15. Dreimaliges Waschen der Schnitte in TBS für 5 Minuten
16. Inkubation der Schnitte in gefiltertem 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB), gelöst in 0,1M Imidazolpuffer (Fluka Chemie AG) mit 0,01%igem H_2O_2
17. Dreimaliges Waschen der Schnitte in TBS für 5 Minuten
18. Einmaliges Waschen der Schnitte in Aqua bidest. für 5 Minuten

19. Gegenfärbung der Schnitte in Papanicolaou-Lösung (Merck, E.; 1:20 verdünnt in Aqua bidest.) für 30 Sekunden
20. Bläuen der Schnitte für 5 Minuten in Leitungswasser
21. Einmaliges Waschen der Schnitte in Aqua bidest. für 5 Minuten
22. Entwässern der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50-, 70-, 80-, 96%iges Äthanol, Merck, E.) für je 3 Minuten, für zweimal 3 Minuten in 100%igem Isopropanol (Merck E.) und für zweimal 5 Minuten in Xylol-Ersatz (Roti[®]-Histol; Roth C.) als Intermedium
23. Eindecken der Schnitte mit Eukitt[®] (Corbit Balsam; Hecht I.)

3.5.3. Auswertung der Befunde in den lymphatischen Organen

Zur Bestimmung phänotypischer Veränderungen in Milz und Thymus von 29 Schweinswalen wurde der Grad der Lymphozytendepletion zunächst anhand HE-gefärbter Gefrierschnitte geschätzt. Im Thymus wurde die Zelldichte im Rinden- und Markbereich sowie die Deutlichkeit der Mark-Rindengrenze beurteilt. Dabei wurde zwischen nicht, gering-, mittel- und hochgradig depletierten Thymi unterschieden (Tabelle 4). In der Milz wurden die PALS und die Follikel als Kompartimente der weißen Pulpa unterschieden. In einer unveränderten Milz fanden sich zahlreiche gut differenzierte Primär- und Sekundärfollikel sowie eine deutliche, aus mehreren Zellreihen bestehende PALS. Als geringgradig depletiert galt eine Milz, deren weiße Pulpa verkleinert war und/oder keine Keimzentren aufwies. Mittelgradig depletierte Milzen zeigten eine ausgeprägte Verkleinerung der weißen Pulpa mit deutlich verkleinerten Follikeln. Als hochgradig depletiert galt eine Milz, wenn histologisch nur geringe Anteile der weißen Pulpa erkennbar waren (Tabelle 4). Zur semiquantitativen Evaluierung der immunhistologischen Befunde wurde die Zahl der immunreaktiven Zellen in den Kompartiment der lymphatischen Organe geschätzt (**Schätzwert**). Die Auswertung erfolgte nach folgendem Schema: 0 = alle Zellen negativ; 1 = ca. 1 bis 25%; 2 = ca. 26 bis 50%; 3 = ca. 51 bis 75%; 4 = ca. 76 bis 100% der Zellen positiv (Wünschmann et al., 2000).

Tabelle 4: Gradierung der Thymusatrophie und Milzdepletion der untersuchten Schweinswale

	Tiernummer	Thymusatrophie		Milzdepletion	
1	pp1279	-	I	ggr	II
2	pp1348	hgr	IV	mgr	III
3	pp1366	hgr	IV	mgr	III
4	pp1423	-	I	-	I
5	pp1473	-	I	ggr	II
6	pp1481	mgr	III	ggr	II
7	pp1500	-	I	-	I
8	pp1502	-	I	ggr	II
9	pp1503	-	I	ggr	II
10	pp1504	-	I	-	I
11	pp1507	ggr	II	-	I
12	pp1512	-	I	ggr	II
13	pp1514	ggr	II	ggr	II
14	pp1517	ggr	II	mgr	III
15	pp1520	mgr	III	ggr	II
16	pp1524	ggr	II	ggr	II
17	pp1529	mgr	III	gr	II
18	pp1640	mgr	III	hgr	IV
19	pp1641	hgr	IV	mgr	III
20	pp1642	mgr	III	-	I
21	pp1660	mgr	III	ggr	II
22	pp1664	ggr	II	-	I
23	pp1670	mgr	III	ggr	II
24	pp1678	ggr	II	gr	II
25	pp1680	hgr	IV	mgr	III
26	pp1715	-	I	mgr	III
27	HDW1	hgr	IV	-	I
28	HDW7	hgr	IV	ggr	II
29	HDW15	hgr	IV	mgr	III

- = keine; ggr = geringgradig; mgr = mittelgradig; hgr = hochgradig; I = keine; II = geringgradige; III = mittelgradige; IV = hochgradige Thymusatrophie bzw. Milzdepletion

3.6. Lymphozytenstimulationstest

3.6.1. Kulturmedium

Als Kulturmedium wurde „Eagle`s minimal essential medium“ mit L-Glutamin (MEME, PAA Laboratories) mit einem Zusatz von 1% Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) verwendet. Zur Kultivierung der Lymphozyten wurde dem Zellkulturmedium 10%iges fötales Kälberserum (FKS, PAA Laboratories) zugesetzt (Wagner et al., 1999).

3.6.2. Isolierung der Lymphozyten aus Vollblutproben mittels einstufiger Percoll®-Dichtegradientenzentrifugation

Die Herstellung der Percoll®-Stammlösung (Pharmacia Fine Chemicals) erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Hierzu wurden neun Teile Percoll® mit einem Teil steriler 1,5 M NaCl-Lösung zu einer Stammlösung mit einer spezifischen Dichte von 1,119 g/ml verdünnt. Durch Zugabe von sterilem Zellkulturmedium wurde eine Gebrauchslösung mit einem Percoll®-Anteil von 58,5% hergestellt.

Die heparinisierten Vollblutproben wurden im Verhältnis 1:3 mit dem Zellkulturmedium vermischt und jeweils 4 ml des verdünnten Blutes vorsichtig auf eine 3 ml Percoll®-Säule in einem Zentrifugenröhrchen geschichtet. Nach einer Zentrifugation von 25 Minuten bei 800 x g und 15°C stellte sich die Leukozytenfraktion als eine ca. 1-2 mm breite, grau-weiße Bande im Überstand dar. Die Bande wurde mittels einer Pasteurpipette in ein neues Zentrifugenröhrchen mit 2 ml Zellkulturmedium überführt. Nach zweimaligem Waschen durch Zentrifugation bei 400 x g für 5 Minuten und 15°C und anschließendem Resuspendieren des Zellpellets in 2 ml Zellkulturmedium wurde das Zellpellet in 500 µl resuspendiert. Zur Bestimmung der Anzahl vitaler Lymphozyten wurden 20 µl der Zellsuspension mit 40 µl 0,36%iger Trypanblaulösung (Verdünnungsverhältnis: 1:2; Roth, C.) verdünnt und die Zellen in 4 Gruppenquadraten einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellzahl/ml errechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Anzahl lebender Zellen}}{4} \times 10000 \times 3$$

3 = Verdünnungsfaktor

4 = Anzahl der Gruppenquadrate

Zur Überprüfung der Lymphozytenanreicherung wurden von den frischen Blutproben luftgetrocknete Ausstriche sowie Zytozentrifugenpräparate der isolierten Zellen hergestellt und nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt. Zur Anfertigung der Zytozentrifugenpräparate wurden 200 µl der Zellsuspensionen entnommen und die Leukozyten durch Zentrifugation in einer Zytozentrifuge (Shandon Elliot Cytospin, Shandon) bei 25 x g für 10 Minuten auf einen Objektträger übertragen. Die lichtmikroskopische Auszählung von 200 Leukozyten zur

Bestimmung des prozentualen Anteils der einzelnen Leukozytenarten (relative Zahl) erfolgte bei 100facher Vergrößerung in Ölimmersion.

3.6.3. Verwendete Mitogene

Als Mitogene wurden kommerziell erhältliche Pflanzenlektine verwendet, die mit serumfreiem Zellkulturmedium nach den Angaben des Herstellers auf eine Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt und bei -20°C gelagert wurden. Kurz vor Versuchsbeginn wurde das T-Zellmitogen Concanavalin A (Con A; Sigma-Aldrich Chemie), Phythämagglutinin (PHA, Sigma-Aldrich Chemie) und das B-Zell-abhängige T-Zellmitogen Pokeweed Mitogen (PWM; Sigma-Aldrich Chemie) mit serumhaltigem Kulturmedium auf die jeweiligen Konzentrationen verdünnt.

3.6.4. Durchführung des Lymphozytenstimulationstests (LST)

Die Kultivierung der isolierten Lymphozyten erfolgte in einer ELISA-96-Loch-Flachbodenplatte (Falcon) in einem Zweifachansatz pro Blutprobe und Mitogen. In jede Vertiefung der Platte wurde eine Suspension von 100 μl mit 200 000 vitalen Zellen ausgesät und mit 100 μl der jeweiligen Mitogenlösung beimpft. Die drei Mitogene (Con A, PHA, PWM) wurden in einer Konzentrationsreihe von 100, 10, 5, 2, 0,5 und 0,01 $\mu\text{g/ml}$ im Ansatz eingesetzt. Als unstimulierte Kontrolle wurden die Zellen mit serumhaltigem Kulturmedium ohne Mitogen versetzt. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank für 72 Stunden bei 37°C und einer CO_2 -Atmosphäre von 5%.

3.6.5. Bromdeoxyuridin (BrdU)-Test

Die Messung der Mitogen-induzierten Zellproliferation nach einer Inkubation von 72 Stunden erfolgte mittels des BrdU-Tests und anschließender photometrischer Auswertung der Farbintensität. Die Herstellung der Reagenzien und die Durchführung des Testes erfolgten nach den Angaben des Herstellers („Cell Proliferation ELISA BrdU“, Roche Molecular

Biochemicals). Soweit keine abweichenden Angaben beschrieben sind, wurden alle Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.6.5.1. Reagenzien

1. BrdU-Markierungslösung:

Vor jedem Ansatz wurde die BrdU-Markierungslösung mit serumfreiem Zellkulturmedium im Verhältnis 1:100 verdünnt.

2. Anti-BrdU-POD-Stammlösung:

Das gesamte Anti-BrdU-POD-Lyophilisat wurde in 1,1 ml Aqua dest. durch vorsichtiges Schütteln für 10 Minuten aufgelöst und bei -20°C gelagert.

3. Anti-BrdU-POD-Arbeitslösung:

Vor jedem Ansatz wurde die Anti-BrdU-POD-Stammlösung mit der Antikörper-Verdünnungslösung in Verhältnis 1:100 verdünnt.

Vor jedem Ansatz wurde das Waschpuffer-Konzentrat mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10 verdünnt.

3.6.5.2. Durchführung des BrdU-Test

1. Zugabe von je 20 μl der verdünnten BrdU-Markierungslösung pro Vertiefung der Mikrotiterplatte
2. Inkubation der Zellkultur für 2 Stunden bei 37°C und 5% CO_2
3. Zentrifugation der Mikrotiterplatte für 10 Minuten bei 300 x g
4. Vorsichtiges Absaugen des Überstandes
5. Trocknen der Zellen durch föhnen für ca. 10 Minuten
6. Zugabe von je 200 μl FixDenat[®] pro Vertiefung der Mikrotiterplatte für 30 Minuten zur Zellfixation und DNA-Denaturierung, um eingebautes BrdU dem Antikörper zugänglich zu machen
7. Vorsichtiges Absaugen des FixDenat[®]

8. Zugabe von 100 μ l der Anti-BrdU-POD-Arbeitslösung und Inkubation für 90 Minuten zur Markierung des eingebauten BrdU mittels des Peroxidase-gekoppelten Antikörpers
9. Dreimaliges Waschen der Mikrotiterplatte durch Zugabe von je 200 μ l der verdünnten Waschpufferlösung und Zentrifugation für je 10 Minuten bei 300 x g.
10. Zugabe von je 100 μ l Substratlösung (Tetramethylbenzidin) pro Vertiefung und Inkubation für 5 Minuten
11. Abstoppen der Farbreaktion durch Zugabe von 25 μ l 1M H₂SO₄ pro Vertiefung
12. Messen der optischen Dichte der gelben Farblösung innerhalb von 5 Minuten bei einer Testwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm mittels eines Ein-Kanal-Photometer (ELISA-Photometer, Titertek Multiscan[®] Plus, Flow Laboratories).

3.6.5.3. Stimulationsindex (SI)

Bei der photometrischen Auswertung des LST wurden die arithmetischen Mittelwerte der Messwerte jedes Mitogens und der unstimulierten Kontrolle ermittelt und in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Stimulationsindex (SI)} = \frac{\text{Mittelwert nach Mitogenstimulation}}{\text{Mittelwert der Kontrolle}} \times 100$$

3.7. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

3.7.1. RNS-Isolierung

3.7.1.1. RNS-Isolierung aus lymphatischen Organen und Lymphozyten-Suspensionen

Der Nachweis der Zytokinexpression in Milz und Thymus der Schweinswale erfolgte aus OCT-eingebetteten Gefrierblöcken. Hierzu wurden pro Gewebeprobe 8 x 20 μm dicke Gefrierschnitte im Kryostaten hergestellt.

Zur Isolierung der Gesamt-RNS aus unstimulierten und Mitogen-stimulierten Lymphozyten wurden jeweils 150 μl der Zellsuspension aus dem Lymphozytenstimulationstest (siehe dort) eingesetzt.

Soweit keine abweichenden Angaben gemacht werden, sind die Arbeitsschritte unter einer Reinraumbank bei Raumtemperatur und in 1,5ml-Eppendorfgefäßen durchgeführt worden.

1. Mischen von 8 x 20 μm dicken Gefrierschnitten bzw. 150 μl Flüssigkeit mit einem ml TRIZOL[®]-Reagenz (Gibco-BRL) und Inkubation für 5 Minuten
2. Zugabe von 300 μl Chloroform
3. Mischen der Probe durch kräftiges Schütteln für 15 Sekunden
4. Inkubation für 3 Minuten
5. Zentrifugation für 15 Minuten bei 12 000 x g
6. Überführen der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß und Verwerfen der restlichen Flüssigkeit
7. Zugabe von 700 μl Isopropanol und Inkubation des Gemisches für 5 Stunden bei -40°C
8. Zentrifugation für 10 Minuten bei 12 000 x g
9. Verwerfen des Überstandes
10. Einmaliges Waschen des Pellets mit 600 μl 75%igem Äthanol
11. Zugabe von 600 μl 75%igem Äthanol und Lagerung bei -80°C

3.7.1.2. RNS-Isolierung aus Vollblut mittels RNaid®PLUS KIT

Die RNS-Extraktion aus Vollblutproben erfolgte unter Verwendung des RNaid®PLUS KITs (Dianova) nach den Angaben des Herstellers. Soweit keine abweichenden Angaben gemacht werden, wurden alle Arbeitsschritte unter einer Reinraumbank bei Raumtemperatur durchgeführt. Vor der ersten Anwendung wurden zu dem vom Hersteller vorgegebenen Phenolpuffer insgesamt 70 ml Phenol hinzugegeben und 14 Stunden bei 4°C stehen gelassen. Weiterhin wurde der vom Hersteller vorgegebene Isoamylalkohol mit 72 ml Chloroform und die „RNA wash solution“ mit 120 ml 99,8%igem Äthanol versetzt.

Zu den 150 ml Vollblut wurden 500 µl Guanidinium-Thiocyanat-haltige „cell lysis solution“ in ein 2,5ml-Eppendorfgefäß gegeben und in einem Rotationsmischer (3300 Eppendorf) geschüttelt. Anschließend wurden 500 µl gepuffertes saures Phenol (pH 4,0) hinzugefügt. Nach Versetzen mit 250 µl eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) wurde die Lösung für 15 Minuten auf Eis gestellt, bevor sie für 20 Minuten bei 14 200 x g in einer Tischzentrifuge (Hettich) zentrifugiert wurde. Der wässrige Überstand wurde vorsichtig, ohne Berühren der mittleren Phase, abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 250 µl des Chloroform/Isoamylalkohol-Gemischs hierzu wurde erneut geschüttelt und 5 Minuten bei 14 200 x g zentrifugiert.

Der oberen wäßrigen Phase wurde nach Überführung in ein neues Eppendorfgefäß 30 µl „RNS-Matrix“ zugegeben und 30 Sekunden geschüttelt. Nach einer Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit gelegentlichem Durchmischen wurde die an die „RNS-Matrix“ gebundene RNS pelletiert (1 Minute bei 1 500 x g) und der Überstand verworfen. Nach zweimaligem Waschen mit 500 µl „RNA wash solution“ und Zentrifugieren (1 Minute bei 1500 x g) wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 100 µl Aqua bidest./DEPC resuspendiert. Zur Eluierung der RNS wurde die Lösung für 5 Minuten bei 55°C inkubiert und anschließend die „RNS-Matrix“ erneut pelletiert (1 Minuten bei 14 200 x g). Nach Überführen des Überstandes in ein 0,5ml-Eppendorfgefäß wurde das Pellet verworfen. Um die „RNS-Matrix“ restlos zu entfernen, wurde die Lösung erneut zentrifugiert (1 Minuten bei 14 200 x g). Die Aufbewahrung der RNS erfolgte bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C.

3.7.2. Selektion der Primer

Da für den Schweinswal bisher keine Genom- bzw. mRNA-Sequenzen von Zytokinen veröffentlicht sind, musste bei der Auswahl der spezifischen Primer auf konservierte Nukleotidsequenzen anderer Zahnwale sowie terrestrischer Säugetiere zurückgegriffen werden. Aus Gensequenzen des Belugawals, Großen Tümmlers und Schwertwals wurden Primerpaare für IL-2, IL-4 und IL-6 selektiert (AF072870; AB020732; L46803; Tabelle 5).

Hierbei wurden folgende Kriterien berücksichtigt. Die Primerlänge sollte zwischen 18 bis 28 Basenpaare und der G/C-Gehalt zwischen 50 und 60% betragen. Weiterhin sollte die Schmelztemperatur (T_m) beider Primer übereinstimmen und zwischen 55°C und 80°C liegen [$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$]. Zur Verhinderung von Dimerbildungen dürfen die Primerpaare am 3'-Ende keine komplementären Sequenzen zueinander aufweisen. Zusätzlich sollten die Primer keine Palindromsequenzen enthalten (Rappolee, 1990). Die Selektion der Primer erfolgte unter Verwendung des Computerprogrammes "Primer designer" Version 2.0 (Scientific and Educational Software).

Für den Nachweis von TNF- α , TGF- β und IL-10 wurden kanine Primersequenzen aus der Literatur entnommen (Gröne et al., 1998, Z70046, L34956; Frisk et al., 1999; U33843; Tabelle 5).

Die Primersequenzen für den mRNA-Nachweis der Glyzeraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde ebenfalls der Literatur entnommen. Die Sequenz des Sense-Primers ist im Bereich von Exon 6 und der Antisense-Primer im Bereich von Exon 8 des humanen GAPDH-Gens lokalisiert (Gröne et al., 1996; BC014085; Tabelle 5).

Tabelle 5: Spezifische Primerpaare für den mRNS-Nachweis von IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β , TNF- α und GAPDH beim Schweinswal

Zytokin	Nukleotidsequenz (5'-3')	Richtung	Nukleotidposition	Erwartete Amplikonlänge [bp]
IL-2	GCA CCT ACT TCA AGC TCT AC	S	61-80 ^a	210
	TAG CAC ATC CTC CAG AGG TT	AS	270-251 ^a	
IL-4	GCA TGT ACC AGC AAC TTC GT	S	103-122 ^b	287
	TTG GCT TCA TTC ACA GAA CAG	AS	389-369 ^b	
IL-6	GCA AGG AGG CAC TGG CAG AA	S	219-238 ^c	383
	CCT CAG GCT GAA CTG CAG GA	AS	601-582 ^c	
IL-10	CCT GGG TTG CCA AGC CCT GTC	S	235-255 ^d	212
	ATG CGC TCT TCA CCT GCT CC	AS	446-427 ^d	
TNF α	CCA AGT GAC AAG CCA GTA GC	S	32-51 ^e	274
	TCT TGA TGG CAG AGA GTA GG	AS	305-286 ^e	
TGF β	TTC CTG CTC CTC ATG GCC AC	S	826-845 ^f	393
	GCA GGA GCG CAC GAT CAT GT	AS	1218-1199 ^f	
GAPDH	GCC AAA AGG GTC ATC ATC TC	S	1225-1244 ^g	228
	GGG GCC ATC CAC AGT CTT CT	AS	1452-1433 ^g	

bp=Basenpaare; S = Sense; AS = Antisense

^aAF072870 (IL-2); ^bAB020732 (IL-4); ^cL46803 (IL-6); ^dU33843 (IL-10); ^eZ70046 (TNF- α); ^fL34956 (TGF- β); ^gBC014085 (GAPDH)

3.7.3. Durchführung der reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die in Äthanol bei -80°C gelagerten RNS-Proben wurden vor Versuchsbeginn für 15 Minuten bei 1200 x g zentrifugiert und das entstandene Pellet nach dem Dekantieren des Überstandes für ca. 10 Minuten getrocknet und anschließend in 50 μ l Depc-H₂O resuspendiert. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur (Frisk et al., 1999).

3.7.3.1. DNase-Behandlung

Um sicherzustellen, dass mRNA und keine genomische DNA in der RT-PCR amplifiziert wurde, wurden alle Proben mit dem Enzym DNase behandelt, bevor sie in der RT-PCR eingesetzt wurden. Hierzu wurden in 0,5 µl-Eppendorfgefäßen je 3,3 µl DNase-Mastermix (Boehringer-Mannheim) zu 6,5 µl RNS gegeben (Tabelle 6). Die DNase-Behandlung wurde bei 27°C für 10 Minuten mit anschließender Inaktivierung der DNase bei 75°C für 5 Minuten in einem Thermocycler (Multicycler® PTC 200; Biozym) durchgeführt.

Tabelle 6: Herstellung des DNase-Mastermix

Menge	Reagenzien	Endkonzentration
1,0 µl	MnCl ₂ (10 mM)	1 mM
1,0 µl	10x PCR Puffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl)	1x (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl)
1,0 µl	DNase, RNase-frei (10 U/µl)	1 U/µl
0,3 µl	RNase-Inhibitor (20 U/µl)	1 U/µl
3,3 µl	DNase-Mastermix pro Probe	

3.7.3.2. Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion

Das Umschreiben der Gesamt-RNS in cDNS erfolgte in einer reversen Transkriptase-Reaktion. Hierbei wurden 1,5 μl der DNase-behandelten RNS-Probe mit 8,5 μl RT-Mastermix ("Gen Amp PCR core kit"; Applied Biosystems) bei 21°C für 8 Minuten, bei 42°C für 15 Minuten, bei 96°C für 5 Minuten und bei 5°C für 5 Minuten im Thermocycler inkubiert (Tabelle 7).

Tabelle 7: Herstellung des RT-Mastermix

Menge	Reagenzien	Endkonzentration
2 μl	MgCl ₂ (25 mM)	5 mM
1 μl	10xPCR Puffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl)	1x (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl)
1 μl	dGTP (10 mM)	1 mM
1 μl	dATP (10 mM)	1 mM
1 μl	dTTP (10 mM)	1 mM
1 μl	dCTP (10 mM)	1 mM
0,5 μl	RNase Inhibitor (20 U/ μl)	1 U/ μl
0,5 μl	Reverse Transkriptase (50 U/ μl)	2,5 U/ μl
0,5 μl	Random Hexamers (50 μM)	2,5 μM
8,5 μl	RT-Mastermix pro Probe	

dGTP = Desoxyguanosintriphosphat
dTTP = Desoxythymidintriphosphat

dATP = Desoxyadenosintriphosphat
dCTP = Desoxycytidintriphosphat

3.7.3.3. Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung der spezifischen cDNS erfolgte unter Verwendung der jeweiligen Primer in der Polymerase-Kettenreaktion. Jeweils 10 μ l cDNS aus der RT wurden mit dem PCR-Mastermix ("Gen Amp PCR core kit"; Applied Biosystems) gemischt und in die PCR eingesetzt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Herstellung des PCR-Mastermix

Menge	Reagenzien	Endkonzentration
2,0 μ l	MgCl ₂ (25 mM)	5 mM
4,0 μ l	10xPCR Puffer-II (500 m KCl, 100 mM Tris-HCl)	1x 50 mM, 10 mM
32,75 μ l	Depc-H ₂ O	
0,5 μ l	Sense-Primer (15 μ M)	0,15 μ M
0,5 μ l	Antisense-Primer (15 μ M)	0,15 μ M
0,25 μ l	Ampli Taq [®] Polymerase (5 U/ μ l)	0,025 U/ μ l
40 μ l	PCR-Mastermix pro Probe	

Folgende Reaktionszeiten und –temperaturen wurden gewählt: Initiale Denaturierung für eine Minute bei 94°C, Primeranlagerung ("annealing") für zwei Minuten bei 59°C und Kettenverlängerung ("extension") für eine Minute bei 72°C. Diese Abfolge wurde in 40 Zyklen wiederholt. Abschließend wurde nach dem letzten Zyklus eine Kettenverlängerung für 5 Minuten bei 72°C durchgeführt (Frisk et al., 1999).

3.7.3.3.1. Gelelektrophorese

Die Amplifikate wurden nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem Agarose-Gel sichtbar gemacht. Hierbei wandern die DNS-Fragment im elektrischen Feld aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe der DNS-Moleküle sowie von der Porengröße des Gels ab. In den DNS-Doppelsträngen interkaliertes Ethidiumbromid wurde anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht. Für die elektrophoretische Auftrennung wurde ein 2%iges horizontales Agarose-Gel (Ultra Pure[™], Gibco-BRL) mit 0,25 μ g/ml Ethidiumbromid (Boehringer-Mannheim) verwendet.

Insgesamt 15 μ l des PCR-Produktes wurden mit 3 μ l Laufpuffer (Advanced Biotechnologies) vermischt und in die Taschen des Gels gegeben. Ein 100-bp-DNS-Standard diente in jedem Lauf als Längenkontrolle des Amplikons. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 6 V/cm bei einer maximalen Stromstärke von 500 mV (Mikrocomputer Elektrophoresis Power Supply) für 24 Minuten. Die DNS-Bande wurde auf einem UV-Transilluminator (Vilber Lourmat) sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert (Polaroid A 667-Tageslichtfilm).

3.7.3.3.2. DNS-Sequenz-Analyse und Homologievergleich

Die Sequenzen von IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β , TNF- α und GAPDH des Schweinswales wurden von der Firma SEQLAB (Göttingen) ermittelt. Unter Verwendung der spezifischen Primerpaare wurden beide DNS-Stränge der Amplifikate durch die „fluorescence dye terminator“-Technologie mittels eines ABI PRISM[®] Sequenzers (Applied Biosystems GmbH) sequenziert.

Unter Anwendung des Computerprogramms „ALIGN Plus“ Version 2.0 (Scientific and Educational Software) wurden die ermittelten Nukleinsäuresequenzen der Schweinswale mit veröffentlichten Sequenzen der NCBI-Gendatenbank des Großen Tümmlers (IL-4: AB020732; TNF- α : AB049358), des Schwertwales (IL-2: AF009570; IL-6: L46803; IL-10: U93260), des Belugawals (IL-2: AF072870; IL-6: AF076643; TNF- α : AF320323), des Pferdes (IL-2: X69393; IL-4: AF305617; IL-6: AF041975; IL-10: U38200; TGF- β : X99438; TNF- α : AB035735; GAPDH: AF157626), des Rindes (IL-2: M12791; IL-4: M77120; IL-6: X57317; IL-10: U00799; TGF- β : M36271; TNF- α : Z48808; GAPDH: U85042), des Schafes (IL-2: X60148; IL-4: AF172168 ;IL-6: X62501; IL-10: U11421; TGF- β : X76916; TNF- α : X56756; GAPDH: AF030943), des Schweines (IL-2: X58428; IL-4: X68330; IL-6: M80258; IL-10: L20001; TGF- β : X12378; TNF- α : X57321; GAPDH: AF202970), der Maus (IL-2: NM_008366; IL-4: NM_021283; IL-6: NM_033168; IL-10: NM_010548; TGF- β : NM_011577; TNF- α : NM_013693; GAPDH: NM_008084), des Hundes (IL-2: AF091131; IL-4: AF239917; IL-6: AF275796; IL-10: U33843; TGF- β : L34956; TNF- α : Z70046; GAPDH: U31247), der Kegelrobbe (IL-2: AF072871) und des Seehundes (IL-6: L46802) verglichen und der prozentuale Anteil an homologen Abschnitten kalkuliert.

3.7.3.4. Echtzeit-PCR

Zur Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der Zytokin-Expression und der lymphatischen Depletion wurden die mRNS-Mengen von IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β und TNF- α in Milz, Thymus und Blut von insgesamt 29 Schweinswalen mittels semiquantitativer Echtzeit-PCR ermittelt (Tabelle 4).

Die Echtzeit-PCR wurde mittels eines LightCyclers[®] (Roche Diagnostics) durchgeführt. Als Reaktionsgemisch wurde "LightCycler FastStart DNA Master SYBR-Green I" (Roche Diagnostics), bestehend aus dNTPs, MgCl₂, dem Fluoreszenzfarbstoff „SYBR-Green“ und einer Heißstart-DNS-Polymerase, verwendet. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Tabelle 9).

Tabelle 9: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Echtzeit-PCR

Menge	Reagenzien	Endkonzentration
11,8 μ l	Depc-Aqua bidest.	
3,2 μ l	MgCl ₂ (25 mM)	5 mM
2 μ l	10x LightCycler Faststart DNA Master SYBR Green	1x

Die Kapillaren (LightCycler Capillaries, Roche Diagnostics) wurden mit jeweils 17 μ l des Reaktionsansatzes zusammen mit 1 μ l Primervormischung (15 pmol/ μ l) und 2 μ l des Produktes aus der RT-Reaktion gefüllt. Anschließend wurde der gesamte Ansatz durch Zentrifugation (5 Sekunden, 700 x g) in den Kapillaren positioniert und gemischt. Die Kapillaren wurden in das Rondell des LightCyclers[®] eingesetzt. Die Herstellung des Reaktionsansatzes erfolgte auf Eis. Das Bestücken der Kapillaren wurde unter Verwendung eines vorgekühlten Aluminiumblocks (4°C) durchgeführt (Markus et al., 2002).

3.7.3.4.1. Reaktionsphasen der Echtzeit-PCR

Zur Aktivierung der Heißstart-DNS-Polymerase wurde der Reaktionsansatz in einer initialen Denaturierungsphase für 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Die Denaturierung während der PCR-Zyklen erfolgte für alle Proben bei 95°C für 15 Sekunden. Die Anlagerungszeiten und-

temperaturen wurden empirisch ermittelt (Tabelle 10). Zur Verringerung einer möglichen Primer-Dimer-Bildung wurde für GAPDH und IL-10 die Methode der „touchdown-PCR“ verwendet (Tabelle 10). Durch eine anfänglich hohe Anlagerungstemperatur wurde hierbei die Spezifität der Primerbindung an den Matrixstrang erhöht. Um dennoch eine ausreichende Sensitivität der PCR zu gewährleisten, wurde die Anlagerungstemperatur der Primer im Verlauf der PCR um 0,7°C bzw. 0,5°C pro Zyklus bis zur eigentlichen Anlagerungstemperatur abgesenkt. Die Elongationszeit wurde anhand der Länge des Amplikons berechnet (Länge des Amplikon [bp] /25 = Elongationszeit [s]). Für die PCR wurden Läufe von 50 Zyklen verwendet. Die Fluoreszenz des „SYBR-Greens“ in den entstandenen DNS-Doppelsträngen wurde nach jedem Zyklus im Anschluss an die Elongationsphase (72°C) bei einer Wellenlänge von 530 nm gemessen. Die Temperaturänderungen aller Phasen der PCR wurden mit einer maximalen Geschwindigkeit von 20°C/Sekunde durchgeführt.

Die Spezifität der PCR-Produkte wurde durch die Schmelzkurvenanalyse bestätigt. Im direkten Anschluss an die PCR wird hierbei die Temperatur von 65°C auf 95°C (bzw. auf 98°C für TGFβ) erhöht und die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Durch die Dissoziation der DNS-Doppelstränge und das Freiwerden des Farbstoffs „SYBR-Green“ kommt es zur abnehmenden Fluoreszenz der Probe. Der für jedes PCR-Produkt spezifische Schmelzpunkt ist definiert als die Temperatur, an der 50% der DNS als Doppelstränge vorliegen. Der Schmelzpunkt hängt hauptsächlich vom GC-Gehalt und der Länge des Fragmentes ab.

Tabelle 10: Temperaturen und Dauer der Phasen pro PCR-Zyklus

Zytokin/ Haushaltsgen	Denaturierung [°C/sek]	„Touchdown“ °C ¹ -°C ²	Anlagerung [C°/sek]	Elongation [°C/sek]
IL-2	95/15	-	58/10	72/16
IL-4	95/15	-	57/8	72/12
IL-6	95/15	-	60/6	72/14
IL-10	95/15	69-58	58/6	72/15
TGF-β	95/15	-	66/6	72/17
TNF-α	95/15	-	58/8	72/16
GAPDH	95/15	69-61	61/6	72/12

°C¹ = Anfangstemperatur, °C² = Endtemperatur
 - = ohne "Touchdown", sek = Sekunde

3.7.3.4.2. Quantifizierung mit externem Standard

Die Ausgangsmenge in den Proben wurde automatisch durch die LightCycler® Software (Version 3.5) mittels des „Fit point“-Algorithmus semi-quantitativ errechnet. Hierbei extrapoliert das Computerprogramm in der exponentiellen Phase der PCR anhand einer gewählten Anzahl von Kurvenpunkten (i.d.R. zwei Kurvenpunkte) auf den C_T-Wert der Probe. Dieser ist definiert als die Zyklenzahl, bei der sich die Fluoreszenz der Probe zum ersten Mal über die unspezifische Hintergrundfluoreszenz erhebt und ist spezifisch für die Ausgangskonzentration der gesuchten cDNS in der Probe. Da bei der „Fit point“-Methode die Grenze der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz zur spezifischen Probenfluoreszenz als sogenannte „crossing line“ manuell festgelegt wird, ergibt sich der C_T-Wert einer Probe aus dem Kreuzungspunkt der Steigungsgeraden der PCR-Kurve in der exponentiellen Phase und der „crossing line“. Die Menge der Ziel-cDNS wurde anschließend anhand einer externen Standardkurve von der LightCycler®-Software errechnet und in Fluoreszenzeinheiten („Units“; U) angegeben. Hierfür wurde für jedes Zytokin und GAPDH eine dreifache Verdünnungsreihe hergestellt (25, 50, 100 ng RNS/μl aus Con A-stimulierten Lymphozyten). Der relative Gehalt an Zytokin-mRNS wurde als das Verhältnis zwischen der Zytokin-mRNS und mRNS des Haushaltsgens GAPDH ausgedrückt (Markus et al., 2002).

$$\%GAPDH = \frac{\text{Fluoreszenzeinheiten der Zytokin-mRNS}}{\text{Fluoreszenzeinheiten der GAPDH-mRNS}} \times 100$$

3.8. Analyse und Quantifizierung organischer Schadstoffe

Die toxikologischen Analysen wurden im Rahmen des Forschungsprojektes des Umweltbundesamtes (FE-Vorhaben 299 65 221) am Institut für Ostseeforschung der Universität Rostock (Prof. Dr. M. McLachlan) durchgeführt.

Verschiedene organische Schadstoffe wurden im Fettgewebe der Schweinswale mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie gemessen. Es wurden Schadstoffklassen ausgewählt, die entweder im Verdacht stehen, besonders toxisch auf Meeressäuger zu wirken

oder in vergleichsweise hohen Konzentrationen in Meeressäugern vorkommen: polychlorierte Biphenyle (PCB), polybromierte Diphenylether (PBDE), Toxaphen, sowie *p,p'*-Dichlordiphenyl-dichlorethen (DDT) und dessen Hauptmetabolit *p,p'*-Dichlordiphenyl-trichlorethan (DDE). Für die komplexen Stoffgemische erfolgte die Auswertung auf der Basis der Summe von ausgewählten Kongeneren: PCB: IUPAC # 99, 149, 138, 153, 180, 187. PBDE: IUPAC # 47, 99, 100, 153, 154. Toxaphen: Parlar # 26, 40, 42, 44, 50 (Anhang 3).

Der PCB-, DDT- und DDE-Gehalt wurde in jeweils 59 Proben gemessen. Weiterhin wurden die PBDE- und Toxaphen-Konzentrationen im Fettgewebe von 52 bzw. 53 Schweinswalen quantifiziert (Anhang 3).

Zur Abschätzung der Toxizität von chlorierten Kohlenwasserstoffen wird das internationale Konzept der Toxizitätsäquivalente (TEQ) angewendet. Dabei wird die Toxizität der einzelnen Substanzen mittels Toxizitätsfaktoren (TEF) relativ zum 2,3,7,8 TCDD angegeben (Tryphonas, 1994). In früheren Schadstoffanalysen von Schweinswalen der Nord- und Ostsee stellte das Kongener CB118 mit ca. 60% an der Gesamttoxizität (Σ TEQ) das wichtigste Kongener in der Risikoabschätzung dar (Bruhn et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden die TEQ auf der Basis des CB118 errechnet (Anhang 3).

3.9. Statistische Auswertung

Die Datenauswertung erfolgte an den Rechnern der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches Tiermedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die statistische Auswertung wurde unter Verwendung des Statistikprogrammes BMDP/Dynamic, Release 7.0 (Dixon, 1993) durchgeführt.

Die statistischen Zusammenhänge der Veränderungen der Lymphozyten-Subpopulationen und der Zytokin-Expression in Milz und Thymus wurde durch die Rangkorrelationsanalyse nach Spearman ermittelt. Die statistischen Zusammenhänge zwischen den morphologischen Veränderungen in Milz und Thymus (Anhang 1) und der Schadstoffbelastung (Anhang 3) wurde zusätzlich anhand der schrittweisen logistischen polytomen Regression ermittelt. Da bei den ermittelten Werten keine Normalverteilung vorlag, wurden nicht die arithmetischen Mittelwerte, sondern die Mediane bestimmt.

Zur statistischen Auswertung des Lymphozytenstimulationstests von vier klinisch gesunden Schweinswalen zur Ermittlung der optimalen Mitogenkonzentrationen (Con A, PHA, PWM) anhand des Stimulationsindex wurde bei den normal verteilten Merkmalen eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung durchgeführt.

Die Signifikanz wurde entsprechend den Standardkriterien berechnet:

$p > 0,05$ nicht signifikant

$p \leq 0,05$ schwach signifikant

$p \leq 0,01$ signifikant

$p \leq 0,001$ hochsignifikant

4. Ergebnisse

4.1. Etablierung der Methoden zur Untersuchung des Immunsystems der Schweinswale

4.1.1. Immunhistologische Untersuchungen über die Kreuzreaktivität verschiedener Lymphozytenmarker unterschiedlicher Spezies zur Charakterisierung lymphatischer Gewebe des Schweinswales

Kanine (n=13), humane (n=1), bovine (n=6), equine (n=1) und walspezifische (n=4) monoklonale Antikörper sowie ein monoklonaler und ein polyklonaler, gegen das intrazytoplasmatische ϵ -Peptid des CD3-Antigens gerichteter Antikörper wurden auf ihre Kreuzreaktivität mit Lymphozyten in Lymphknoten, Thymus, Milz und Tonsillen der Schweinswale untersucht. Zusätzlich wurden die optimalen Konzentrationen zur Darstellung der Lymphozyten-Subpopulationen ermittelt. Verschiedene T-Zellkompartimente, wie der Parakortex der Lymphknoten, die interfollikuläre Region der Tonsillen und Lymphknoten, die periarteriöläre lymphatische Scheide der Milz (PALS) sowie Medulla und Kortex des Thymus und die B-Zellareale der lymphatischen Organe wurden hierbei unterschieden.

Acht monoklonale Antikörper (vier walspezifische, ein kaniner, ein boviner, ein equiner und der CD3 ϵ -spezifische mAκ) sowie der humane polyklonale Anti-CD3-Antikörper reagierten mit lymphatischen Zellen in Gefrierschnitten des Schweinswales (Tabelle 11). CD3⁺-Zellen wurden mit dem monoklonalen (Klon CD3-12) und polyklonalen Antikörper (A0452) immunhistologisch markiert. Das CD3-Antigen wurde durch alle thymustämmigen Zellen, inklusive derer in der interfollikulären Region der Tonsillen (Abbildung 3), der interfollikulären Region und des Parakortex der Lymphknoten und der PALS exprimiert (Abbildung 4). Weiterhin fanden sich einzelne Lymphozyten in der roten Pulpa und Mantelzone der Milz sowie in den Follikeln, welche das Molekül bilden. Die meisten Thymozyten zeigten eine CD3 ϵ -spezifische, membrangebundene Reaktion, jedoch fanden sich einzelne unmarkierte, follikelähnliche Areale im Thymusmark.

Die zwei walspezifischen Antikörper (Klon F21 I2 D3 und Klon F21 C2 D3) erkannten das CD2-Homolog auf Lymphozyten des Schweinswales. Eine spezifische Markierung lymphatischer Zellen fand sich in der interfollikulären Region der Tonsillen, der interfollikulären Region und des Parakortex der Lymphknoten (Abbildung 5) sowie in der PALS. Zusätzlich fanden sich einzelne CD2-exprimierende Zellen in der roten Pulpa und

Mantelzone der Milz sowie in den Follikeln der lymphatischen Organe. Die meisten Thymozyten wiesen eine Kreuzreaktivität mit den beiden Antikörpern auf, jedoch fanden sich in der Medulla einzelne follikelähnliche Areale mit CD2-negativen Zellen.

Auf Gefrierschnitten zeigte der walspezifische Anti-CD45R-Antikörper (Klon F21 H2 E10) eine ausgeprägte Immunreaktivität in den Follikeln der Lymphknoten, Tonsillen und der Milz. Im Vergleich wiesen die T-Zellareale eine geringere Intensität der Markierung auf (Abbildung 6). In CD45R⁺-follikelähnlichen Lymphozyten-Ansammlungen im Thymusmark lag ebenfalls eine deutliche Immunreaktivität vor (Abbildung 7).

Das MHC Klasse II-Antigen wurde mit dem bovinen (Klon 171 D3) und walspezifischen mAK (Klon F21 K6 B6) nachgewiesen. Die meisten Lymphozyten in den B- und T-Zellkompartimenten zeigten eine MHC Klasse II-Expression. Jedoch fanden sich im Kortex des Thymus einzelne Ansammlungen von MHC Klasse II-negativen Zellen. Der kanine MHC Klasse II-Marker (Klon Dog 26-1) erkannte Lymphozyten in den Follikeln (Abbildung 8), einzelne Thymozyten sowie Zellen mit zytoplasmatischen Ausläufern in der Thymusrinde und der PALS, welche Antigen-präsentierenden Zellen entsprachen. Zusätzlich fanden sich follikelähnliche Ansammlungen von MHC Klasse II-exprimierenden Lymphozyten im Thymusmark.

Der equine Pan-Leukozytenmarker wies eine membrangebundene Reaktion mit fast allen lymphatischen Zellen in den B- und T-Zellkompartimenten auf.

Der walspezifische, gegen das CD45R-Antigen gerichtete mAK (Klon F21 H2 E10) und der humane polyklonale Anti-CD3-Antikörper zeigten eine Immunreaktivität auf Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Gewebe (Verdünnung 1:100). Die anderen Antikörper wiesen keine Kreuzreaktivität bei dieser Fixierungs- und Einbettungstechnik auf.

- Abbildung 3: Tonsille. Gefrierschnitt. CD3ε-spezifische Reaktion der meisten Lymphozyten in der interfollikulären Region und einzelner Zellen im Follikel. F=Follikel; IFR=interfollikuläre Region; E=Epithel. Primärantikörper, Klon CD3-12; ABC-Methode, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Balken=90µm.
- Abbildung 4: Milz. Gefrierschnitt. CD3ε-spezifische Reaktion der meisten Lymphozyten in der PALS und einzelner Zellen im Follikel. F=Follikel; PALS=periarterioläre lymphatische Scheide; *=Zentralarterie. Primärantikörper, Klon CD3-12; ABC-Methode, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Balken=90µm.
- Abbildung 5: Lymphknoten. Gefrierschnitt. CD2-spezifische, membrangebundene Reaktion der meisten Lymphozyten in der interfollikulären Region und einzelner Zellen im Follikel. F=Follikel; IFR=interfollikuläre Region. Primärantikörper, Klon F21 I2 D3; ABC-Methode, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Balken=90µm.
- Abbildung 6: Milz. Gefrierschnitt. CD45R-spezifische, membrangebundene Reaktion von Lymphozyten im Follikel und einzelner Zellen in der roten Pulpa. Verminderte Immunreaktion der Lymphozyten in der PALS. F=Follikel; PALS=periarterioläre lymphatische Scheide; *=Zentralarterie. Primärantikörper, Klon F21 H2 E10; ABC-Methode, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Balken=90µm.
- Abbildung 7: Thymus. Gefrierschnitt. Verteilung CD45R⁺-Zellen im Thymus. Follikelartige Struktur in der Medulla mit prominenter, membrangebundener Immunreaktion (Pfeil). Primärantikörper, Klon F21 H2 E10; ABC-Methode, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Balken=90µm.
- Abbildung 8: Tonsille. Gefrierschnitt. Deutliche Expression des MHC Klasse II-Antigens im Follikel, markiert mit dem kaninen MHC Klasse II-mAK (Klon Dog 26-1). F=Follikel; IFR=interfollikuläre Region; E=Epithel. ABC-Methode, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Balken=90µm.

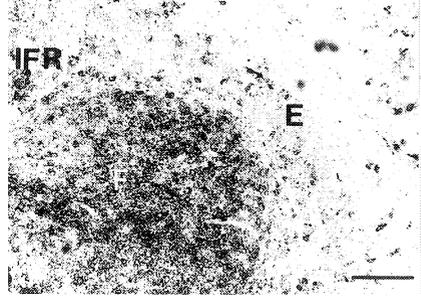
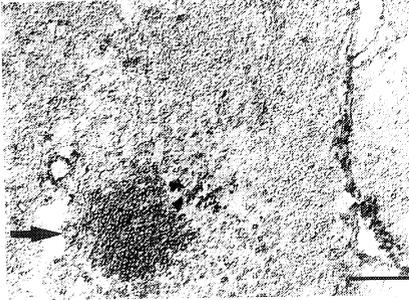
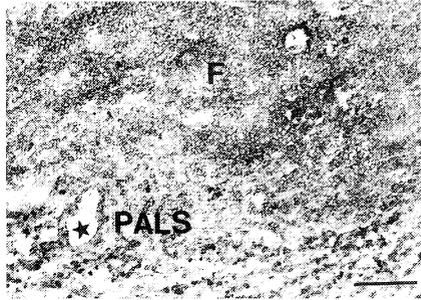
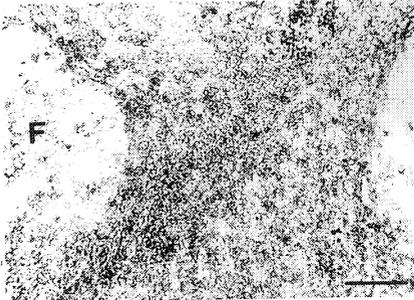
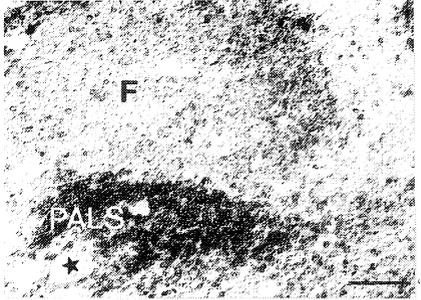
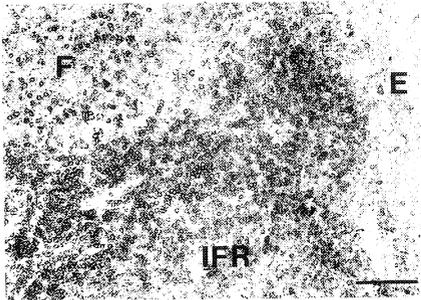


Tabelle 11: Antigen, Bezeichnung, Spezies-Spezifität, Herkunftsspezies der monoklonalen und polyklonalen Antikörper sowie Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen der Kreuzreaktivität und optimale Antikörperverdünnungen auf Gefrierschnitten

Antigen	Klon/ Antiserum	Spezies-Spezifität	Herkunftsspezies	Antikörper- Verdünnung	Kreuzreaktivität	Referenz
MHC II	F21 K2 B6	Schwertwal	m	1: 10	+	Dr. J. Stott [†]
CD2	F21 I2 D3	Schwertwal	m	1: 200	+	Dr. J. Stott [†]
CD2	F21 C2 D3	Schwertwal	m	1: 10	+	Dr. J. Stott [†]
CD45R	F21 H2 E10	Schwertwal	m	1: 400	+	Dr. J. Stott [†]
Pan-Leukozyten	F6B	Pferd	r	1: 100	+	Dr. J. Stott [†]
CD8	CC 63	Rind	m	1: 10	-	Dr. J. Stott [†]
MHC II	171 D3	Rind	m	1: 400	+	Dr. J. Naessens [‡]
CD2	IL-A 43	Rind	m	1: 10	-	Dr. J. Naessens [‡]
CD4	IL-A 11	Rind	m	1: 10	-	Dr. J. Naessens [‡]
CD8 α	IL-A 105	Rind	m	1: 10	-	Dr. J. Naessens [‡]
CD21	IL-A 65	Rind	m	1: 10	-	Dr. J. Naessens [‡]
CD3 ϵ	CD3-12	Weiß*	r	1: 100	+	Connex [§]
CD8 α	Dog 10-1-1	Hund	m	1: 10	-	Dr. C. Vogl [¶]
MHC II	Dog 12-1	Hund	m	1: 10	-	Dr. C. Vogl [¶]
Thy-1	Dog 14-2	Hund	r	1: 10	-	Dr. C. Vogl [¶]
Granulozyten + Monozyten	Dog 15-7	Hund	r	1: 10	-	Dr. C. Vogl [¶]
CD5	Dog 17-4-8	Hund	r	1: 10	-	Dr. C. Vogl [¶]
T-Zellrezeptor	Dog 18-6	Hund	m	1: 10	-	Dr. C. Vogl [¶]
T-Lymphozyten	Dog 19-3	Hund	m	1: 10	-	Dr. C. Vogl [¶]
CDw41	Dog 20-4	Hund	m	1: 10	-	Dr. C. Vogl [¶]
Reife T- + B-Lymphozyten	Dog 24-8	Hund	m	1: 10	-	Dr. C. Vogl [¶]
MHC II	Dog 26-1,	Hund	r	1: 10	+	Dr. C. Vogl [¶]
CD45	Dog 32-2,	Hund	r	1: 10	-	Dr. C. Vogl [¶]
CD45R	Dog 35-4	Hund	r	1: 10	-	Dr. C. Vogl [¶]
CD4	YKIX 302.9.3.7	Hund	r	1: 10	-	Dr. S. Coobold ^{¶¶}
CD45	2B11	Mensch	r	1: 100	-	Dako Diagnostika ^{**}
CD3	A 0452 (pAK)	Mensch	kan	1: 100	+	Dako Diagnostika ^{**}

r = Ratte; m = Maus; kan = Kaninchen; + = positive Reaktion; - = negative Reaktion; pAK = polyklonaler Antikörper.

* weitreichende Spezies-übergreifende Kreuzreaktivität

[†]University of California Davis, Davis, CA, USA

[‡]International Livestock Research Institute, Nairobi, Kenia

[§]GSP-National Research Center for Environment and Health, München, Deutschland

[¶]University of Cambridge, UK

^{¶¶}München, Deutschland

^{**}Hamburg, Deutschland

4.1.2. Ermittlung der optimalen Mitogenkonzentrationen für den Lymphozytenstimulationstest (LST)

Die optimalen Konzentrationen von Concanavalin A (Con A), Phytohämagglutinin (PHA) und „pokeweed mitogen“ (PWM) für die Stimulation von peripheren Blutlymphozyten wurden anhand der Blutproben von vier klinisch gesunden Schweinswalen aus dem Fjord- und Beltcenter in Kerteminde (Dänemark; n=2) und dem Dolfinarium Harderwijk (Niederlande; n=2) ermittelt.

4.1.2.1. Leukozytenisolierung

Die Isolierung der Leukozytenfraktion aus heparinisierten Vollblutproben erfolgte durch die einstufige Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll®. Der durchschnittliche Lymphozytenanteil von 58,1% (Standardabweichung [SD] = 9,2%) im Blut konnte auf 94,1% (SD = 4,5%) angereichert werden. Weiterhin wurde durch das Verfahren der Anteil an neutrophilen und eosinophilen Granulozyten von durchschnittlich 41,4% (SD = 16,4%) bzw. 6,2% (SD = 2,0%) im Blut auf 3,2% (SD = 4,5%) bzw. 0,6% (SD = 0,5%) im Versuchsansatz reduziert (Abbildungen 9, 10 und 11). Der Anteil an basophilen Granulozyten und Monozyten blieb vergleichsweise konstant. Jedoch fand sich bei einem Schweinswal (SW-4) eine deutliche Verminderung der basophilen Granulozyten von 15,4% auf 0,0% (Tabelle 12).

Tabelle 12: Differenzialblutbild und Zusammensetzung der Leukozytenfraktion nach der einstufigen Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll®

	Lymphozyten		neutr. Granul.		eosin. Granul.		baso. Granul.		Monozyten	
	[%]		[%]		[%]		[%]		[%]	
	Blut	Zytospin	Blut	Zytospin	Blut	Zytospin	Blut	Zytospin	Blut	Zytospin
SW-1	59,0	91,5	46,0	3,4	9,0	0,9	0,0	0,9	1,0	2,6
SW-2	59,0	98,0	43,0	5,7	6,0	0,0	0,0	0,9	3,0	0,9
SW-3	68,3	97,5	18,8	0,0	5,4	1,0	2,0	0,0	5,4	1,5
SW-4	46,0	89,0	58,0	3,8	4,4	0,5	15,4	0,0	2,2	6,7

neutr.=neutrophile; eosin.=eosinophile; baso.=basophile; Granul.=Granulozyten

Abbildung 9: Lymphozyt, Monozyt und stabkerniger neutrophiler Granulozyt im peripheren Blut; May-Grünwald-Giemsa; Balken= $10\mu\text{m}$.

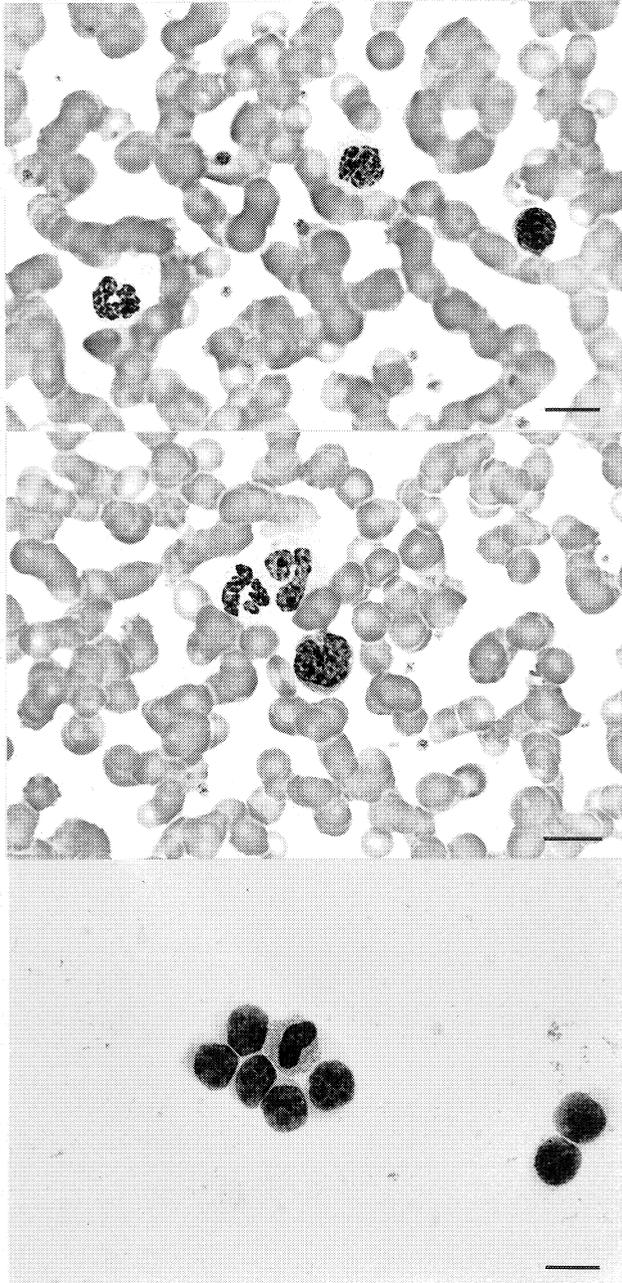
Abbildung 10: Monozyt und zwei segmentkernigen neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut; May-Grünwald-Giemsa; Balken= $10\mu\text{m}$.

Abbildung 11: Sieben Lymphozyten und ein Monozyt nach einstufige Dichtegradzentrifugation mit Percoll[®]. Zytozentrifugenpräparat; May-Grünwald-Giemsa; Balken= $10\mu\text{m}$.

9

10

11



4.1.2.2. Mitogene

Die T-Zellmitogene Con A und PHA stellten die effektivsten Mitogene dar, während das T-Zell-abhängige B-Zellmitogen PWM eine vergleichsweise niedrige, jedoch ebenfalls signifikante Proliferation peripherer Blutlymphozyten induzierte. Con A bewirkte die höchsten Zellproliferationen bei einer Mitogenkonzentration von $2\mu\text{g/ml}$ im Versuchsansatz. Der Mittelwert (\bar{x}) der maximalen Stimulationsindizes (SI) lag bei 330 (Standardabweichung [SD] = 70; $p = 0,0003$; Abbildung 12).

Für PHA und PWM konnten die maximalen Stimulationen bei einer Konzentration von jeweils $5\mu\text{g/ml}$ im Versuchsansatz erzielt werden. Die Mittelwerte (\bar{x}) der SI lagen bei 350 (SD = 100; $p = 0,0017$; Abbildung 13) bzw. 290 (SD = 70; $p = 0,0149$; Abbildung 14). Im Auflichtmikroskop fanden sich bei diesen Konzentrationen mit allen drei Mitogenen eine deutliche Zellakkumulation sowie die Ausbildung von blastoiden Lymphozyten. Konzentrationen von $0,01\mu\text{g/ml}$ im Versuchsansatz führten bei keinem der untersuchten Mitogene zu einer Steigerung der Zellproliferation bzw. einer sichtbaren Lymphozyten-Akkumulation. Mitogenkonzentrationen von $100\mu\text{g/ml}$ führten zu einer Degeneration bzw. Nekrose der Lymphozyten.

Abbildung 12: Concanavalin A (Con A); Proliferation von peripheren Blutlymphozyten nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden ($n=4$). $\bar{x} \pm \text{SD}$

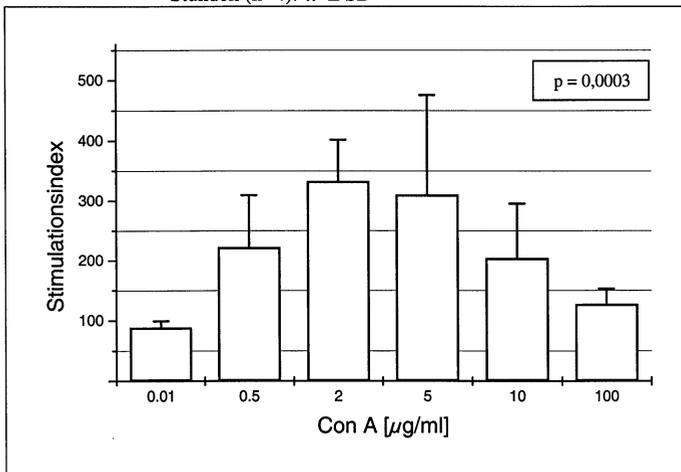


Abbildung 13: Phytohämagglutinin (PHA); Proliferation von peripheren Blutlymphozyten nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden (n=4). $\bar{x} \pm SD$

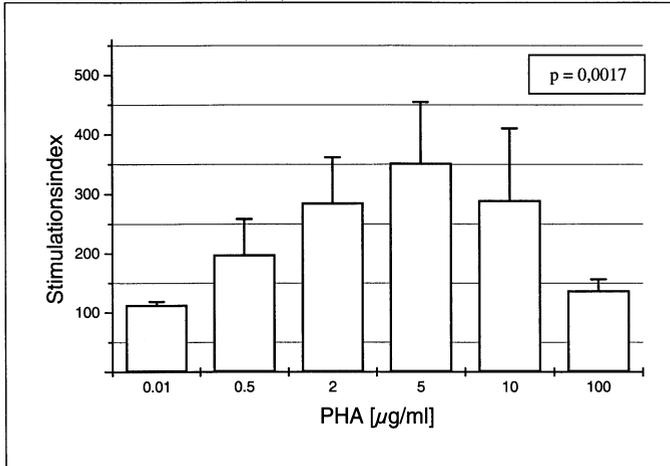
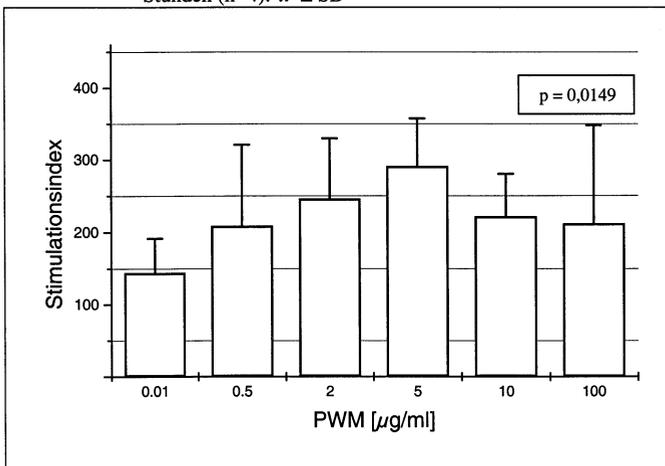


Abbildung 14: „Pokeweed mitogen“ (PWM); Proliferation von peripheren Blutlymphozyten nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden (n=4). $\bar{x} \pm SD$



4.1.3. Beurteilung der Zytokin-mRNS-Expression in peripheren Blutlymphozyten mittels konventioneller RT-PCR

Die mRNSs verschiedener pro- und anti-inflammatorischer Zytokine sowie des Haushaltsgens GAPDH wurden mittels RT-PCR detektiert. Die Untersuchungen stellten die Grundlage für die qualitative und semiquantitative Zytokin-mRNS-Messung mittels der Echtzeit-RT-PCR dar. Zusätzlich wurden die Nukleinsäuresequenzen der Zytokine und GAPDH in ausgewählten Fällen durch Sequenzierung der PCR-Produkte ermittelt.

Die cDNS von GAPDH wurde sowohl in unstimulierten als auch in Mitogen-stimulierten Lymphozyten amplifiziert. Mit Ausnahme von IL-10 konnten in unstimulierten Lymphozyten keine Zytokine nachgewiesen werden. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden fand sich in Con A-, PHA- und PWM-stimulierten Lymphozyten die mRNS von IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α und TGF- β . Hingegen lag die mRNS von IL-2 nur nach der Stimulation mit Con A und PWM vor. Durch die elektrophoretische Auftrennung wurden die Basenpaarlängen der PCR-Produkte ermittelt und mit den erwarteten Amplikonlängen verglichen (Tabelle 5). Hierbei zeigten die spezifischen Banden der ausgewählten Zytokine und GAPDH deutliche Übereinstimmungen mit den erwarteten Fragmentlängen (Abbildung 15).

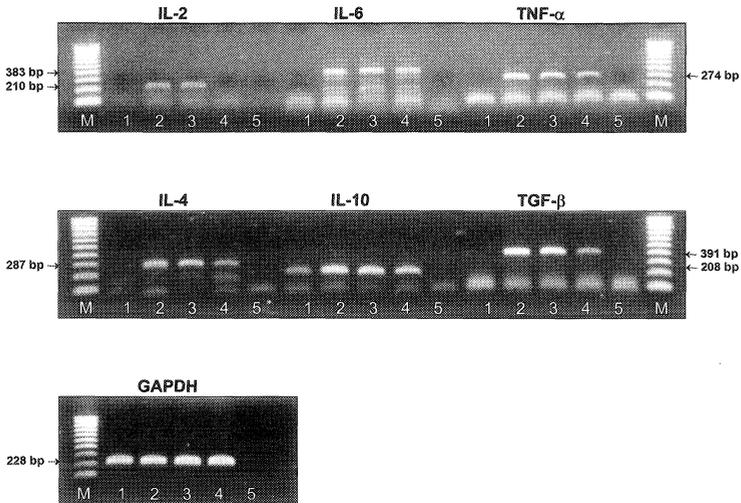


Abbildung 15: Ethidiumbromid-gefärbte Agarose-Gele. Amplifikation der cDNS verschiedener pro- und anti-inflammatorischer Zytokine und GAPDH aus unstimulierten und Mitogen-stimulierten, peripheren Blutlymphozyten nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden. 1: unstimulierte Zellen; 2: Con A-stimulierte Zellen; 3: PWM-stimulierte Zellen; 4: PHA-stimulierte Zellen; 5: Negativkontrolle/H₂O; M: 100bp-Leiter; bp: Basenpaare. (IL-2=210bp; IL-4=287bp; IL-6=383bp; IL-10=208bp; TGF-β=391bp; TNF-α=274bp; GAPDH=228bp)

Die ermittelten Nukleotidsequenzen der verschiedenen Zytokin- und GAPDH-mRNAs wurden in der NCBI-Gendatenbank unter den folgenden "accession numbers" hinterlegt (Tabelle 13). Die Sequenzlängen von IL-2, IL-4, IL-6, TNF-α und GAPDH stimmten mit den erwarteten Basenpaarlängen überein. Die PCR-Produkte von IL-10 und TGF-β unterschieden sich von den erwarteten Basenpaarlängen um 4 bzw. 2 Basenpaare.

Tabelle 13: In der NCBI-Gendatenbank hinterlegte cDNS-Sequenzen vom Schweinswal

Nukleotidsequenz	Länge des Amplikon	„Accession number“
IL-2	210bp	AF 346296
IL-4	287bp	AF 346295
IL-6	383bp	AF 346297
IL-10	208bp	AF 346294
TGF- β	391bp	AF 346299
TNF- α	274bp	AF 346298
GAPDH	228bp	AF 346300

Die ermittelten Nukleinsäuresequenzen wurden mit denen anderer mariner und terrestrischer Säugetiere verglichen. Die Homologien von IL-2, IL-4, IL-6 und TNF- α mit der mRNS anderer Zahnwale variierten zwischen 97-100%. Weiterhin fanden sich weitreichende Übereinstimmungen mit porzinen IL-2- und IL-6-mRNS-Sequenzen, bzw. mit ovinen Sequenzen von IL-4, IL-10 und TNF- α . TGF- β wies die größten Homologien mit den Sequenzen vom Schaf und Schwein auf. Die geringsten homologen Abschnitte fanden sich mit den Zytokinen der Mäuse und Karnivoren. Für IL-10 lagen die wenigsten Übereinstimmungen mit der porzinen Nukleinsäure vor. Das Haushaltsgen GAPDH zeigte die größten Homologien mit murinen Sequenzen (Tabelle 14).

Tabelle 14: Homologie-Vergleich der Nukleinsäuresequenzen der Zytokine und GAPDH vom Schweinswal (*Phocoena phocoena*) mit Sequenzen anderer mariner und terrestrischer Säugetiere

Spezies		Homologie der Nukleotidsequenz in %						
		IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	TGF- β	TNF- α	GAPDH
Großer Tümmler	<i>Tursiops truncatus</i>	-	98	-	-	-	98	-
Schwertwal	<i>Orcinus orca</i>	98	-	98	98	-	-	-
Belugawal	<i>Delphinapterus leucas</i>	99	-	97	-	-	100	-
Pferd	<i>Equus caballus</i>	86	80	83	91	95	86	85
Rind	<i>Bos taurus</i>	86	86	80	91	95	89	87
Schaf	<i>Ovis aries</i>	86	87	79	92	96	90	83
Schwein	<i>Sus scrofa</i>	89	85	88	87	96	89	84
Maus	<i>Mus musculus</i>	77	75	77	88	89	89	90
Kegelrobbe	<i>Halichoerus grypus</i>	85	-	-	-	-	-	-
Seehund	<i>Phoca vitulina</i>	-	-	77	-	-	-	-
Hund	<i>Canis familiaris</i>	84	78	80	88	95	86	87

- = Nukleinsäuresequenz nicht bekannt

4.2. Untersuchungen der Lymphozyten-Subpopulationen und Zytokin-Expression in Thymus und Milz

4.2.1. Immunphänotypische Veränderungen im Thymus

Die immunphänotypischen Veränderungen verschiedener Lymphozyten-Subpopulationen in den Thymi der Gruppe I bis IV sind in Abbildung 16 und 17 dargestellt.

Gruppe I (nicht-depletierte Thymi)

Nahezu alle lymphatischen Zellen des Kortex waren CD2- und CD3ε-positiv. Lediglich Thymozyten in der Peripherie der Läppchen wiesen eine geringe bzw. fehlende Immunreaktivität auf. Die Intensität der CD45R-Expression der kortikalen Lymphozyten war nur gering ausgeprägt, jedoch zeigten einzelne Zellen eine starke Expression des CD45R-Antigens. Der bovine Anti-MHC Klasse II-Antikörper markierte die Mehrheit der Lymphozyten, jedoch blieben einzelne Ansammlungen von kortikalen Zellen ungefärbt. Der walspezifische MHC Klasse II-Marker zeigte eine Reaktion mit durchschnittlich 50% der Zellen, während der kanine MHC Klasse II-Marker vorwiegend Antigen-präsentierende Zellen im Rindenbereich markierte.

Im Vergleich zum Rindenbereich war die Intensität der medullären Thymozyten mit den beiden T-Zellmarkern (CD2, CD3ε) deutlicher ausgeprägt. Bis auf einzelne CD2- und CD3ε-negative, follikelartige Areale zeigten alle Zellen eine deutliche Immunreaktivität. Zusätzlich wiesen alle medullären Thymozyten eine geringgradige Expression des CD45R-Antigens auf. In den CD2/CD3ε-negativen, follikelartigen Arealen lag eine deutliche Markierung mit dem CD45R- und dem kaninen MHC Klasse II-Marker vor. Fast alle medullären Thymozyten wiesen eine membrangebundene Reaktion mit dem bovinen und walspezifischen MHC Klasse II-Antikörpern auf. Der equine Pan-Leukozytenmarker zeigte eine deutliche, gleichmäßig verteilte Reaktion fast aller Thymozyten in Medulla und Kortex.

Gruppe II (geringgradig depletierte Thymi)

Die Verteilung der verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen in Thymusmark und -rinde entsprach weitgehend der Verteilung in Gruppe I.

Gruppe III (mittelgradig depletierte Thymi)

Nahezu alle kortikalen Thymozyten exprimierten das CD2- und CD3ε-Antigen, jedoch zeigte ein Thymus einen deutlichen Verlust an T-Zellen in diesem Kompartiment (pp1642). Während der bovine MHC Klasse II-Marker in drei Thymi ungefähr 70% der Zellen erkannte, fanden sich in fünf Organen keine unmarkierten, kortikalen Thymozyten. Die Verteilung der lymphatischen Zellen, welche mit dem bovinen und kaninen Anti-MHC Klasse II-Antikörpern sowie mit dem CD45R-Marker nachgewiesen wurden, entsprach der Verteilung in Gruppe I. Im Gegensatz zu den nicht und geringgradig depletierten Thymi fanden sich nur vereinzelt kleine follikelartige Areale im Mark, welche sich mit dem Anti-CD45R- und kaninen Anti-MHC II-Antikörper markieren ließen. Nahezu alle medullären Thymozyten exprimierten das CD2- und CD3ε-Molekül an der Oberfläche. Die Intensitätsunterschiede der T-Zelloberflächenantigene (CD2, CD3ε) zwischen Mark und Rinde waren nur gering ausgeprägt. Fast alle Zellen des Thymusmarks zeigten eine Immunreaktivität mit dem bovinen und walspezifischen MHC Klasse II-Markern. Alle kortikalen und medullären Thymozyten reagierten mit dem equinen Pan-Leukozytenmarker.

Gruppe IV (hochgradig depletierte Thymi)

In den meisten Thymi lag eine deutliche Depletion der CD2- und CD3ε-exprimierenden Zellen der Rinde vor. Die Mehrheit der lymphatischen Zellen in diesem Kompartiment zeigte eine Reaktion mit dem bovinen MHC Klasse II-Marker. Die Immunreaktivität mit den kaninen und walspezifischen Anti-MHC Klasse II-Antikörpern sowie mit dem Anti-CD45R-Antikörper entsprach der Verteilung in Gruppe I. Im Mark von zwei Thymi konnte ein Verlust von CD2-, CD3ε- und CD45R-positiven Zellen nachgewiesen werden. Zusätzlich ging die hochgradige Depletion des Thymus mit einem Verlust der follikelartigen Areale einher, wodurch es zu einer deutlichen Reduzierung der Zellen kam, welche sich mit dem CD45R und dem kaninen MHC Klasse II-Marker nachweisen ließen. Die Immunreaktivität des kaninen und walspezifischen MHC Klasse II-Marker entsprach der Verteilung in Gruppe I. Alle kortikalen und medullären Thymozyten reagierten mit dem equinen Pan-Leukozytenmarker.

Abbildung 16: Schätzwert der untersuchten Antigene in der Thymusrinde der Gruppen I bis IV (Median $[\tilde{x}]$, Minimum, Maximum).

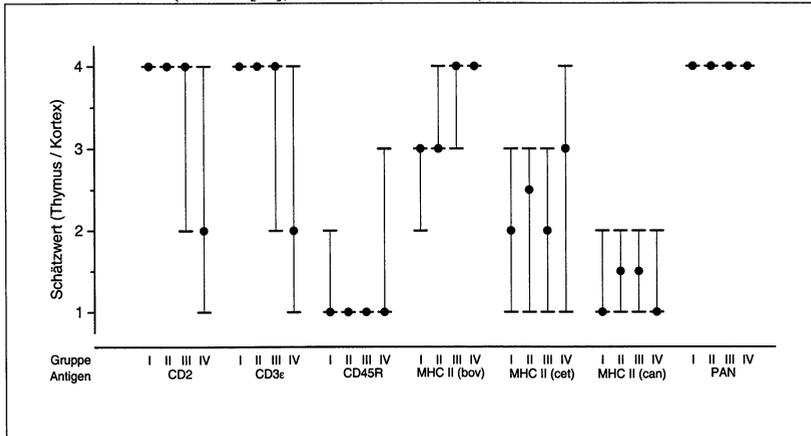
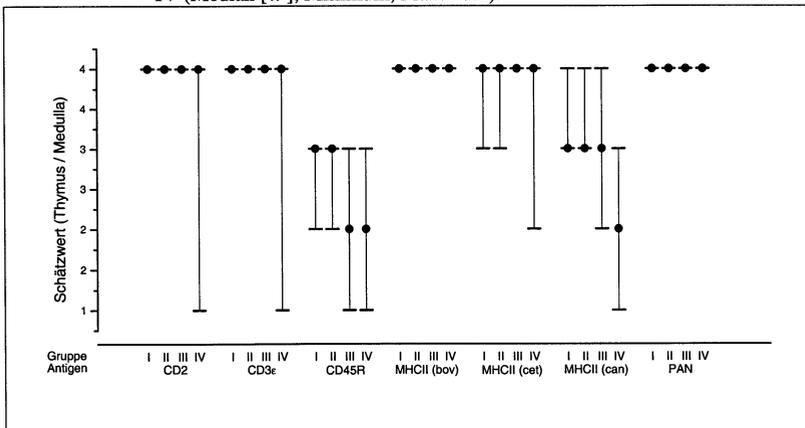


Abbildung 17: Schätzwert der untersuchten Antigene im Thymusmark der Gruppen I bis IV (Median $[\tilde{x}]$, Minimum, Maximum).



Statistische Auswertung

Der Verlust an kortikalen T-Zellen in hochgradig depletierten Thymi war hochsignifikant (CD2: $p=0,001$; CD3e: $0,001$; Abbildungen 18 und 19). Ebenfalls konnte für die relative Zunahme der MHC Klasse II-positiven Zellen mit dem bovinen Marker in der Thymusrinde ein hochsignifikanter Zusammenhang festgestellt werden (MHC Klasse II [bov]: $p=0,001$; Abbildungen 20 und 21). Der anti-CD45R-Antikörper sowie der kanine und walspezifische MHC Klasse II-Marker und der equine Pan-Leukozytenmarker zeigten keine signifikanten Gruppenunterschiede (CD45R: $p=0,915$; MHC Klasse II [can]: $p=0,764$; MHC Klasse II [cet]: $p=0,270$; PAN: $p=1,000$).

Die Reduktion CD2- und CD3e-exprimierender Zellen in der Medulla von hochgradig depletierten Thymi unterschied sich signifikant von den anderen Gruppen (CD2: $p=0,048$). Die mit dem Verlust der follikelartigen Areale einhergehende Reduktion an medullären B-Zellen war ebenfalls signifikant (CD45R: $p=0,009$; MHC Klasse II [can]: $p=0,008$; Abbildungen 22 bis 25). Mit dem bovinen und walspezifischen MHC Klasse II-Marker sowie dem equinen Pan-Leukozytenmarker konnten keine signifikanten Gruppenunterschiede festgestellt werden (MHC Klasse II [bov]: $p=1,000$; MHC Klasse II [cet]: $p=0,578$; PAN: $p=1,000$).

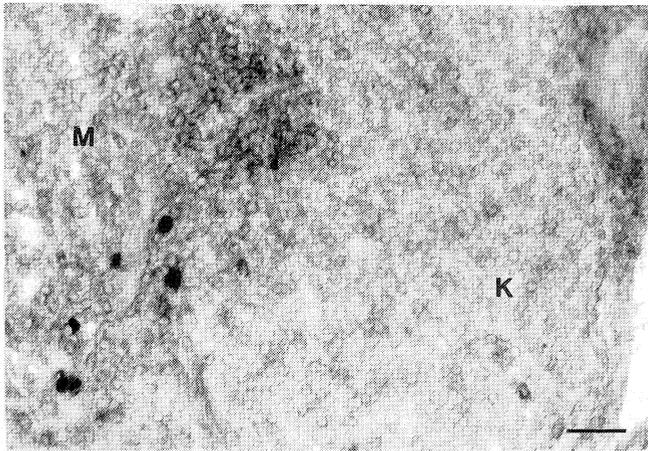


Abbildung 18: CD3 ϵ -spezifische Reaktion aller Thymozyten in einem nicht-atrophischen Thymus (Gruppe I). K = Kortex; M = Medulla; Primärantikörper: Klon CD3-12; Gefrierschnitt; ABC-Methode, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Balken=60 μ m.

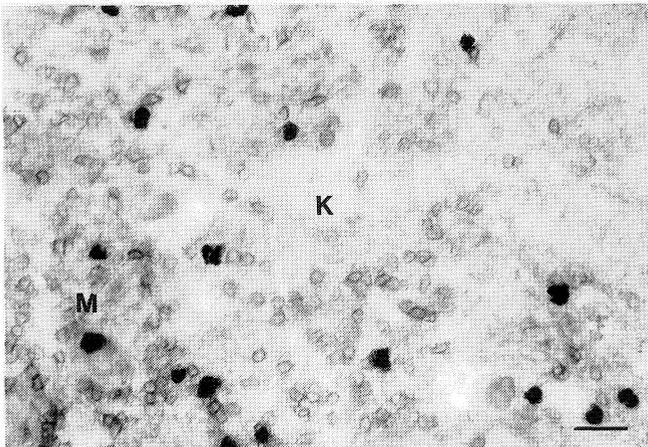


Abbildung 19: Deutliche Reduktion der CD3 ϵ ⁺-Thymozyten im Kortex eines hochgradig atrophischen Thymus (Gruppe IV). K = Kortex; M = Medulla; Primärantikörper: Klon CD3-12; Gefrierschnitt; ABC-Methode, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Balken=30 μ m.

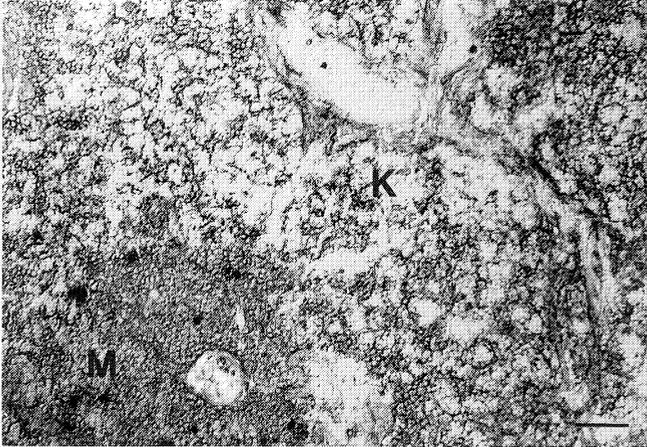


Abbildung 20: Reaktion des bovinen MHC Klasse II-Markers mit ca. 70% der kortikalen Thymozyten eines nicht-atrophischen Thymus (Gruppe I). K = Kortex; M = Medulla; Primärantikörper: Klon 171 D3; Gefrierschnitt; ABC-Methode, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Balken=100 μ m.

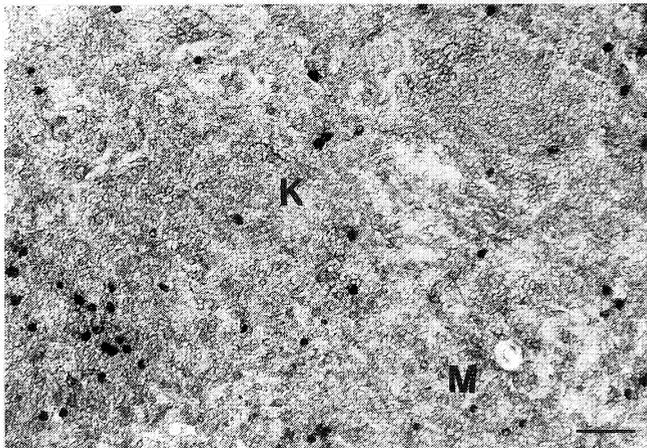


Abbildung 21: Reaktion des bovinen MHC Klasse II-Markers mit allen kortikalen Thymozyten eines hochgradig atrophischen Thymus (Gruppe IV). K = Kortex; M = Medulla; Primärantikörper: Klon 171 D3; Gefrierschnitt; ABC-Methode, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Balken= 100 μ m.

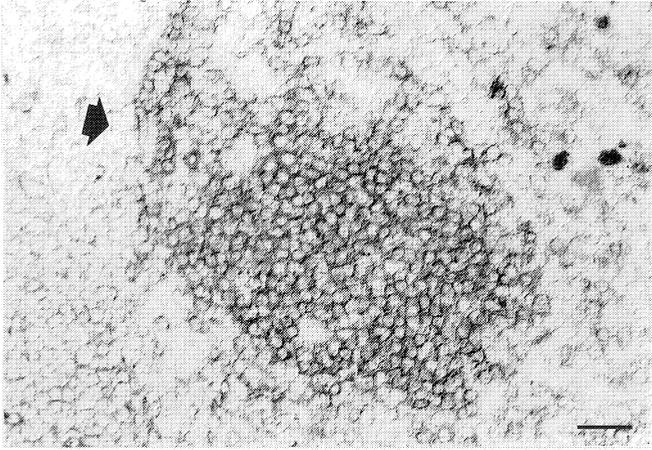


Abbildung 22: Prominente, follikelartige Ansammlung von $CD45R^+$ -Zellen (Pfeil) in der Medulla eines nicht-atrophischen Thymus (Gruppe I); Primärantikörper: Klon F21 H2 E10; Gefrierschnitt; ABC-Methode, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Balken=30 μ m.

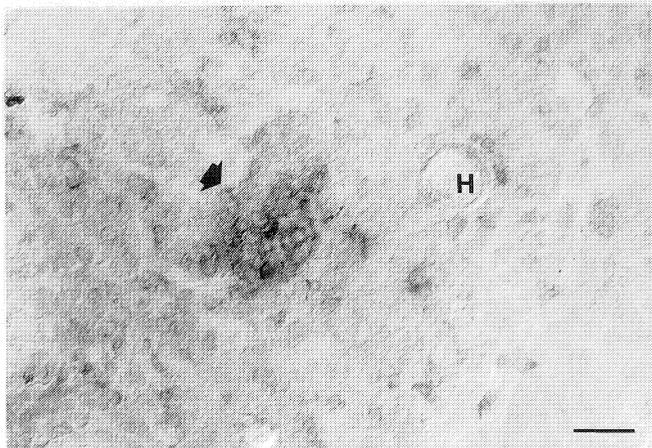


Abbildung 23: Deutliche Reduktion der follikelartigen Ansammlung $CD45R^+$ -Zellen (Pfeil) in der Medulla eines hochgradige atrophischen Thymus (Gruppe IV); Primärantikörper: Klon F21 H2 E10; Gefrierschnitt; ABC-Methode, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Balken=30 μ m.

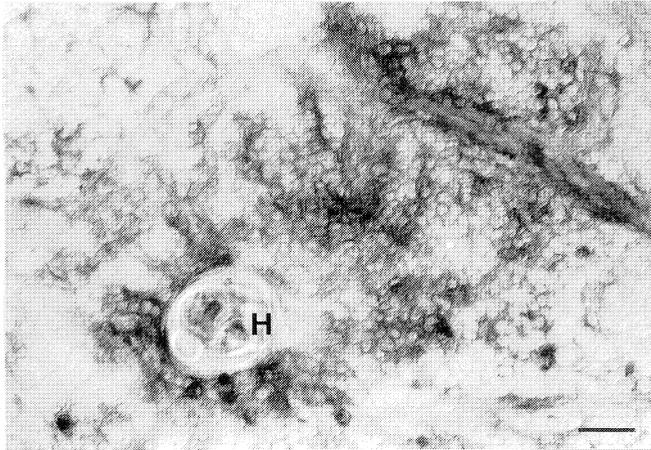


Abbildung 24: Reaktion des kaninen MHC Klasse II-Markers mit follikelartigen Zellansammlungen in der Medulla eines nicht-atrophischen Thymus (Gruppe I); H = Hassallsches Körperchen; Primärantikörper: Klon Dog 26-1; Gefrierschnitt; ABC-Methode, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Balken=30 μ m.

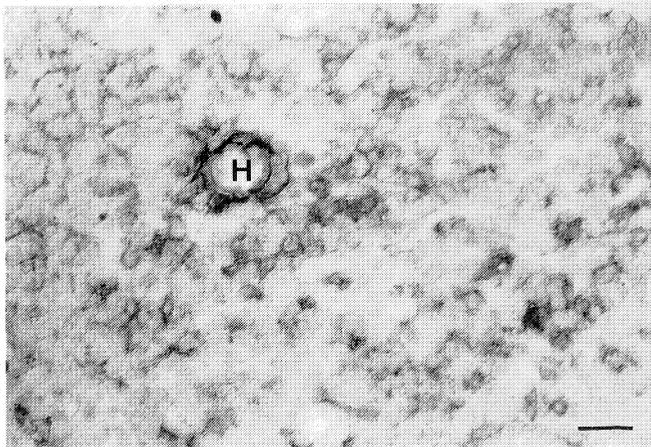


Abbildung 25: Reduktion der Zellen in der Medulla eines hochgradig atrophischen Thymus (Gruppe IV), welche durch den kaninen MHC Klasse II-spezifischen Antikörper markiert werden; H = Hassallsches Körperchen; Primärantikörper: Klon Dog 26-1; Gefrierschnitt; ABC Methode, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Balken=30 μ m.

4.2.2. Immunphänotypische Veränderungen in der Milz

Die immunphänotypischen Veränderungen in den Milzen der Gruppen I bis IV sind in den Abbildungen 26 bis 28 dargestellt.

Gruppe I (nicht-depletierte Milzen)

In der PALS fanden sich vorwiegend CD2⁺- und CD3ε⁺-Zellen. Die membrangebundene Reaktion von Lymphozyten mit dem CD45R- und bovinen MHC Klasse II-Markern war in der PALS stellenweise deutlich vermindert oder fehlte vollständig. Antigen-präsentierende Zellen konnten mit dem kaninen Anti-MHC Klasse II-Antikörper in diesem Kompartiment dargestellt werden. Nahezu alle Lymphozyten in den Primär- und Sekundärfollikeln exprimierten das CD45R-Oberflächenantigen. Zusätzlich konnten fast alle folliculären Zellen mit dem bovinen Anti-MHC Klasse II-Antikörper dargestellt werden. Im Vergleich reagierte der kanine MHC Klasse II-Marker fast ausschließlich mit Zellen des Follikelzentrums. Nur vereinzelt fanden sich T-Lymphozyten (CD2, CD3ε) in den Follikeln und der Marginalzone. Die Mehrheit der Zellen zeigte eine Expression des CD45R-Oberflächenantigens. Während die Anzahl der Zellen, welche mit dem walspezifischen MHC Klasse II-Marker reagierten zwischen 25% und 75% schwankte, konnten mit dem kaninen MHC Klasse II-Marker nur einzelne Zellen in der Marginalzone nachgewiesen werden. Der equine Pan-Leukozytenmarker reagierte mit fast allen lymphatischen Zellen in den beschriebenen Kompartimenten. Jedoch fand sich in einzelnen, deutlich ausgeprägten Sekundärfollikeln eine fehlende Immunreaktivität in den germinativen Zentren.

Gruppe II und III (geringgradig und mittelgradig depletierte Milzen)

Die Verteilung der verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen in den Follikeln, Marginalzonen und PALS entsprach weitgehend der Verteilung in der Gruppe I.

Gruppe IV (hochgradig depletierte Milzen)

In der PALS reagierten durchschnittlich 50% bis 75% der Zellen mit den CD2- und CD3ε-Markern. In der Marginalzone fanden sich Zellen, welche sich nicht mit dem bovinen MHC Klasse II-Marker anfärben ließen. Ansonsten entsprach die Verteilung der Lymphozyten-Subpopulationen weitgehend der in den anderen Gruppen. Der equine Pan-Leukozytenmarker reagierte mit fast allen lymphatischen Zellen in den beschriebenen Kompartimenten. Im

Vergleich zu den Gruppen I bis III fanden sich mit diesem Antikörper keine unmarkierten Zellen in den Follikelzentren.

Abbildung 26: Schätzwert der untersuchten Antigene in der Milz-PALS der Gruppen I bis IV (Median \bar{x} , Minimum, Maximum).

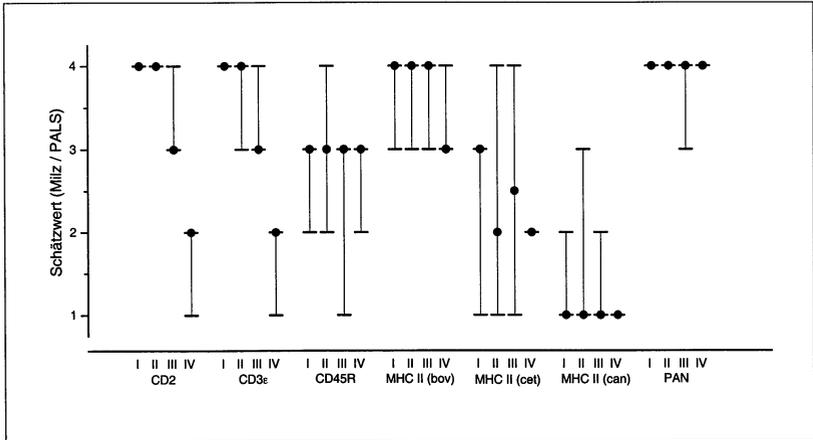


Abbildung 27: Schätzwert der untersuchten Antigene in den Milzfollikeln der Gruppen I bis IV (Median \bar{x} , Minimum, Maximum).

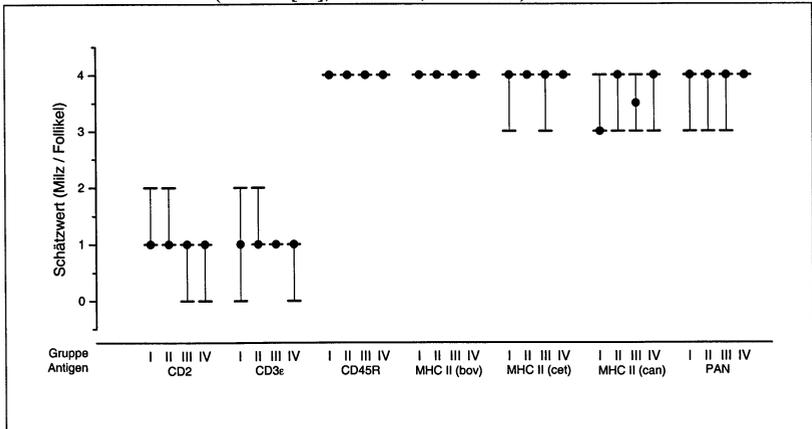
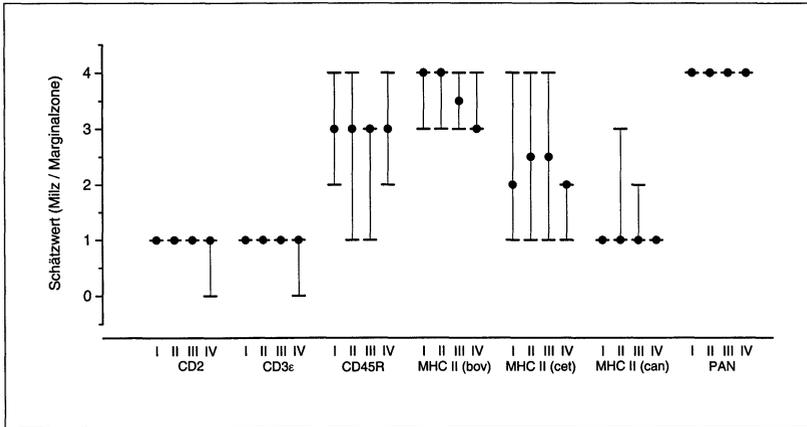


Abbildung 28: Schätzwert der untersuchten Antigene in den Marginalzonen der Milzen der Gruppen I bis IV (Median \bar{x} , Minimum, Maximum).



Statistische Auswertung

Die Reduktion der CD2- und CD3ε-exprimierenden Zellen in der PALS ließ hochsignifikante Gruppenunterschiede erkennen (CD2: $p=0,001$; CD3ε: $p=0,001$; Abbildungen 29 und 30).

Der anti-CD45R-Antikörper sowie die verschiedenen MHC Klasse II-Marker und der Pan-Leukozytenmarker wiesen keine signifikanten Gruppenunterschiede auf (CD45R: $p=0,967$; MHC Klasse II [bov]: $p=0,115$; MHC Klasse II [cet]: $p=0,694$; MHC Klasse II [can]: $p=0,282$; PAN: $p=0,350$).

Weiterhin konnten mit den verschiedenen monoklonalen Antikörpern keine signifikanten Gruppenunterschiede in den Milzfollikeln nachgewiesen werden (CD2: $p=0,102$; CD3ε: $p=0,102$; CD45R: $p=1,000$; MHC Klasse II [bov]: $p=1,000$; MHC Klasse II [cet]: $p=0,848$; MHC Klasse II [can]: $p=0,774$; PAN: $p=0,171$).

In der Marginalzone der Milz lagen mit den eingesetzten Oberflächenantigenmarkern ebenfalls keine signifikanten Gruppenunterschiede vor (CD2: $p=0,100$; CD3ε: $p=0,100$; CD45R: $p=0,920$; MHC Klasse II [bov]: $p=0,06$; MHC Klasse II [cet]: $p=0,449$; MHC Klasse II [can]: $p=0,741$; PAN: $p=1,000$).

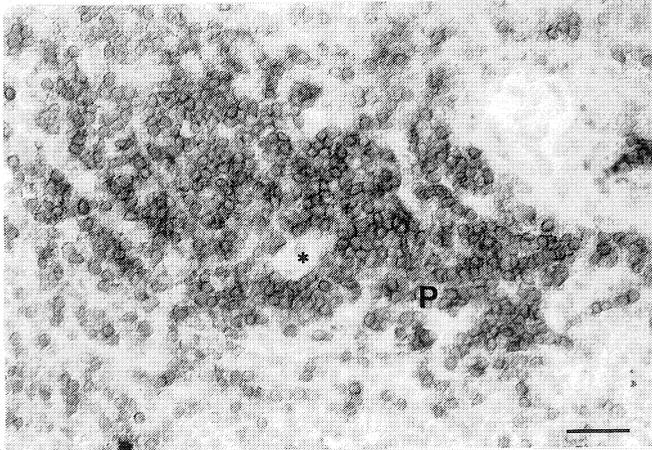


Abbildung 29: $CD3e^+$ -Zellen in der PALS einer nicht-depletierten Milz (Gruppe I); * = Zentralarterie, P = PALS; Primärantikörper: Klon CD3-12; Gefrierschnitt; ABC-Methode, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Balken=30 μ m.

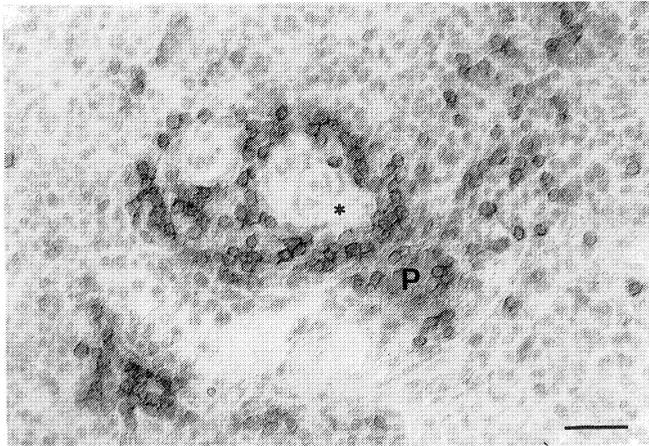


Abbildung 30: Deutliche Reduktion der $CD3e^+$ -Zellen in der PALS einer hochgradig depletierten Milz (Gruppe IV). * = Zentralarterie, P = PALS; Primärantikörper: Klon CD3-12; Gefrierschnitt; ABC-Methode, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Balken=30 μ m.

4.2.3. Ergebnisse der Echtzeit-RT-PCR

4.2.3.1 Qualitativer und semiquantitativer Zytokin-mRNS-Nachweis im Thymus

Die Genexpressionen der verschiedenen pro- und anti-inflammatorischen Zytokine sowie von GAPDH wurden in insgesamt 29 Thymi der Gruppe I (n=7), II (n=8), III (n=7) und IV (n=7) mittels Echtzeit-RT-PCR untersucht (Tabelle 4).

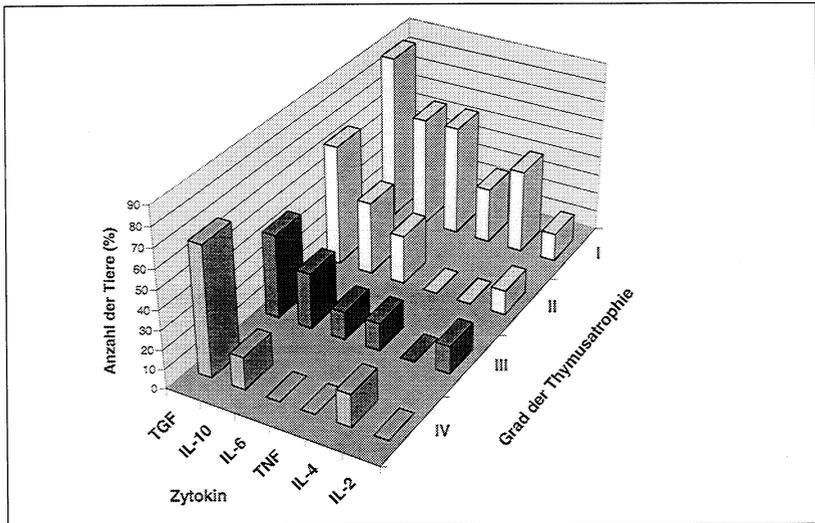
4.2.3.1.1. Qualitative Auswertung

In allen Thymi der Gruppen I bis III wurde die mRNS von GAPDH nachgewiesen (100%). In Gruppe IV gelang der Nachweis des Haushaltsgens in 85,7% der Thymi (6/7). Für die weitere Auswertung der mRNS-Expression wurden nur Proben mit einem positiven Nachweis von GAPDH berücksichtigt.

TGF- β fand sich in 85,7% der Gruppe I (6/7), 62,5% der Gruppe II (5/8), 42,9% der Gruppe III (3/7) und 66,7% der Gruppe IV (4/6). 57,1% der Thymi der Gruppen I (4/7) zeigten eine Expression von IL-10. Weiterhin wurden in 37,5% der Thymi der Gruppe II (3/8), 28,6% der Thymi der Gruppe III (2/7) und 16,7% der Gruppe IV (1/6) IL-10 amplifiziert. In Gruppe I exprimierten 57,1% (4/7), in Gruppe II 25% (2/8) und in Gruppe III 14,3% (1/7) der Organe die mRNS von IL-6. In hochgradig depletierten Thymi (Gruppe IV) konnte keine mRNS von IL-6 nachgewiesen werden. TNF- α fand sich in 28,6% (2/7) bzw. 14,3% (1/7) der Thymi der Gruppen I und III, während in den Gruppen II und IV keine Transkription vorlag. IL-4-mRNS wurde in 42,9% (3/7) der Thymi der Gruppe I und in 16,7% (1/6) der Gruppe IV amplifiziert. In den Gruppen II und III wurde das Zytokin nicht nachgewiesen. Die mRNS von IL-2 lag in jeweils 14,3% (1/7) der Thymi der Gruppen I und III bzw. in 12,5% (1/8) der Organe der Gruppe II vor. Thymi der Gruppe IV zeigten keine Genexpression von IL-2 (Abbildung 31).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit zunehmender Atrophie deutlich weniger Thymi eine Expression von IL-2, IL-6, IL-10, TGF- β und TNF- α aufwiesen. Die Anzahl TGF- β -exprimierender Thymi blieb bei den verschiedenen Depletionsgraden weitgehend konstant.

Abbildung 31: Qualitativer Nachweis der mRNA-Expression verschiedener pro- und anti-inflammatorischer Zytokine in Thymi der Gruppen I bis IV.



4.2.3.1.2. Semiquantitative Auswertung

Die semiquantitative Auswertung von **IL-6** zeigte eine Reduktion der mRNA-Expression in den Gruppen I bis IV. Die Mediane lagen in allen Gruppen an der Nachweisgrenze, jedoch war das Maximum der Gruppe I mit 40,1% gegenüber den anderen Gruppen deutlich erhöht (Gruppe II: Max=0,1%; Gruppe III: Max=1,2%; Gruppe IV: Max=0%). Weiterhin lag in Gruppe I das obere Quartil mit 0,5% oberhalb der Werte der anderen Gruppen (Gruppe II: 3. Quartil=0,1; Gruppe III und IV: 3. Quartil=0%; Abbildung 32).

Die Mediane der mRNA-Menge von **IL-2** wiesen keine Gruppenunterschiede auf. In Gruppe IV konnte keine Zytokin-Expression nachgewiesen werden. Das Maximum der Gruppe III war gegenüber den Gruppen I und II um das 9-10fache erhöht (Gruppe I: Max=105,8%; Gruppe II: Max=92,2%). Weiterhin lag das obere Quartil der Gruppe II über denen der anderen Gruppen (Gruppe II: 3. Quartil=23,1%; Gruppe I, III, IV: 3. Quartil=0%; Abbildung 32).

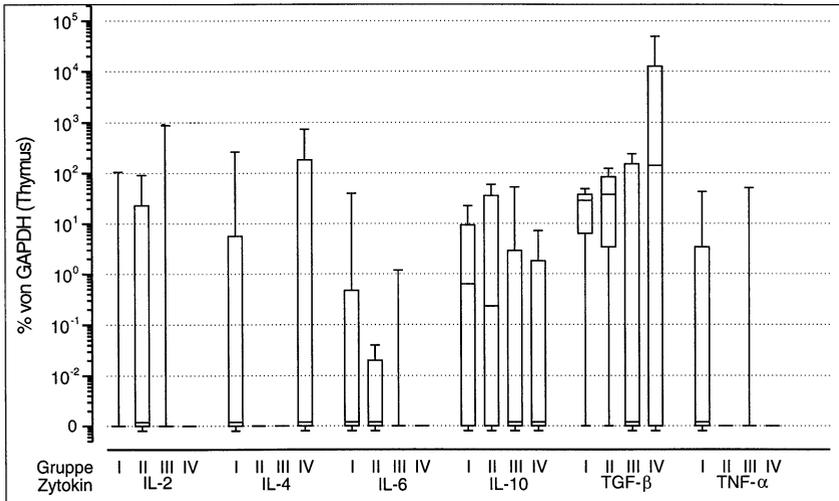
Die mRNA von **IL-4** war in den Gruppen I und IV aufreguliert. Der maximale Wert der Gruppe IV war gegenüber dem der Gruppe I um das 2,8fache erhöht (Gruppe I: Max=265,5%; Gruppe IV: Max=737,9%). Weiterhin lag das obere Quartil der Gruppe IV um das ca. 32fache oberhalb des Wertes der Gruppe I (Gruppe I: 3. Quartil=5,7%; Gruppe IV: 3. Quartil=184,5%). In den Gruppen II und III konnte keine mRNA detektiert werden. Die Mediane zeigten keine Gruppenunterschiede (Abbildung 32).

Die Mediane der **IL-10**-mRNA-Menge zeigten eine kontinuierliche Reduktion in den Gruppen I bis IV (Gruppe I: Median=0,6%; Gruppe II: Median=0,2%; Gruppe III, IV: Median=0%). Die maximalen Werte der Gruppen II und III lagen dicht beieinander (Gruppe II: Max=59,9%; Gruppe III: Max=53,0%). Im Vergleich dazu waren die maximalen Werte der Gruppen I und IV deutlich herabgesetzt (Gruppe I: Max=22,5%; Gruppe IV: Max=7,2%). Weiterhin wies die Gruppe II ein deutlich höheres oberes Quartil, als die Gruppen I, III und IV auf (Gruppe I: 3. Quartil=9,3%; Gruppe II: 3. Quartil=36,0%; Gruppe III: 3. Quartil=2,9%; Gruppe IV: 3. Quartil=1,8%; Abbildung 32).

Die Expression von **TGF- β** zeigte eine kontinuierliche Aufregulation in den Gruppen I bis IV. Die Mediane der Gruppen I und II wiesen nur geringe Differenzen auf (Gruppe I: Median=28,9%; Gruppe II: Median=37,9%). Im Vergleich war der Median der Gruppe IV deutlich erhöht (Gruppe IV: Median=141,2%). Weiterhin war in Gruppe IV eine Erhöhung des maximalen Wertes um das 1000fache gegenüber der Gruppe I vorhanden (Gruppe I: Max=48,9%; Gruppe II: Max=123,8%; Gruppe III: Max=242,0%; Gruppe IV: Max=48984,2%; Abbildung 32).

Die Mediane der mRNA-Menge von **TNF- α** zeigten keine Gruppenunterschiede. Weiterhin lagen die maximalen Werte in den Gruppen I und III dicht beieinander (Gruppe I: Max= 43,0; Gruppe III: Max=51,2%). In den Gruppen II und IV konnte keine Zytokin-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 32).

Abbildung 32: Semiquantitative Auswertung der Zytokin-mRNS-Expression im Thymus der Gruppen I bis IV. „Box-and-whisker-plot“: (Median $[\bar{x}]$, Minimum, Maximum, unteres und oberes Quartil).



Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der semiquantitativen Untersuchung ergab eine signifikante Abnahme der IL-6-mRNS in den Gruppen I bis IV ($p=0,020$). Für die Expression von IL-2, IL-4, IL-10, TGF- β und TNF- α konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden (IL-2: $p=0,524$; IL-4: $p=0,264$; IL-10: $p=0,175$; TGF- β : $p=0,347$; TNF- α : $p=0,257$).

4.2.3.2. Qualitativer und semi-quantitativer Nachweis der Zytokin-mRNS in der Milz

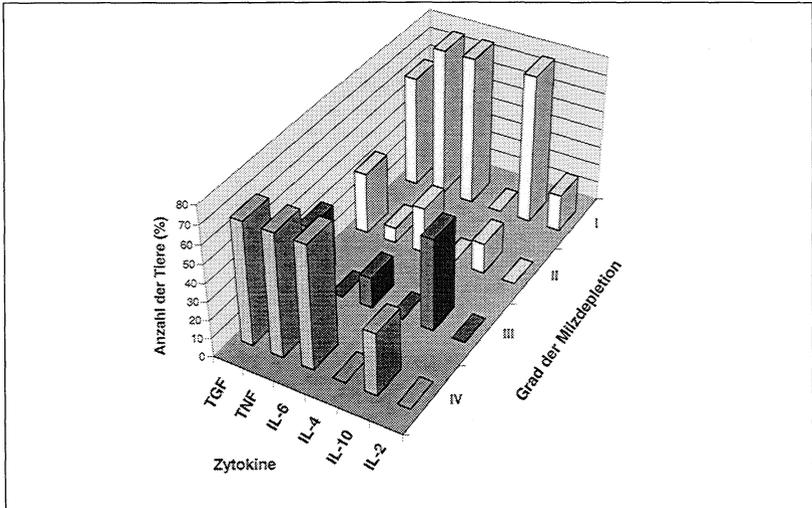
Die Genexpressionen der pro- und anti-inflammatorischen Zytokine sowie von GAPDH wurden in insgesamt 29 Milzen der Gruppe I (n=5), II (n=14), III (n=7) und IV (n=3) untersucht.

4.2.3.2.1. Qualitative Auswertung

Der Nachweis von GAPDH-mRNS gelang in 100% der Milzen der Gruppen I (5/5) und IV (3/3). Im Vergleich zeigten jeweils 85,7% der Milzen der Gruppen II (12/14) und III (6/7) eine Expression des Haushaltsgens. Für die weitere Auswertung der mRNS-Expression wurden nur Proben mit einem positiven Nachweis von GAPDH berücksichtigt.

Während in 20% der Milzen der Gruppe I (1/5) die mRNS von IL-2 vorlag, konnte in den Gruppen II bis IV keine Expression dieses Zytokins nachgewiesen werden. Weiterhin verlief die Amplifikation der cDNS von IL-4 in allen Milzen mit negativem Ergebnis. IL-6 fand sich in 80% der Milzen der Gruppe I (4/5), in 25% der Gruppe II (3/12), in 16,7% der Gruppe III (1/6) und in 66,7% der Gruppe IV (2/3). Der Nachweis von IL-10 gelang in 80%, 16,7%, 50% bzw. 33,3% der Milzen der Gruppen I bis IV (4/5, 2/12, 3/6 bzw. 1/3). In Gruppe I lag in 60% der Milzen die mRNS von TGF- β vor. In den Gruppen II und III fand sich in jeweils 33,3% der Organe eine Expression von TGF- β (4/12 bzw. 2/6). Weiterhin wurden in 66,7% der Milzen der Gruppe IV (2/3) TGF- β -mRNS nachgewiesen. TNF- α lag in 80% der Milzen der Gruppe I (4/5), in 8,3% der Gruppe II (1/12) und in 66,7% der Gruppe IV (2/3) vor. In den Milzen der Gruppe III konnte keine mRNS von TNF- α nachgewiesen werden (Abbildung 33).

Abbildung 33: Qualitativer Nachweis der mRNA-Expression verschiedener pro- und anti-inflammatorischer Zytokine in Milzen der Gruppen I bis IV.



4.2.3.2.2. Semiquantitative Auswertung

Die mRNA von **IL-2** konnte nur in Gruppe I nachgewiesen werden (Gruppe I: Max=187,7%). Die Milzen der Gruppen II bis IV zeigten keine Expression dieses Zytokins (Abbildung 34).

Der Nachweis der mRNA von **IL-4** verlief in allen Milzen der Gruppen I bis IV mit negativem Ergebnis (Abbildung 34).

Der Median der mRNA-Menge von **IL-6** lag in der Gruppe I deutlich über den Werten der anderen Gruppen (Gruppe I, Median=0,5%; Gruppe II: Median=0%; Gruppe III: Median=0%; Gruppe IV: Median=2,4%). Die höchsten Werte fanden sich in Gruppe I und II (Gruppe I: Max=2743,4%; Gruppe II: Max=1489,7%; Gruppe III: Max=0,2%; Gruppe IV: Max=792,6%; Abbildung 34).

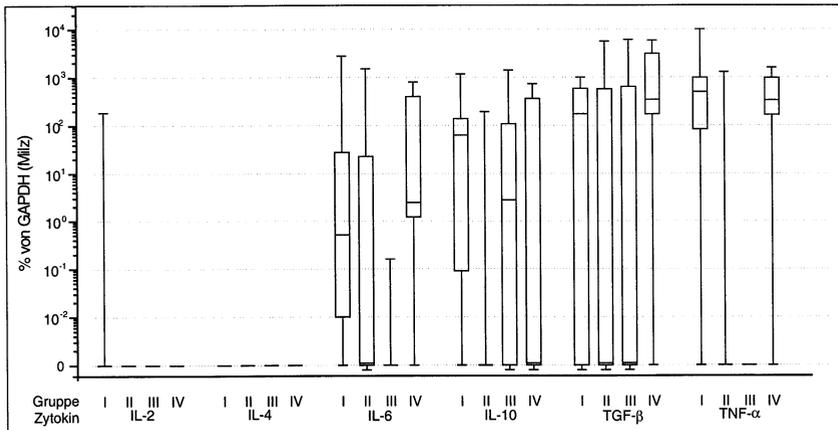
Die Maxima der **IL-10**-mRNA-Mengen der Gruppen I und III lagen dicht beieinander (Gruppe I: Max=1162,9%; Gruppe III: Max=1395,1%). Im Vergleich waren die maximalen Werte der Gruppen II und IV vermindert (Gruppe I: Max=193,3%; Gruppe IV:

Max=722,5%). Der höchste Median fand sich in Gruppe I (Gruppe I: Median=63,3%; Gruppe II: Median=0%; Gruppe III: Median=2,8%; Gruppe IV: Median=0%; Abbildung 34).

Im Gegensatz zu den Gruppen II und III waren die Mediane der TGF- β -Mengen in den Gruppen I und IV deutlich erhöht (Gruppe III: Median=173,4%; Gruppe I: Median=0%, Gruppe II: Median=0%, Gruppe IV: Median=342,6%) Die maximalen Werte der Gruppen II bis IV unterschieden sich nur geringfügig (Gruppe I: Max=990,0%; Gruppe II=5558,2%; Gruppe III: Max=6004,1%; Gruppe IV: Max=5815,4%; Abbildung 34).

Die Mediane der Mengen an TNF- α -mRNS lagen in den Gruppen I und IV deutlich über den Werten der Gruppen II und III (Gruppe I: Median=491,8%; Gruppe II: Median=0%; Gruppe III: Median=0%; Gruppe IV: Median=330,8%). Die größte Zytokin-mRNS-Menge lag in Gruppe I vor (Gruppe I: Max=9919,8%; Gruppe II: Max=1265,1%; Gruppe III: Max=0%; Gruppe IV: Max=1570,4%; Abbildung 34).

Abbildung 34: Semiquantitative Auswertung der Zytokin-Expression in den Milzen der Gruppen I bis IV. „Box-and-whisker-plot“ (Median [\bar{x}], Minimum, Maximum, unteres und oberes Quartil).



4.2.3.3. Korrelation zwischen Thymusatrophie und Zytokin-mRNS-Menge im Blut

Die mRNS-Mengen der verschiedenen Zytokine und GAPDH wurden in Blutproben der 29 Tiere (Tabelle 4) mittels Echtzeit-RT-PCR ermittelt. Anschließend wurde die Zytokin-Expression im Blut mit dem Grad der Thymusatrophie korreliert.

4.2.3.3.1. Qualitative Auswertung

Die mRNS von **IL-2** konnte in 28,6% der Blutproben von Tieren mit unveränderten Thymi (Gruppe I; 2/7) nachgewiesen werden. Die Amplifikation im Blut der Tiere mit gering-, mittel- und hochgradigen Thymusatrophien verlief negativ (Gruppe II bis IV). Jeweils 14,3% der Tiere mit unveränderten (Gruppe I: 1/7) und hochgradig atrophischen Thymi (Gruppe IV: 1/7) zeigten eine Expression von **IL-4** im Blut. 14,3% der Blutproben der Tiere mit unveränderten Thymi (Gruppe I: 1/7), 28,6% der Tiere mit mittelgradig atrophischen Thymi (Gruppe III: 2/7) sowie 37,5% und 42,9% der Tiere mit gering- bzw. hochgradigen Thymusatrophien wiesen eine Expression von **IL-6** auf (Gruppe II: 3/8; Gruppe IV: 3/7). Die Amplifikation von **IL-10** gelang in 42,9% der Blutproben der Tiere mit unveränderten Thymi (Gruppe I: 3/7) und in 50% der Tiere mit geringgradigen Thymusatrophien (Gruppe II: 4/8). Weiterhin fand sich in jeweils 57,1% der Tiere mit mittel- und hochgradigen Thymusatrophien eine Expression von **IL-10** im Blut (Gruppe III: 4/7; Gruppe IV: 4/7). Die mRNS von **TGF- β** wurde in 85,7% der Blutproben der Tiere mit unveränderten Thymi (Gruppe I: 6/7), in 2,5% der Proben der Tiere mit geringgradig atrophischen Thymi (Gruppe II: 5/8), in 28,6% der Proben der Tiere mit mittelgradig atrophischen Thymi (Gruppe III: 2/7) und in 57,1% der Proben der Tiere mit hochgradigen Thymusatrophien (Gruppe IV: 4/7) nachgewiesen. Eine Expression von **TNF- α** lag in 42,9% der Blutproben der Schweinswale mit unveränderten Thymi (Gruppe I: 3/7), in 50% der Proben der Tiere mit geringgradig atrophischen Thymi (Gruppe II: 4/8), in 28,6% Proben der Tiere mit mittelgradig atrophischen Thymi (Gruppe III: 2/7) sowie in 14,3% der Proben der Tiere mit hochgradig atrophischen Thymi vor (Gruppe IV: 1/7).

4.2.3.3.2. Semiquantitative Auswertung

Eine Expression von **IL-2** konnte lediglich in Blutproben der Gruppe I nachgewiesen werden. Die Mediane der mRNS-Mengen zeigten keine Gruppenunterschiede (Gruppe I bis IV: Median=0,0%; Abbildung 35).

Die Menge an **IL-4** in Gruppe IV lag um das 957fache über dem Wert der Gruppe I. In Blutproben der Gruppen II und III konnte keine mRNS dieses Zytokins nachgewiesen werden. Die Mediane der mRNS-Mengen zeigten keine Gruppenunterschiede (Gruppe I bis IV: Median=0,0%; Abbildung 36).

Die mRNS-Menge an **IL-6** im Blut wies eine positive Korrelation mit dem Grad der Thymusatrophie auf. Die Zytokin-Mengen lagen in Blutproben der Gruppe IV teilweise deutlich über denen der anderen Gruppen (Gruppe I: Max=0,2%; Gruppe II: Max=109,5%; Gruppe III: Max=109,1%; Gruppe IV: Max=2743,9%). Die Mediane zeigten keine Gruppenunterschiede (Gruppe I bis IV: Median=0,0%; Abbildung 37).

Mit zunehmendem Grad der Thymusatrophie fand sich ein Anstieg der Menge an **IL-10**-mRNS in Blut der Tiere (Gruppe I: Median=0,0%; Gruppe II: Median=6,1%; Gruppe III: Median=4,7%; Gruppe IV: Median=21,9%; Abbildung 38)

Die Menge an **TGF- β** -mRNS im Blut wies eine negative Korrelation mit dem Grad der Thymusatrophie auf. Jedoch zeigten die Mediane der mRNS-Mengen teilweise große Schwankungen auf (Gruppe I: Median=71,6%; Gruppe II: Median=63,7%; Gruppe III: Median=0,0%; Gruppe IV: Median=142,7%; Abbildung 39).

Die Expression von **TNF- α** im Blut der Tiere zeigte eine kontinuierliche Reduktion mit zunehmender Thymusatrophie. Der Median der Menge an mRNS lag in den Blutproben der Gruppe II deutlich über den Werten der Gruppen I, III und IV (Gruppe I: Median=0,0%; Gruppe II: Median=65,3%; Gruppe III: Median=0,0%; Gruppe IV: Median=0,0%; Abbildung 40).

Abbildung 35: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen dem Grad der Thymusatrophie und der IL-2-mRNS-Menge im Blut

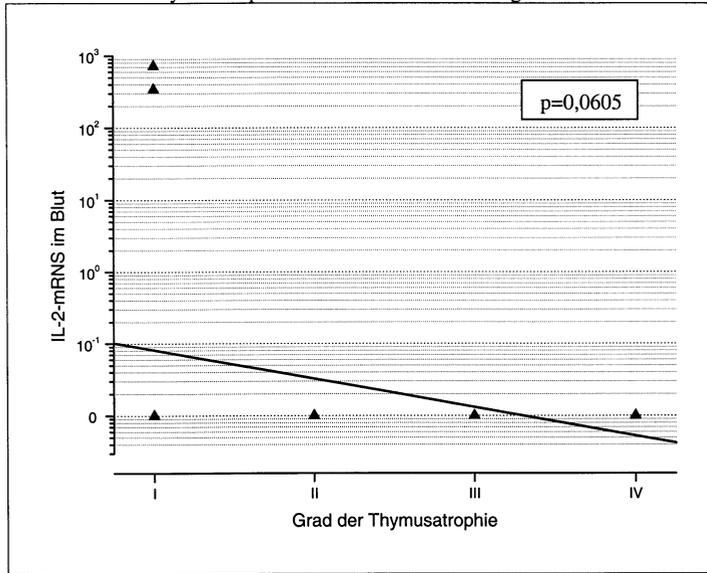


Abbildung 36: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen dem Grad der Thymusatrophie und der IL-4-mRNS-Menge im Blut

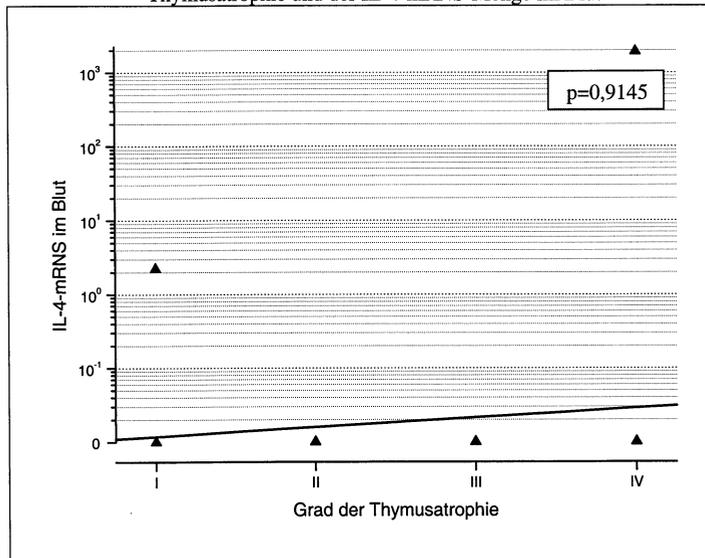


Abbildung 37: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen dem Grad der Thymusatrophie und der IL-6-mRNS-Menge im Blut

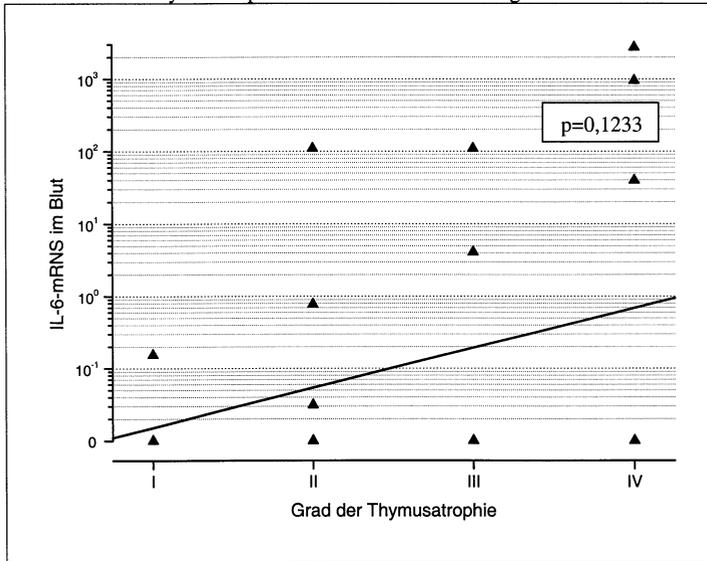


Abbildung 38: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen dem Grad der Thymusatrophie und der IL-10-mRNS-Menge im Blut

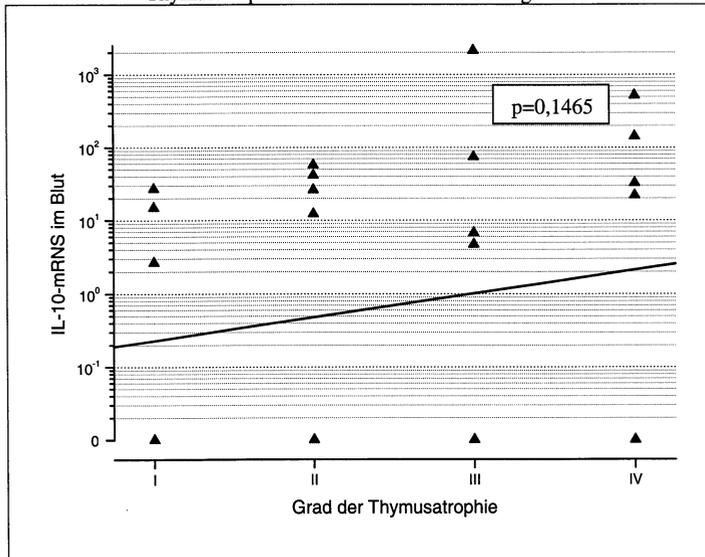


Abbildung 39: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen dem Grad der Thymusatrophie und der TGF- β -mRNS-Menge im Blut

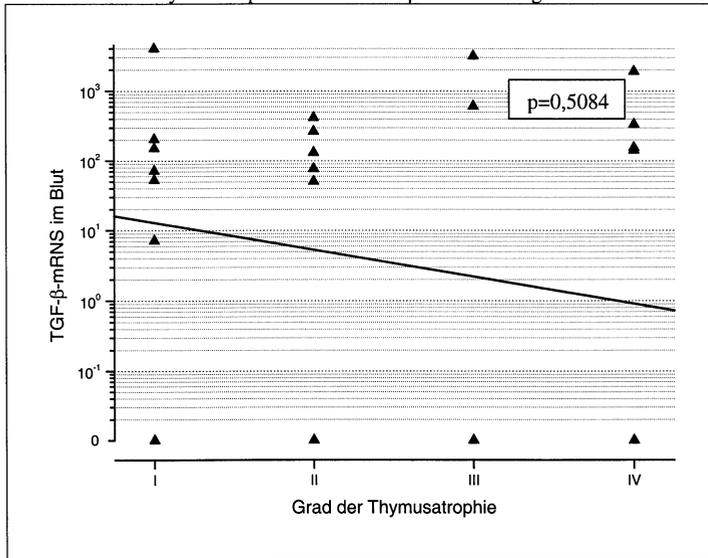
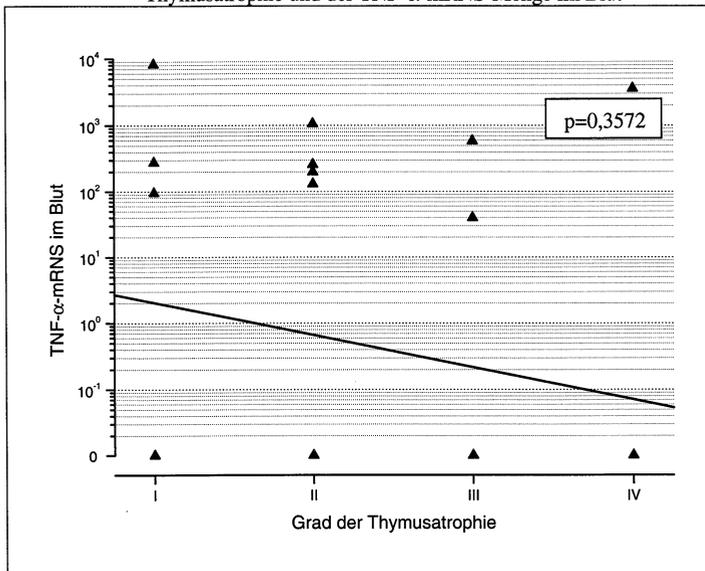


Abbildung 40: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen dem Grad der Thymusatrophie und der TNF- α -mRNS-Menge im Blut



Die statistischen Auswertungen der semiquantitativen Ergebnisse der Echtzeit-RT-PCR zeigten keine Signifikanzen zwischen dem Grad der Thymusatrophie und der Menge an Zytokin-mRNS im Blut (Tabelle 15).

Tabelle 15: Korrelation zwischen dem Grad der Thymusatrophie (Gruppe I bis IV) und der Zytokin-mRNS-Mengen im Blut der Schweinswale (n=29)

Zytokin	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	Signifikanz ($p \leq 0,05$)
IL-2	$r_s = -0,3528$	$p = 0,0605$
IL-4	$r_s = 0,0209$	$p = 0,9145$
IL-6	$r_s = 0,2927$	$p = 0,1233$
IL-10	$r_s = 0,2765$	$p = 0,1465$
TGF- β	$r_s = -0,1279$	$p = 0,5084$
TNF- α	$r_s = -0,1774$	$p = 0,3572$

4.2.3.4. Korrelation zwischen Milzdepletion und Zytokin-mRNS-Menge im Blut

Die mRNS-Mengen der verschiedenen Zytokine und GAPDH wurden in Blutproben der 29 Tiere (Tabelle 4) mittels Echtzeit-RT-PCR ermittelt. Anschließend wurde die Zytokin-Expression im Blut mit dem Grad der Milzdepletion korreliert.

4.2.3.4.1. Qualitative Auswertung

Bei 20% bzw. 7,7% der Tiere mit unveränderten bzw. geringgradig depletierten Milzen fand sich eine Expression von **IL-2** im Blut (Gruppe I: 1/5; Gruppe II: 1/14). Ebenfalls konnten in 20% bzw. 14,3% der Proben der Tiere mit unveränderten und mittelgradig depletierten Milzen die mRNS von **IL-4** nachgewiesen werden (Gruppe I: 1/5; Gruppe III: 1/7). Die mRNS von **IL-6** fand sich in 20% der Proben der Tiere mit unveränderten Milzen (Gruppe I: 1/5), in 35,7% der Proben der Tiere mit geringgradigen Milzdepletionen (Gruppe II: 5/14) sowie in 42,9% der Proben der Tiere mit mittelgradigen Depletionen (Gruppe III: 3/7). Die Amplifikation von **IL-10** im Blut gelang bei 20% der Tiere mit unveränderten Milzen (Gruppe I: 1/5), bei jeweils 57,1% der Tiere mit gering- und mittelgradig depletierten Milzen (Gruppe II: 8/14; Gruppe III: 4/7) und bei 66,7% der Tiere mit hochgradigen Milzdepletionen

(Gruppe IV: 2/3). Insgesamt wiesen 60% der Tiere mit unveränderten Milzen eine Expression von **TGF- β** im Blut auf (Gruppe I: 3/5). Weiterhin verlief der Nachweis der Zytokin-mRNS bei 50% der Tiere mit geringgradigen Milzdepletionen (Gruppe II: 7/14), bei 71,4% der Tiere mit mittelgradigen Depletionen (Gruppe III: 5/7) und bei 33,3% der Tiere mit hochgradig depletierten Milzen (Gruppe IV: 1/3) mit positivem Ergebnis. Der Nachweis von **TNF- α** gelang in 20% der Blutproben der Tiere mit unveränderten Milzen (Gruppe I: 1/5), in 57,1% der Proben der Tiere mit geringgradig depletierten Milzen (Gruppe II: 8/14) sowie in 14,3% der Proben der Tiere mit mittelgradigen Milzdepletionen (Gruppe III: 1/7).

4.2.3.4.2. Semiquantitative Auswertung

Die Expression von **IL-2** im Blut der Tiere wies eine negative Korrelation mit dem Grad der Milzdepletion auf. Die Mediane zeigten keine Gruppenunterschiede (Gruppe I bis IV: Median=0,0%; Abbildung 41).

Die mRNS-Mengen an **IL-4** der Blutproben zeigten eine geringgradige, positive Korrelation mit dem Grad der Milzdepletion. Die Mediane wiesen keine Gruppenunterschiede auf (Gruppe I bis IV: Median=0,0%; Abbildung 42).

Mit zunehmender Milzdepletion fand sich eine geringgradige Abnahme der **IL-6**-mRNS-Menge im Blut der Tiere. Die Mediane wiesen keine Gruppenunterschiede auf (Gruppe I bis IV: Median=0,0%; Abbildung 43).

Die Milzdepletion der Schweinswale war mit einer deutlichen Aufregulation von **IL-10** im Blut vergesellschaftet (Gruppe I: Median=0,0%; Gruppe II: Median=6,7%; Gruppe III: Median=14,9%; Gruppe IV: Median=32,4%; Abbildung 44).

Die Expression von **TGF- β** im Blut wies eine negative Korrelation mit dem Grad der Milzdepletion auf. Die Mediane zeigten eine Reduktion in den Gruppen I bis IV auf (Gruppe I: Median=62,1%; Gruppe II: Median=72,9%; Gruppe III: Median=50,5%; Gruppe IV: Median=0,0%; Abbildung 45).

Die mRNA-Mengen an **TNF- α** der Blutproben zeigten eine negative Korrelation mit der zunehmenden Milzdepletion. Die höchsten Zytokin-Expressionen fanden sich in Blutproben der Gruppe II (Gruppe I: Median=0,0%; Gruppe II: Median=199,6%; Gruppe III: Median=0,0%; Gruppe IV: Median=0,0%; Abbildung 46)

Abbildung 41: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen dem Grad der Milzdepletion und der IL-2-mRNS-Menge im Blut

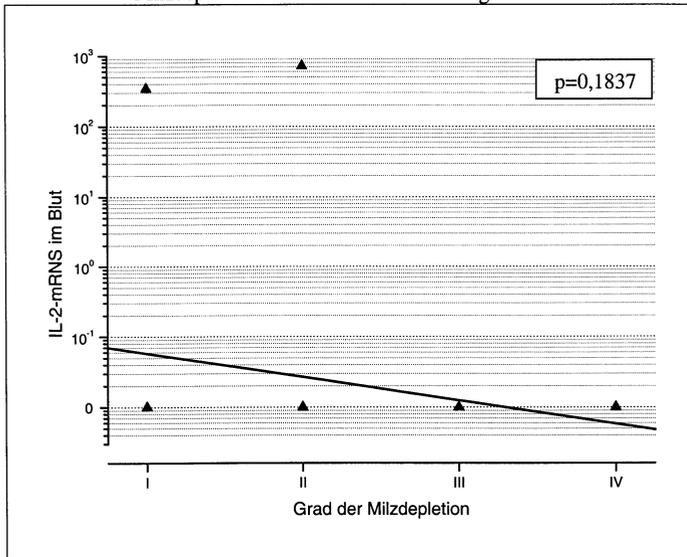


Abbildung 42: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen dem Grad der Milzdepletion und der IL-4-mRNS-Menge im Blut

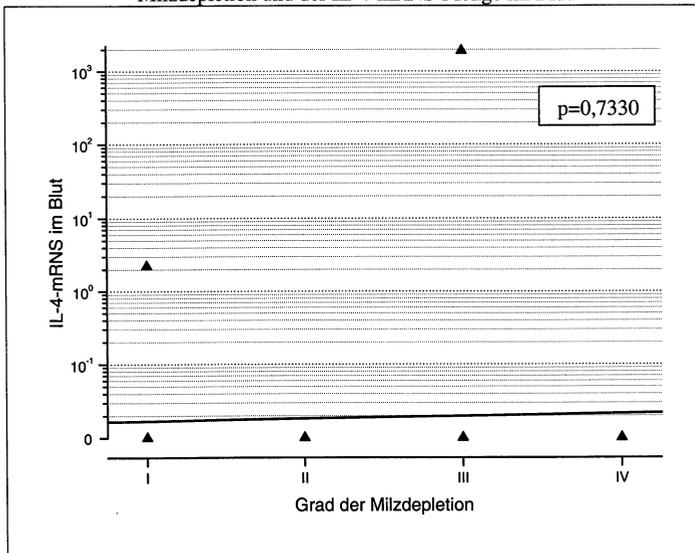


Abbildung 43: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen dem Grad der Milzdepletion und der IL-6-mRNS-Menge im Blut

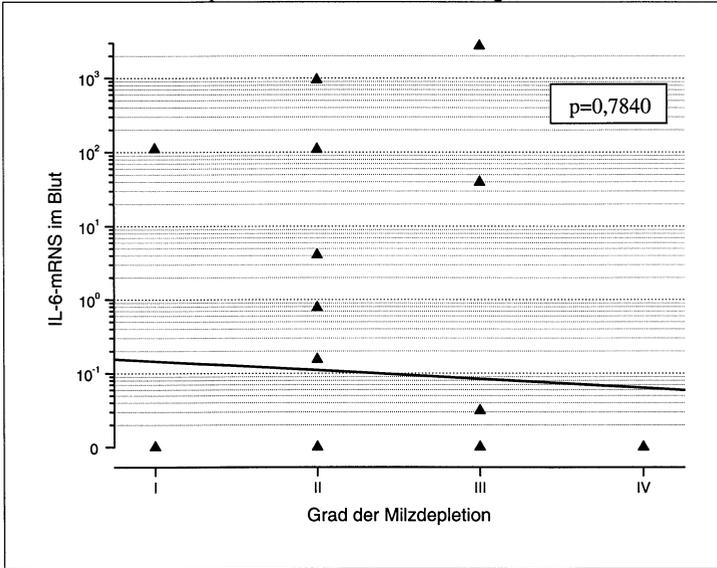


Abbildung 44: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen dem Grad der Milzdepletion und der IL-10-mRNS-Menge im Blut

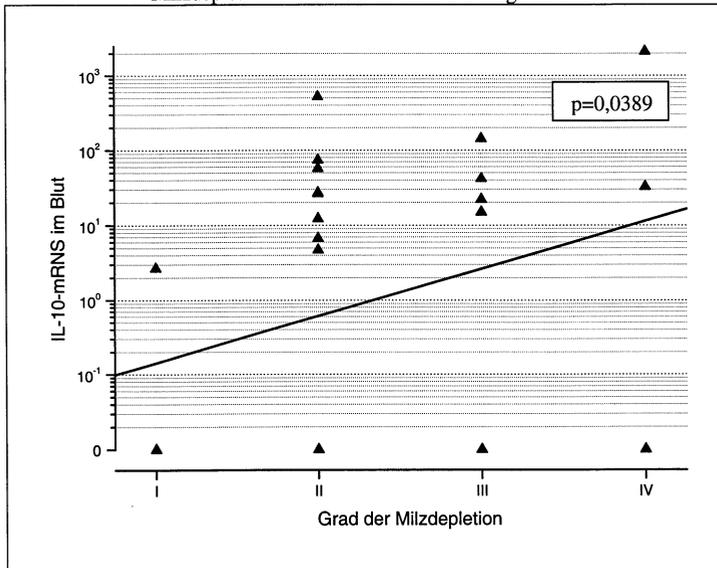


Abbildung 45: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen dem Grad der Milzdepletion und der TGF- β -mRNS-Menge im Blut

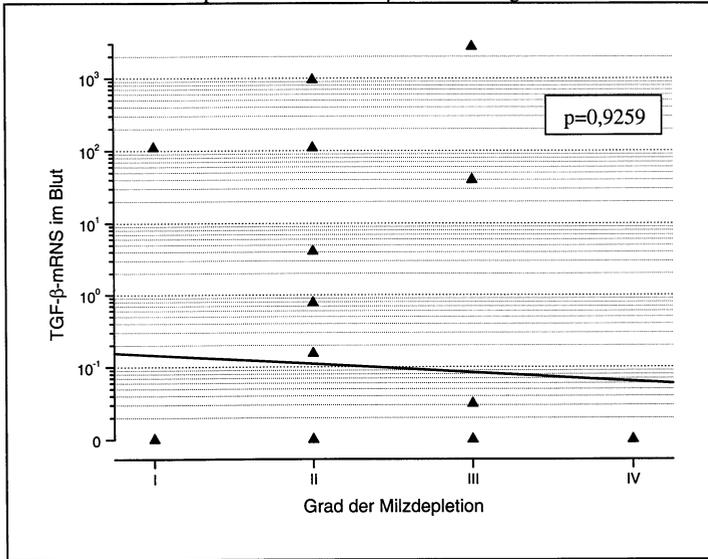
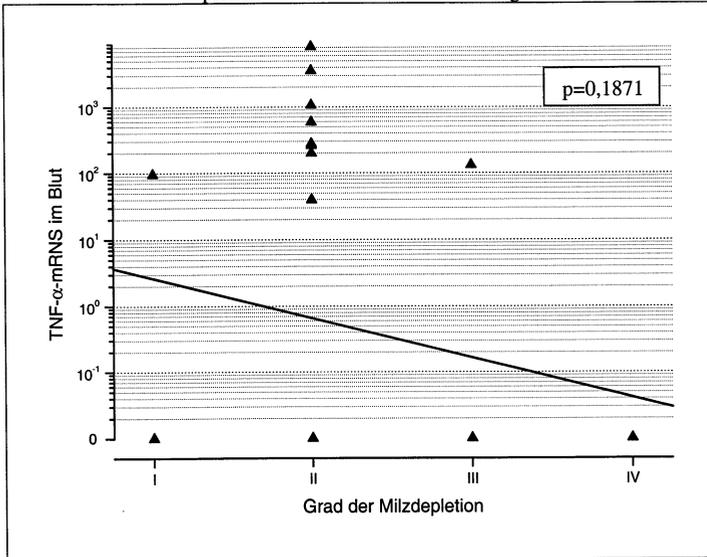


Abbildung 46: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen dem Grad der Milzdepletion und der TNF- α -mRNS-Menge im Blut



Die statistische Analyse zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen der mRNA-Menge von IL-10 im Blut und dem Grad der Milzdepletion (Gruppe I bis IV). Die mRNA-Mengen der weiteren pro- und anti-inflammatorischen Zytokine wiesen keine signifikanten Zusammenhänge mit der Milzdepletion auf (Tabelle 16).

Tabelle 16: Korrelation zwischen dem Grad der Milzdepletion (Gruppe I bis IV) und der Zytokin-mRNA-Menge im Blut der Schweinswale (n=29)

Zytokin	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	Signifikanz ($p \leq 0,05$)
IL-2	$r_s = -0,2540$	$p = 0,1837$
IL-4	$r_s = 0,0289$	$p = 0,7330$
IL-6	$r_s = -0,0532$	$p = 0,7840$
IL-10	$r_s = 0,3855$	$p = 0,0389$
TGF- β	$r_s = -0,0181$	$p = 0,9259$
TNF- α	$r_s = -0,2521$	$p = 0,1871$

4.3. Ergebnisse der pathologischen und mikrobiologischen Untersuchungen

Insgesamt wurden 61 Schweinswale aus der Nord- und Ostsee sowie aus norwegischen und isländischen Gewässern obduziert. Hiervon waren 51 beifangene und zehn gestrandete Tiere. Die pathologischen Befunde und mikrobiologischen Ergebnisse sind in Anhang 1 dargestellt.

4.3.1. Pathologische Untersuchungen

Von den untersuchten Organsystemen war der **Atmungsapparat** am häufigsten betroffen. Insgesamt 42 Schweinswale (42/61; 68,9%) wiesen unterschiedlich ausgeprägte, katarrhalisch-eitrige bzw. granulomatöse Bronchopneumonien auf. In den meisten Fällen waren diese mit einer Nematodeninfestation (*Pseudalius infexus*, *Torynurus convolutus*) in den Bronchien und der Arteria pulmonalis vergesellschaftet (Abbildungen 47 und 48). Diese Tiere wiesen unterschiedlich ausgeprägte, akute Stauungshyperämien und akute, diffuse, alveoläre Ödeme der Lunge auf. Weiterhin konnten akute Stauungshyperämien bzw. akute, diffuse, alveoläre Lungenödeme bei 13 Tieren ohne pneumonische Veränderungen

nachgewiesen werden (13/61; 21,3%). Pulmonale Blutungen lagen bei zwei Tieren vor (pp1423; pp1521). Insgesamt zeigten zwei neugeborene Wale eine Atelektase bzw. Dystelektase der Lunge (pp1715; HDW14). Weiterhin lag bei einem Neonaten der Verdacht auf eine Fruchtwasseraspiration vor (pp1473).



Abbildung 47: Lunge; pyogranulomatöse Bronchopneumonie mit adulten Nematoden im Parenchym. Hämatoxylin-Eosin; Balken=110 μ m.

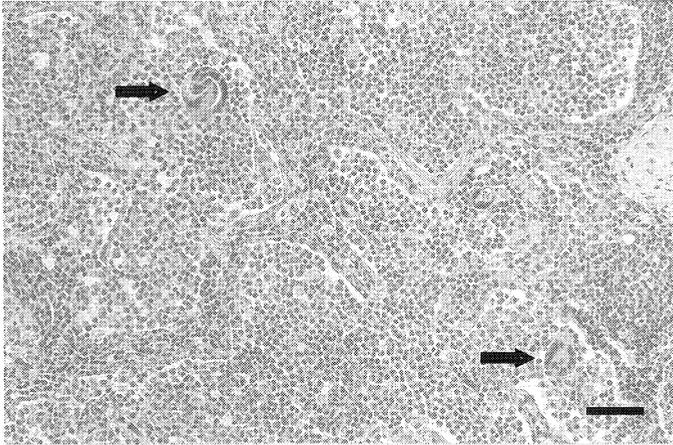


Abbildung 48: Lunge; pyogranulomatöse Bronchopneumonie mit Nematodenlarven (Pfeil) im Parenchym. Hämatoxylin-Eosin; Balken=60 μ m.

Eine lymphoplasmazelluläre bis granulomatöse **Cholangitis** und/oder **Pericholangitis**, assoziiert mit einem Trematodenbefall (*Campula oblonga*), konnte bei 29 Tieren nachgewiesen werden (29/61; 47,5%). Zwei Tiere wiesen eine gemischtzellige bzw. lymphoplasmazelluläre Hepatitis auf (pp1517; pp1700). Degenerative Veränderungen fanden sich bei 14 Tieren mit einer kleintropfigen bzw. großtropfigen Verfettung der Hepatozyten (14/61; 23,0%; Abbildung 49). Bei zwei Tieren lagen Einzelzellnekrosen in der Leber vor (pp1700; HDW1). In 12 Fällen waren die entzündlichen bzw. degenerativen Veränderungen mit einer Fibrose und/oder Gallengangsproliferation vergesellschaftet (12/61; 19,7%).

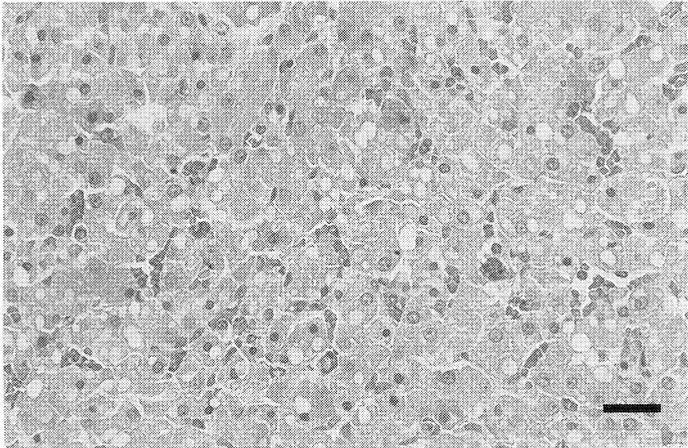


Abbildung 49: Leber; diffuse gemischtropfige Verfettung der Hepatozyten. Hämatoxylin-Eosin; Balken=30 μ m.

Unterschiedlich ausgeprägte lymphozytäre bis granulomatöse **Pankreatitiden**, bedingt durch eine Infestation mit *Campula oblonga*, lagen bei sieben Walen vor (7/61; 11,5%; Abbildung 50). Weiterhin konnte in zwei Fällen eine interstitielle Fibrosierung des Parenchyms nachgewiesen werden (pp1511; pp1525).

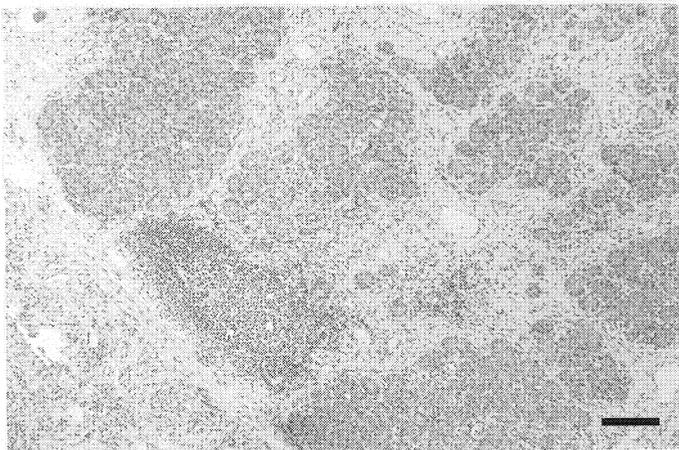


Abbildung 50: Pankreas; chronische lymphoplasmazelluläre Pankreatitis. Hämatoxylin-Eosin; Balken=110 μ m.

Fokale bis multifokale, ulzerative **Gastritiden** lagen bei 23 der untersuchten Tiere (23/61; 37,7%) vor. Die meisten Veränderungen fanden sich im ersten Magenkompartiment in Verbindung mit einem Nematodenbefall (*Anisakis simplex*; *Stenurus minor*; Abbildung 51). Bei einem Wal konnte lediglich eine Hyperkeratose der Mukosa in diesem Abschnitt des Magens nachgewiesen werden (pp1527). Jeweils ein Tier wies eine fokale, granulomatöse bzw. multifokale, ulzerative Ösophagitis auf (pp1506, HDW15). Weiterhin zeigte jeweils ein Tier eine akute, diffuse, katarrhalische Enteritis (pp1512) bzw. eine ulzerative, transmurale Enteritis (pp1640). Bei einem Tier lag der Verdacht auf einzelne Kryptabszesse im Darm vor (pp1720).

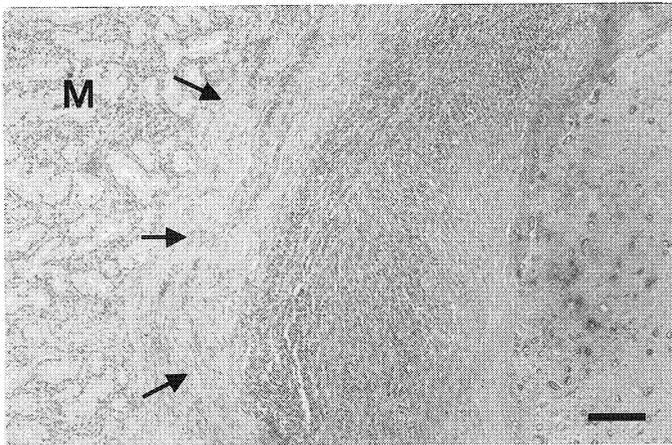


Abbildung 51: Magen; chronische lymphohistiozytäre Gastritis (Pfeil) bedingt durch Nematoden. M=Mukosa; Hämatoxylin-Eosin; Balken=110 μ m.

Subkapsuläre Nierenblutungen konnten bei einem Tier nachgewiesen werden (pp1423). Weiterhin fand sich in einem Fall eine Verfettung der Tubulusepithelzellen der Nieren (pp1640). Jeweils bei einem Tier lag eine eitrig-nekrotisierende Nephritis bzw. chronische, lymphozytäre Urethritis vor (pp1642; pp1666).

Vorwiegend nicht-eitrig oder nekrotisierende Vaginitiden fanden sich bei vier Walen (pp1527; pp1658; pp1662; pp1670). Weiterhin konnte in jeweils einem Fall eine chronische, eitrig Endometritis bzw. eine chronische, lymphohistiozytäre Mastitis nachgewiesen werden (pp1661, pp1507).

Blutungen bzw. Hämatome in der Subkutis lagen bei 14 beigefangenen Schweinswalen vor (14/61; 23,0%). Weiterhin zeigten zwei Tiere ein disseminierte, ulzerative Dermatitis (HDW1) bzw. eine pyogranulomatös-nekrotisierende Dermatitis (HDW7; Abbildung 52).

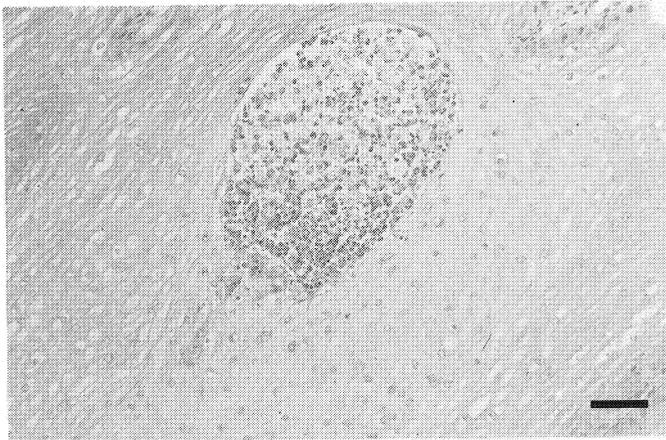


Abbildung 52: Haut; epidermale Pustel. Hämatoxylin-Eosin; Balken=60 μ m.

Multiple Blutungen im **Zentralnervensystem** (ZNS) fanden sich in sieben der untersuchten Fälle (7/61; 11,5%). Bei jeweils einem Tier lagen neben den zerebralen Blutungen zusätzlich spinale (pp1504) sowie leptomeningeale Blutungen (pp1511) vor. Ein Schweinswal wies eine herdförmige, nicht-eitrige Panenzephalitis auf (pp1642; Abbildung 53). Die chondroide Metaplasie des Nucleus pulposus der Wirbelsäule war mit keinen degenerativen Veränderungen des Rückenmarkes vergesellschaftet (pp1500).

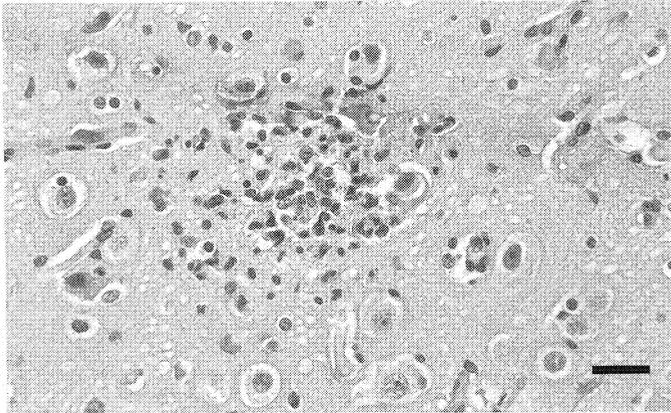


Abbildung 53: Gehirn; fokale nicht-eitrige Enzephalitis.
Hämatoxylin-Eosin; Balken= 30 μ m.

Uni- oder bilaterale Blutungen in die Augenkammern (Hyphaema) lagen bei drei beigefangenen Tieren vor (pp1500, pp1502; pp1508). Bei einem Wal konnte eine beidseitige, fokale, ulzerative Keratitis sowie ein rechtseitiges Hypopyon nachgewiesen werden (HDW7). Weiterhin wies ein Tier perforierende Hornhautulzera beider Augen auf (pp1509).

Bei jeweils einem Wal fanden sich fokale, myokardiale Blutungen mit Einzelfasernekrosen (pp1670) bzw. multifokale, periaortale (pp1423) Blutungen. Bei einem Schweinswal konnte eine eitrig-abzedierende Myokarditis mit Drusenbildung und eine chronische, fibrinös-eitrige Epikarditis nachgewiesen werden (pp1481). Weiterhin lag in einem Fall eine diffuse, fibrinöse Perikarditis vor (HDW15).

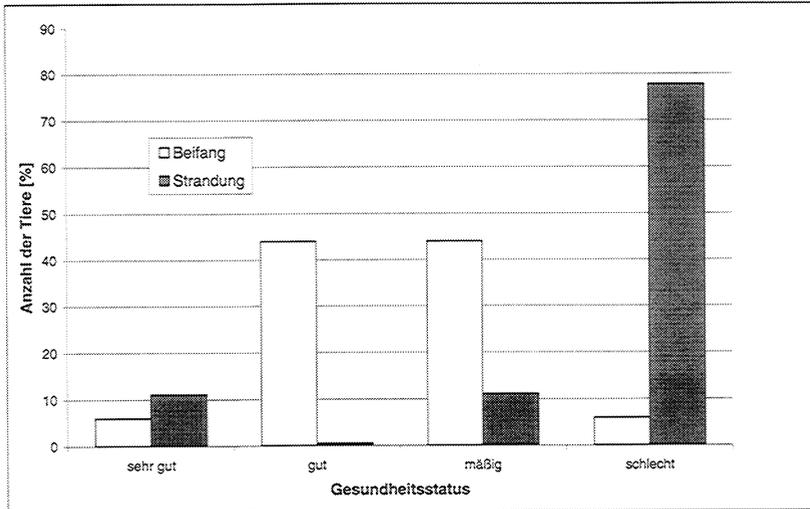
Eine diffuse, fibrinös-eitrige **Peritonitis** und fibrinöse **Pleuritis** wurden bei einem Tier diagnostiziert (pp1481). Weiterhin lag bei einem Wal eine diffuse, fibrinöse Peritonitis vor (pp1640).

Basierend auf dem Schweregrad der pathologischen Hauptveränderungen und des Ernährungszustandes konnte der Gesundheitsstatus von 59 der insgesamt 61 Schweinswale ermittelt werden (Anhang 1). Bei zwei Tieren lag eine hochgradige Abmagerung ohne erkennbare Grunderkrankung vor (pp1348, pp1680).

Einen sehr guten Gesundheitsstatus wiesen insgesamt 6,8% der Tiere (4/59) mit einem sehr guten bis guten Ernährungszustand und keinen entzündlichen Lungenveränderungen auf. Insgesamt 39,0% der Tiere (23/59) zeigten einen guten Gesundheitsstatus. Diese Tiere wiesen einen guten Ernährungszustand sowie keine oder geringgradige, pneumonische Veränderungen auf. Ein mäßiger Gesundheitsstatus lag bei 37,3% der Tiere (22/59) vor. Diese Schweinswale besaßen einen guten bis mäßigen Ernährungszustand in Verbindung mit mittelgradigen, pneumonischen Veränderungen. Weiterhin wiesen 16,9% der Tiere (10/59) einen schlechten Gesundheitszustand auf. Hiervon zeigten fünf Tiere hochgradige, entzündliche Lungenveränderungen sowie einen guten bis mäßigen Ernährungszustand. Weiterhin wurde der Gesundheitszustand von drei hochgradig abgemagerten Tieren mit hochgradig, eitrig bis ulzerativen, disseminierten Dermatitiden bzw. einer mittelgradigen, pyogranulomatösen Bronchopneumonie als schlecht eingestuft. Weiterhin lag ein schlechter Gesundheitszustand bei einem gut genährten Schweinswal mit einer hochgradigen, diffusen, fibrinösen Peritonitis sowie bei einem sehr gut genährten Tier mit einer hochgradigen, diffusen, fibrinös-eitrigen Polyserositis und eitrig-abszedierenden Myokarditis vor.

Jeweils 44% der **beigefangenen** Schweinswale (22/50) wiesen einen guten bis mäßigen Gesundheitszustand auf. Bei jeweils 6% der beigefangenen Tiere (3/50) lag ein sehr guter bzw. ein schlechter Gesundheitszustand vor. Weiterhin zeigten jeweils 11,1% der **gestrandeten** Wale (1/9) einen sehr guten bzw. mäßigen Gesundheitszustand. Ein guter Gesundheitszustand lag bei keinem gestrandeten Schweinswal vor (0/9). Dagegen konnte bei 77,8% der gestrandeten Tiere (7/9) ein schlechter Gesundheitszustand diagnostiziert werden (Abbildung 54).

Abbildung 54: Gesundheitsstatus der gestrandeten und beigefangenen Schweinswale



4.3.2. Mikrobiologische Untersuchungen

Mikrobiologische Untersuchungen wurden an Gewebeproben von 57 Schweinswalen durchgeführt. Bei 19 Tieren konnte keine bakterielle Besiedlung der Organe festgestellt werden, während bei 33 Walen eine bakterielle Mischflora vorlag. In den meisten Fällen waren diese mit keinen pathologischen Organveränderungen assoziiert. Als Ursache der fibrinös-eitrigen Polyserositis und eitrig-abszedierenden Myokarditis wurde eine Infektion mit *Staphylococcus aureus* nachgewiesen (pp1481). Außerdem konnte eine Mitbeteiligung von *Clostridium perfringens* bei der ulzerativen transmuralen Enteritis nicht ausgeschlossen werden (pp1640). Die pyogranulomatös-nekrotisierende Dermatitis (HDW7) war mit einer Streptokokken-Infektion vergesellschaftet. Weiterhin konnten bei der fibrinös-eitrigen Pleuropneumonie β -hämolyisierende *Escherichia coli* isoliert werden (HDW15).

4.4. Auswertung der histologischen Veränderungen in Thymus und Milz

4.4.1. Thymus

Die Thymi von 61 Schweinswalen wurden histologisch untersucht und anhand morphologischer Kriterien in nicht-, gering-, mittel- und hochgradig atrophiert eingeteilt (Gruppe I bis IV; Anhang 1).

Nicht-depletierte Thymi mit einer deutlichen Differenzierung der Mark-Rindengrenze sowie keiner bzw. nur sehr geringgradigen Zunahme des interlobulären Bindegewebes fanden sich bei 22 Tieren (**Gruppe I; 36,1%**). Der Kortex war stets breiter als die Medulla (durchschnittliches Mark-Rindenverhältnis 2:1). Zwei dieser Tier zeigten einzelne bzw. multiple Blutungen im Thymus (pp1512, pp1423).

Achtzehn Tiere wiesen einen geringgradigen Depletionsgrad des Thymus auf. Sie zeigten eine dezente Zunahme des interlobulären Bindegewebes in Verbindung mit einer vollständig erhaltenen Mark-Rindengrenze (**Gruppe II; 29,5%**). Nur bei einem Tier dieser Gruppe lag das Rinden-Markverhältnis bei 1:1 (pp1524).

Mittelgradige Depletionen mit ausgeprägter Zunahme des interlobulären Bindegewebes und undeutlicher Differenzierung der Mark-Rindengrenze fanden sich bei 13 Tieren (**Gruppe III; 21,3%**). Die verkleinerten Läppchen wiesen ein durchschnittliches Rinden-Markverhältnis von 1:1 auf.

Bei acht Schweinswalen lag eine hochgradige Thymusatrophie vor (**Gruppe IV; 13,1%**). Die Organe zeigten deutlich reduzierte Läppchengrößen und eine hochgradige Zunahme des interlobulären Bindegewebes. Eine Differenzierung der Mark-Rindengrenze war aufgrund des fortgeschrittenen Verlustes kortikaler Lymphozyten nur erschwert möglich. Zwei Thymi zeigten eine inverse Struktur mit Sichtbarwerden der kortikalen Stromazellen (HDW1, HDW15).

Sieben Thymi der Gruppe I (pp1328, pp1500, pp1502, pp1504, pp1510, pp1512, pp1516) und 11 Thymi der Gruppe II (pp1503, pp1506, pp1507, pp1514, pp1517, pp1524, pp1525, pp1531, pp1532, pp1534, pp1536) wiesen einzelne Mikrozysten auf. Ebenfalls fanden sich in

sechs Thymi der Gruppe III (pp1515, pp1520, pp1523, pp1528, pp1533, pp1535) und in zwei Thymi der Gruppe IV (pp1366, pp1527) einzelne Mikrozysten. Das Auftreten der Zysten war in keinem Fall mit einer Kompression des umliegenden Parenchyms vergesellschaftet (Abbildung 55). Bis auf eine Ausnahme (pp1641) fanden sich in der Medulla aller Thymi mehrere Hassallsche Körperchen.

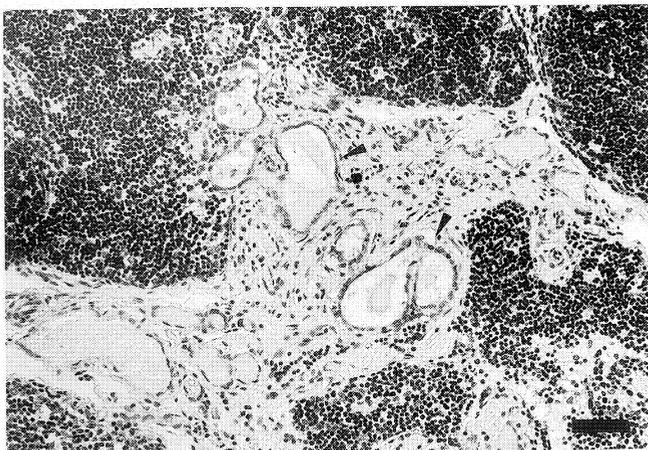
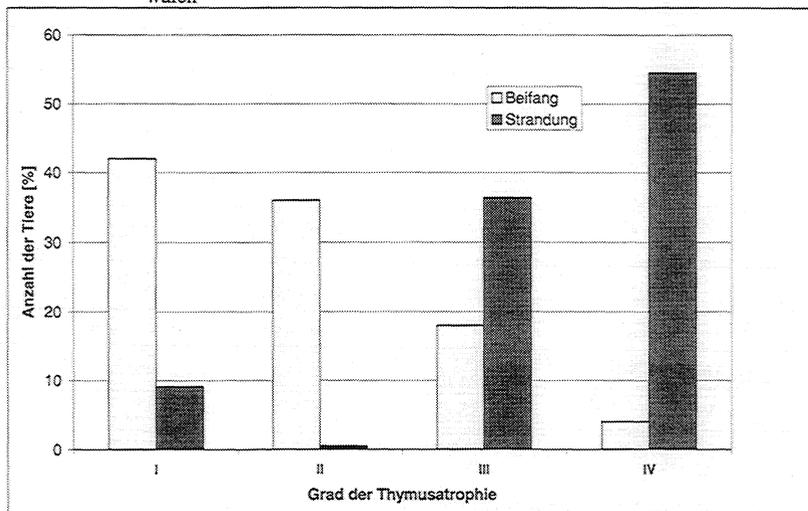


Abbildung 55: Multiple Mikrozysten (Pfeil) im interlobulären Bindegewebe eines geringgradig atrophischen Thymus. Hämatoxylin-Eosin; Balken=60 μ m.

Nicht und geringgradig atrophierte Thymi konnten bei 42% bzw. 36% der **beigefangenen** Schweinswale (21/50 bzw. 18/50) nachgewiesen werden. Eine mittel- bis hochgradige Thymusatrophie lag bei 18 % bzw. 4% der beigefangenen Tiere (9/50 bzw. 2/50) vor (Abbildung 56).

Im Vergleich zeigten 9,1% der **gestrandeten** Schweinswale (1/11) einen nicht-atrophierten Thymus. In keinem Fall konnte eine geringgradige Thymusatrophie (0/11) nachgewiesen werden. Weiterhin lag bei 36,4% und 54,5% der gestrandeten Schweinswale (4/11 und 6/11) eine mittel- bzw. hochgradige Thymusatrophie vor (Abbildung 56).

Abbildung 56: Thymusatrophie in gestrandeten und beigefangenen Schweinswalen



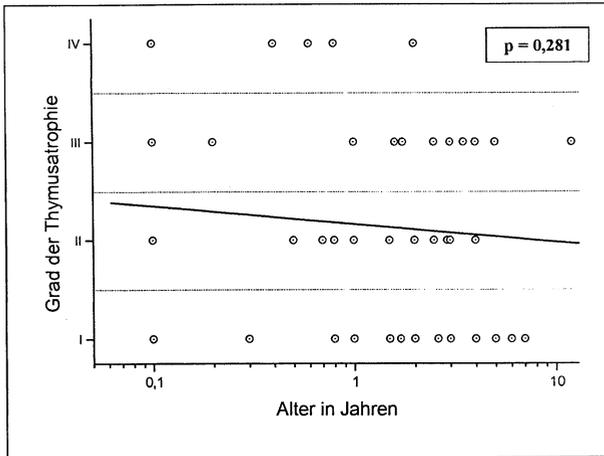
Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung (Rangkorrelationsanalyse nach Spearman) zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen einem schlechten Ernährungs- bzw. Gesundheitszustand und der Thymusatrophie. Der Einfluss des Alters der Tiere auf Thymusveränderungen war nicht signifikant (Tabelle 17; Abbildung 57).

Tabelle 17: Rangkorrelationsanalyse nach Spearman: Zusammenhang der Thymusatrophie mit dem Ernährungszustand, Gesundheitszustand und dem Alter der Tiere

	Anzahl der untersuchten Tiere	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	Signifikanz ($p \leq 0,05$)
Ernährungszustand	N=61	$r_s = 0,336$	$p=0,007$
Gesundheitsstatus	N=59	$r_s = 0,424$	$p=0,001$
Alter	N=61	$r_s = -0,139$	$p=0,281$

Abbildung 57: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen dem Alter der Tiere und dem Grad der Thymusatrophie



4.4.2. Milz

Die Milzen von 52 Schweinswalen wurden histologisch untersucht und aufgrund morphologischer Kriterien in nicht-, gering-, mittel- und hochgradig depletiert eingeteilt (Gruppe I bis IV; Anhang 1).

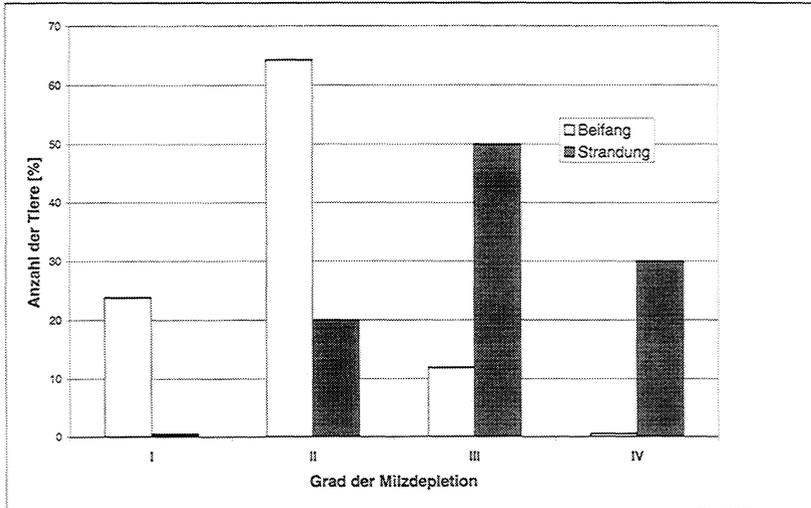
Zahlreiche Sekundär- und Primärfollikel in Verbindung mit einer deutlich ausgeprägten, mehrschichtigen PALS fanden sich in 10 Milzen (**Gruppe I; 19,2%**).

Insgesamt 29 Milzen wiesen einige Sekundär- und Primärfollikel mit einer mehrschichtigen PALS auf (**Gruppe II; 55,8%**). Bei einem Schweinswal der Gruppe II lagen multiple Follikelnekrosen der Milz vor (pp1507).

Eine mittelgradige Milzdepletion lag bei 10 Tieren vor (**Gruppe III; 19,2%**). Die weiße Pulpa bestand aus nur wenigen Primärfollikel. Weiterhin wies die PALS einen deutlichen Zellverlust auf.

Aufgrund des Vorliegens von nur wenigen, kleinen Primärfollikeln und einer undeutlich ausgeprägten PALS wurden insgesamt 3 Milzen als hochgradig depletiert eingestuft (**Gruppe IV; 5,8%**).

Abbildung 58: Milzdepletion in gestrandeten und beifangenen Schweinswalen



Nicht bzw. geringgradig depletierte Milzen lagen bei 23,8% und 64,3% der **beifangenen** Schweinswale (10/42 und 27/42) vor. Weiterhin fand sich bei 11,9% der beifangenen Tiere eine mittelgradige Milzdepletion (5/42). Eine hochgradige Milzdepletion konnte in keinem beifangenen Wal (0/42) nachgewiesen werden (Abbildung 58).

Eine nicht-depletierte Milz lag in keinem **gestrandeten** Schweinswal (0/10) vor. 20% der gestrandeten Tiere (2/10) wiesen eine geringgradige Milzdepletion auf. Eine mittel- bis hochgradige Milzdepletion fand sich bei 50% bzw. 30% der gestrandeten Wale (5/10 bzw. 3/10; Abbildung 58).

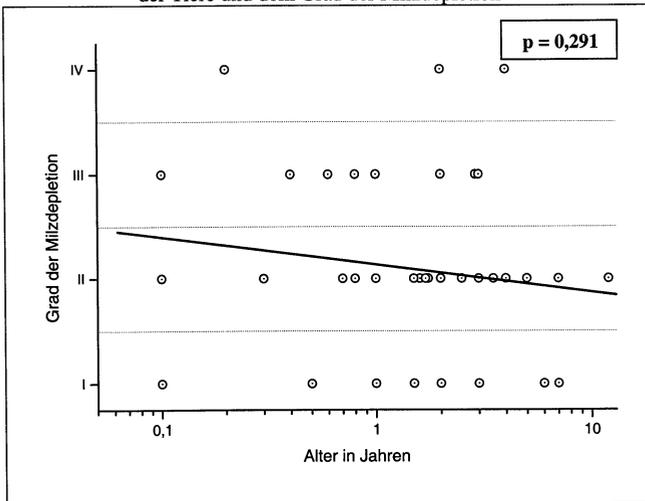
Statistische Auswertung

Die Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zeigte einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen der zunehmenden Milzdepletion und der Verschlechterung des Gesundheitsstatus bzw. Ernährungszustandes. Für das Alter der Tiere konnte kein signifikanter Einfluss auf Milzdepletion festgestellt werden (Tabelle 18; Abbildung 59).

Tabelle 18: Rangkorrelationsanalyse nach Spearman: Zusammenhang der Milzdepletion mit dem Ernährungszustand, Gesundheitszustand und dem Alter der Tiere

	Anzahl der untersuchten Tiere	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	Signifikanz ($p \leq 0,05$)
Gesundheitsstatus	n=50	$r_s = 0,515$	p= 0,001
Ernährungszustand	n=52	$r_s = 0,531$	p= 0,001
Alter	n=50	$r_s = -0,152$	p=0,291

Abbildung 59: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen dem Alter der Tiere und dem Grad der Milzdepletion



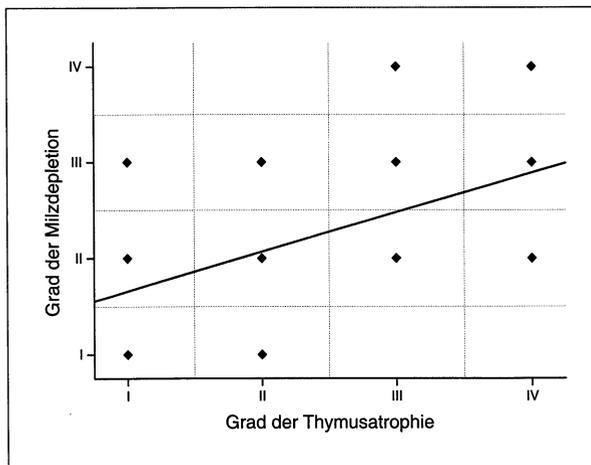
4.4.3. Gegenüberstellung von Thymusatrophie und Milzdepletion

Eine Gegenüberstellung der Thymusatrophie und Milzdepletion zeigte, dass insgesamt acht Tiere (36,4%) mit vollständig ausgeprägten Thymi (Gruppe I; n=22) auch eine intakte Milz aufwiesen, während neun Milzen (9/22; 40,9%) eine geringgradige und zwei Milzen (2/22; 9,1%) eine mittelgradige Depletion zeigten. Weiterhin konnte bei jeweils zwei Tieren mit einer geringgradigen Thymusatrophie (Gruppe II; n=18) eine deutlich ausgeprägte bzw. mittelgradig depletierte Milz (2/18; 11,1%) nachgewiesen werden. In 12 Milzen (12/18; 66,7%) der Tiere mit einer geringgradigen Thymusatrophie lag eine geringgradige Depletion vor. Eine mittelgradige Thymusatrophie (Gruppe III; n=13) war in sechs Fällen (6/13; 46,2%) mit einer geringgradig depletierten Milz und in einem Fall (1/13; 7,7%) mit einer mittelgradig depletierten Milz vergesellschaftet. Insgesamt zwei Milzen (2/13; 15,4%) der Tiere mit einer mittelgradigen Thymusatrophie wiesen eine hochgradige Depletion auf. Während zwei Tiere (2/8; 25%) mit einer hochgradigen Thymusatrophie (Gruppe IV; n=8) geringgradig depletierte Milzen aufwiesen, wurden fünf Milzen (5/8; 62,5%) dieser Gruppe als mittelgradig und eine Milz (1/8; 12,5%) als hochgradig depletiert eingestuft.

Statistische Auswertung

Die Rangkorrelationsanalyse zeigte eine hochsignifikante, positive Korrelation zwischen dem Grad der Thymusatrophie und der Milzdepletion ($p=0,001$; Abbildung 60).

Abbildung 60: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen Thymusatrophie und Milzdepletion



4.5. Zusammenhang zwischen Thymusatrophie und Schadstoffbelastung

Zur Untersuchung des Einflusses von PCB, DDE, DDT, Toxaphen und PBDE auf lymphatische Organe wurden die Ergebnisse der histologischen Auswertungen von 61 Thymi gestrandeter und beigefangener Schweinswal (Anhang 1) mit den Ergebnissen der toxikologischen Analysen korreliert (Anhang 3).

Die Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zeigte einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen dem Grad der Thymusatrophie und ansteigenden PCB und PBDE-Konzentrationen (Abbildungen 61 und 62). Zusätzlich fand sich eine signifikante Verbindung zwischen der Thymusatrophie und erhöhten Toxizitätsäquivalenten (TEQ). Die Konzentrationen von DDE, DDT und Toxaphen wiesen keine Signifikanzen mit der Thymusatrophie auf (Abbildungen 63 bis 65; Tabelle 19).

Tabelle 19: Rangkorrelationsanalyse nach Spearman: Zusammenhang zwischen Thymusatrophie und Schadstoffbelastung

	<i>Anzahl der untersuchten Tiere</i>	<i>Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman</i>	<i>Signifikanz ($p \leq 0,05$)</i>
PCB	n=59	$r_s = 0,347$	p=0,006
DDE	n=59	$r_s = 0,167$	p=0,195
DDT	n=59	$r_s = 0,131$	p=0,311
Toxaphen	n=53	$r_s = 0,062$	p=0,647
PBDE	n=52	$r_s = 0,505$	p=0,001
TEQ [PCB]	n=58	$r_s = 0,343$	p=0,008

Abbildung 61: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen dem Grad der Thymusatrophie und dem PCB-Gehalt im Fettgewebe

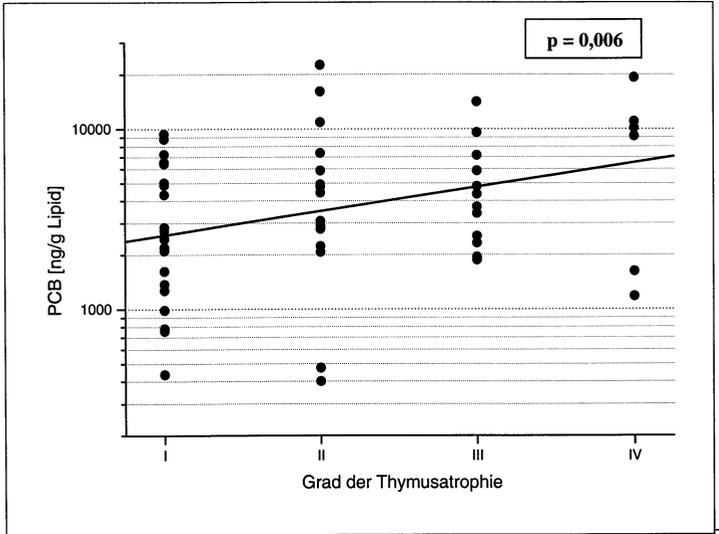


Abbildung 62: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen dem Grad der Thymusatrophie und dem PBDE-Gehalt im Fettgewebe

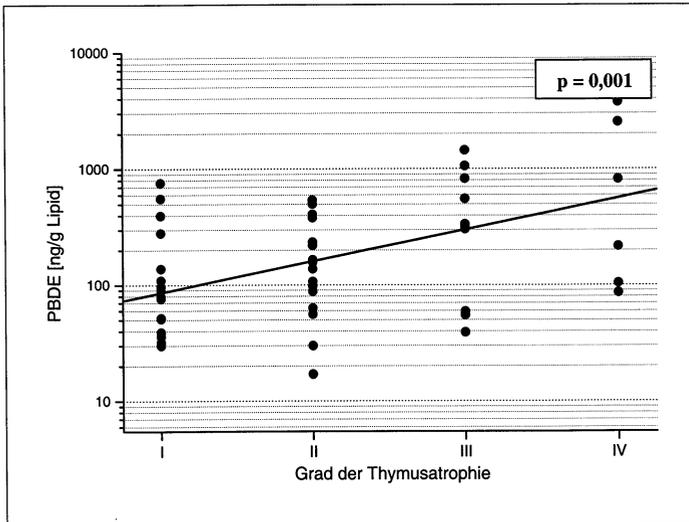


Abbildung 63: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen dem Grad der Thymusatrophie und dem DDE-Gehalt im Fettgewebe

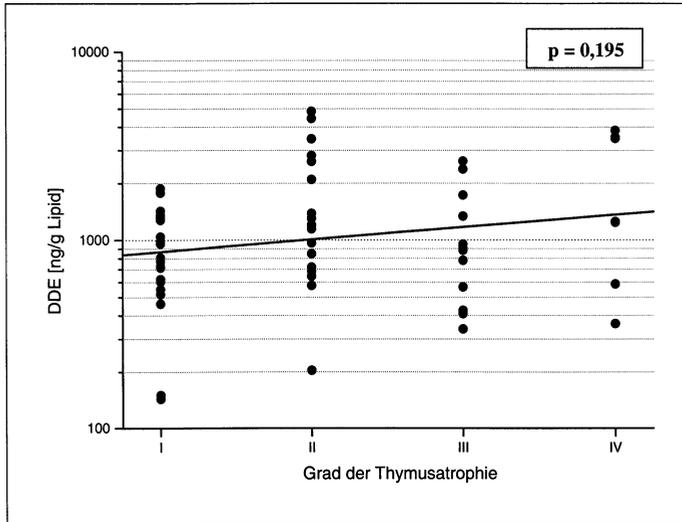


Abbildung 64: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen dem Grad der Thymusatrophie und dem DDT-Gehalt im Fettgewebe

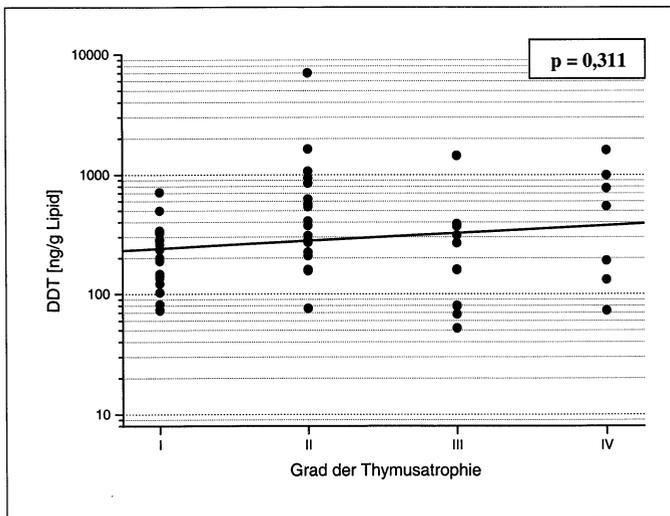
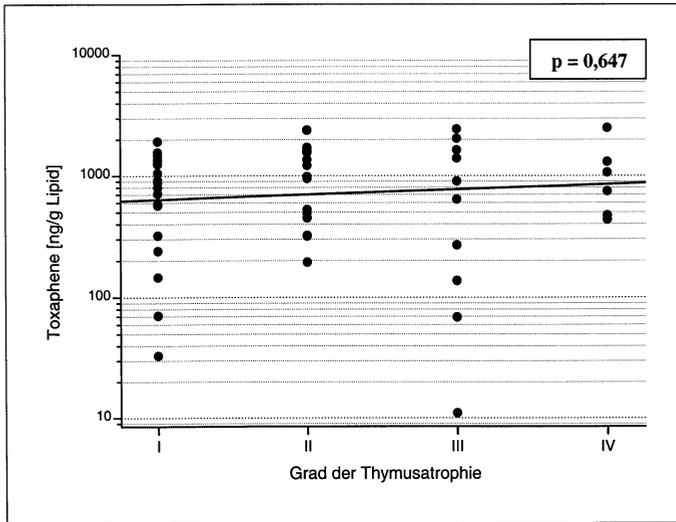


Abbildung 65: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen dem Grad der Thymusatrophie und dem Toxaphen-Gehalt im Fettgewebe



Der Thymus unterliegt verschiedenen Einflüssen, welche in der Pathogenese der Thymusatrophie berücksichtigt werden müssen. Bei der statistischen Analyse mittels der schrittweisen polytomen logistischen Regression wurden die Schadstoffkonzentrationen als Einflussgrößen einkalkuliert. Zur Untersuchung der Wechselwirkung der Schadstoffe mit verschiedenen Einflussfaktoren wurde in diesem Rechenmodell zusätzlich das Alter, das Geschlecht, der Gesundheitsstatus und die Herkunft der Tiere (Kontrollvariable) berücksichtigt.

Die ansteigende PBDE-Konzentration wies einen statistisch gesicherten Zusammenhang mit dem Grad der Thymusatrophie auf (Chancenverhältnis: 6,7). Weiterhin zeigte der Gesundheitsstatus eine statistisch gesicherte Verbindung mit der Thymusatrophie (Chancenverhältnis: 1,9). Für das Alter konnte eine negative Korrelation mit der Thymusatrophie nachgewiesen werden (Chancenverhältnis: 0,2). Die Herkunft und das Geschlecht der Wale sowie die Konzentrationen an Toxaphen, DDE und DDT zeigten keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 20).

Tabelle 20: Schrittweise polytome logistische Regression: Zusammenhang zwischen Schadstoffbelastung und Thymusatrophie unter Berücksichtigung verschiedener Kontrollvariablen

	p-Wert	Chancenverhältnis („odds ratio“)
Geschlecht	0,669	-
Herkunft	0,692	-
Gesundheitsstatus	0,074	1,9
Alter	0,014	0,2
PCB	0,807	-
DDE	0,797	-
DDT	0,642	-
Toxaphen	0,850	-
PBDE	0,001	6,7

lg= Logarithmus; -= Variable wurde eliminiert

4.6. Zusammenhang zwischen Milzdepletion und Schadstoffbelastung

Zur Untersuchung des Einflusses von PCB, DDT, DDE, Toxaphen und PBDE auf sekundäre lymphatische Organe wurden insgesamt 52 Milzen von beigefangenen und gestrandeten Schweinswalen aus isländischen und norwegischen Gewässern sowie aus der Nord- und Ostsee histologisch untersucht (Anhang 1). Der Grad der Milzdepletion wurde mit den Ergebnissen der toxikologischen Analysen korreliert (Anhang 3).

Die Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zeigte signifikante Zusammenhänge der Milzdepletion mit erhöhten PCB- und PBDE-Konzentrationen (Abbildungen 66 und 67). Weiterhin fand sich eine signifikante Verbindung zwischen der Milzdepletion und den Toxizitätsäquivalenten (TEQ). Die Konzentrationen an DDE, DDT und Toxaphen sowie das Alter der Tiere zeigten keinen statistischen Gruppenunterschiede (Abbildungen 68 bis 70; Tabelle 21).

Tabelle 21: Rangkorrelationsanalyse nach Spearman: Zusammenhang zwischen Milzdepletion und Schadstoffbelastung

	Anzahl der untersuchten Tiere	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	Signifikanz ($p \leq 0,05$)
PCB	n=50	$r_s = 0,355$	p=0,011
DDE	n=50	$r_s = 0,096$	p=0,510
DDT	n=50	$r_s = 0,056$	p=0,699
Toxaphene	n=46	$r_s = 0,013$	p=0,934
PBDE	n=45	$r_s = 0,360$	p=0,007
TEQ [PCB]	n=50	$r_s = 0,414$	p=0,003

Abbildung 66: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen dem Grad der Milzdepletion und dem PCB-Gehalt im Fettgewebe

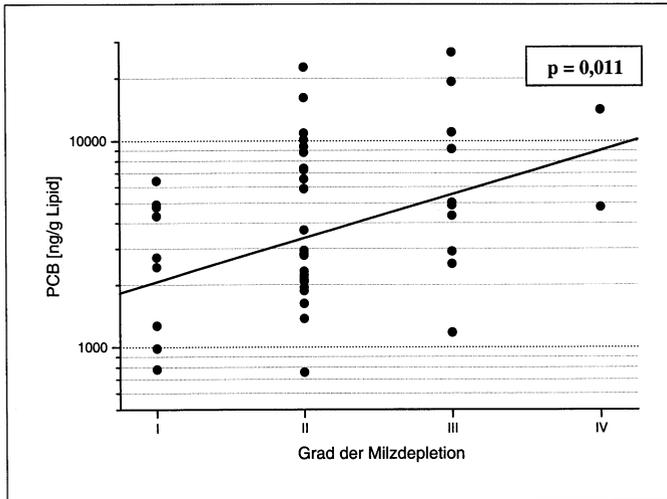


Abbildung 67: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen dem Grad der Milzdepletion und dem PBDE-Gehalt im Fettgewebe

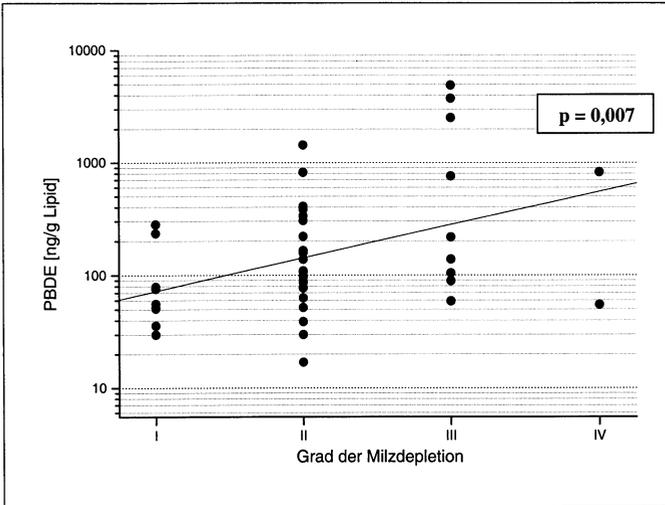


Abbildung 68: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen dem Grad der Milzdepletion und dem DDE-Gehalt im Fettgewebe

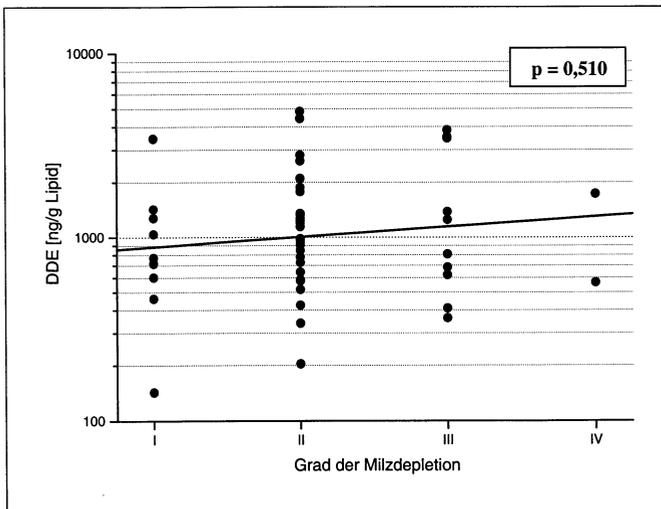


Abbildung 69: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen dem Grad der Milzdepletion und dem DDT-Gehalt im Fettgewebe

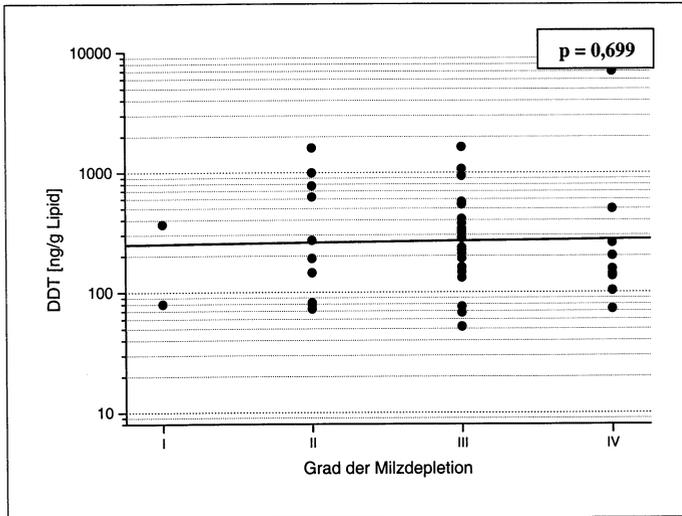
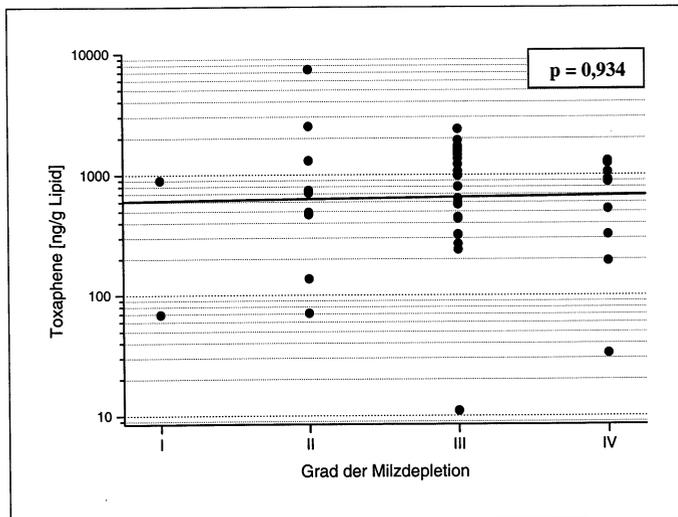


Abbildung 70: Korrelationsanalyse: Zusammenhang zwischen dem Grad der Milzdepletion und dem Toxaphen-Gehalt im Fettgewebe



Zur Berücksichtigung verschiedener Faktoren in der Entstehung der Milzdepletion wurde eine statistische Analyse mittels der schrittweisen polytomen logistischen Regression durchgeführt. Die Konzentrationen der Umweltchemikalien wurden als Einflussgrößen in das Rechenmodell einkalkuliert. Weiterhin wurden das Alter, das Geschlecht, der Gesundheitsstatus und die Herkunft der Tiere als Kontrollvariablen berücksichtigt.

Die statistische Auswertung zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen der zunehmenden Milzdepletion und der Verschlechterung des Gesundheitsstatus (Chancenverhältnis: 4). Alter, Geschlecht und Herkunft wiesen keine signifikanten Korrelationen mit der Milzdepletion auf. Weiterhin fanden sich in diesem Rechenmodell keine signifikanten Korrelationen zwischen der Schadstoffbelastung und der Milzdepletion (Tabelle 22).

Tabelle 22: Schrittweise polytome logistische Regression: Zusammenhang zwischen der Schadstoffbelastung und der Milzdepletion unter Berücksichtigung verschiedener Kontrollvariablen

	p-Wert	Chancenverhältnis („odds ratio“)
Gesundheitsstatus	0,004	4
Geschlecht	0,178	-
Herkunft	0,119	-
Alter	0,464	-
PCB	0,644	-
DDE	0,717	-
DDT	0,719	-
Toxaphen	0,384	-
PBDE	0,861	-

lg= Logarithmus; -= Variable wurde eliminiert

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in drei Abschnitte. Zur Charakterisierung von lymphatischen Organen wurden Antikörper unterschiedlicher Spezies auf ihre Kreuzreaktivität mit lymphatischen Zellen des Schweinswales getestet. Außerdem wurde ein Lymphozytenstimulationstest zur Messung der Mitogen-induzierten Proliferation von peripheren Blutlymphozyten sowie ein Nachweissystem ausgewählter Zytokine mittels RT-PCR etabliert. Im zweiten Abschnitt wurden immunphänotypische Veränderungen in Thymus und Milz sowie die Zytokin-Expression in diesen Organen und dem Blut der Schweinswale ermittelt. Im letzten Abschnitt wurde der Einfluss der Schadstoffbelastung unter Berücksichtigung des Alters, Ernährungs- und Gesundheitszustandes auf Thymus und Milz untersucht.

5.1. Etablierung der Methoden

5.1.1. Kreuzreaktionen verschiedener Leukozytenmarker unterschiedlicher Spezies zur Charakterisierung lymphatischer Organe des Schweinswales

Zum Nachweis von Lymphozyten-Subpopulationen in lymphatischen Organen des Schweinswales wurden Zellantigen-spezifische Antikörper unterschiedlicher Tierarten verwendet. Die Spezifität der Marker wurde durch den immunhistologischen Nachweis der Lymphozyten-Subpopulationen in den B- und T-Zellkompartimenten der lymphatischen Organe bestätigt.

Acht der insgesamt 26 untersuchten monoklonalen und polyklonalen Antikörper zeigten eine Kreuzreaktivität mit Zellen des Schweinswales. Klon CD3-12, ein spezifischer, gegen die ϵ -Kette des CD3-Komplexes gerichteter mAK, weist Kreuzreaktivitäten mit T-Lymphozyten zahlreicher verschiedener Spezies auf (Jones et al., 1993; Dr. E. Kremmer, GSF-National Research Center for Environment and Health, München, Deutschland; persönliche Mitteilung). In der vorliegenden Untersuchung wurde eine CD3-Expression in allen Thymus-stämmigen Zellen der lymphatischen Organe gefunden, so dass dieser Antikörper einen spezifischen T-Zellmarker in lymphatischen Organen des Schweinswales darstellt. Zusätzlich wurde das T-Zellantigen von dem polyklonalen anti-CD3-Antikörper erkannt. Weiterhin stellen die beiden walspezifischen Antikörper, welche das Homolog des CD2-Antigens

erkennen, spezifische Marker für T-Lymphozyten dar. Dies unterscheidet sich von der Antigenverteilung in peripheren Blutlymphozyten des Belugawales, welcher das CD2-Antigen auf B- und T-Zellen exprimiert (De Guise et al., 1997a). Die geringere Dichte der spezifischen T-Zell-Antigene in kortikalen Thymozyten bzw. das partielle Fehlen einer Immunreaktivität der subkapsulären Zellen ist auf die zunehmende Differenzierung der Thymozyten in Richtung Medulla des Thymus zurückzuführen (Anderson et al., 1996). CD45R, eine Isoform des „leukocyte common antigen“ CD45, kann auf B- und naiven T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Eine ähnliche Verteilung findet sich in lymphatischen Organen des Großen Tümmlers (De Guise et al., 1998a). In der vorliegenden Arbeit wurden CD45R⁺/CD3ε⁻/CD2⁻-Zellen im Thymusmark als Ansammlungen von B-Lymphozyten interpretiert, welche unter anderem beim Hund beschrieben wurden (Wünschmann et al., 2000). Das MHC Klasse II-Antigen wird auf den meisten reifen Lymphozyten der Schweinswale exprimiert, was für eine kontinuierliche T-Zellaktivierung des Schweinswales spricht. Vergleichbare Verhältnisse finden sich beim Großen Tümmler (Romano et al., 1992), Belugawal (De Guise et al., 1997a), landlebenden Karnivoren (Doveren et al., 1985; Rideout et al., 1990) und Pferden (Barbis et al., 1994). Der kanine mAK (Klon Dog 26-1) erkennt MHC Klasse II-Moleküle auf B-Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen. Beim Menschen findet sich eine MHC Klasse II-Expression auf B-Zellen, Antigen-präsentierenden Zellen und aktivierten T-Lymphozyten (Hewitt und Feldman, 1989).

Die immunhistochemischen Untersuchungen verdeutlichen, dass Leukozytenmarker unterschiedlicher Tierarten eine spezifische Kreuzreaktion mit Zellen der lymphatischen Gewebe des Schweinswales aufweisen. Durch den Einsatz der verschiedenen monoklonalen und polyklonalen Antikörper ist es möglich, phänotypische Veränderungen in lymphatischen Geweben des Schweinswales näher zu charakterisieren. Weiterhin können mittels der Antikörper weitere Methoden, wie beispielsweise Western Blot-Analysen und durchflusszytometrische Nachweisverfahren, etabliert werden.

5.1.2. Lymphozytenstimulationstest und Zytokin-Nachweis mittels RT-PCR

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, optimale Konzentrationen von Concanavalin A (Con A), Phytohämagglutinin (PHA) und „pokeweed mitogen“ (PWM) für die Stimulation von peripheren Blutlymphozyten des Schweinswales festzulegen. Zusätzlich wurde die Mitogen-induzierte mRNS-Expression ausgewählter pro- und anti-inflammatorischer Zytokine in isolierten Lymphozyten mittels RT-PCR untersucht.

Durch die einstufige Dichtegradienten-Zentrifugation mit Percoll® konnte bei den untersuchten Schweinswalen eine Anreicherung von Lymphozyten aus Vollblutproben von 58,1 auf 94% erzielt werden. Das Differenzialblutbild des Schweinswales zeigt einen hohen und teilweise sehr variablen Anteil an neutrophilen (12,2 - 63,8%) und eosinophilen Granulozyten (7,7-36,8%; Koopman et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit schwankte der Anteil der neutrophilen Granulozyten zwischen 18,8 und 58,0%. Die eosinophilen Granulozyten machten 4,4 bis 9,0% des Blutbildes aus. Nach der Zentrifugation lag der Anteil an neutrophilen und eosinophilen Granulozyten beim Schweinswal zwischen 0,0 und 5,7% bzw. 1,0%. Das frühzeitige Absterben der polymorphkernigen Granulozyten in der Zellkultur und die Freisetzung von Enzymen und toxischen Produkten übt einen hemmenden Einfluss auf die Lymphozytenproliferation aus (De Guise et al., 1996; Kristensen et al., 1982). Die Anreicherung ermöglicht somit eine standardisierte Untersuchung der zellulären Immunantwort von peripheren Blutlymphozyten der Schweinswale.

Der Lymphozytenstimulationstest ermöglicht die quantitative Erfassung der zellulären Immunantwort. Durch die Verwendung verschiedener T- und B-Zellmitogene kann darüber hinaus eine qualitative Messung der Immunantwort durchgeführt werden (De Guise et al., 1996; Kristensen et al., 1982). Während Con A und PWM die stärksten Mitogene für den Seehund darstellen (De Swart et al., 1993), induziert PWM in den vorliegenden Untersuchungen beim Schweinswal nur eine schwache Zellproliferation. Vergleichbar den Verhältnissen beim Belugawal stellen die T-Zellmitogene Con A und PHA beim Schweinswal die effektivsten Mitogene dar. In der vorliegenden sowie in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass Con A die stärkste mitogene Wirkung auf Lymphozyten von marinen Säugetieren besitzt (Colgrove, 1978; Lahvis et al., 1993). Untersuchungen beim Seehund und Belugawal demonstrieren, dass PWM sowohl T- als auch B-Zellen stimuliert (De Swart et al., 1993; De Guise et al., 1996). Der geringere mitogene Effekt von PWM im Vergleich zum Seehund wird unter anderem durch den geringeren Anteil an B-Lymphozyten im Blut der Wale hervorgerufen. So finden sich im peripheren Blut vom Belugawal und Großen Tümmler nur 3 bis 12% bzw. 10 bis 15% an B-Lymphozyten (Romano et al., 1992; De Guise et al., 1997a). Der Anteil an T-Lymphozyten im Blut der Zahnwale liegt vergleichsweise hoch. Die $\gamma\delta$ -Form des T-Zellrezeptors findet sich auf 31% der Blutlymphozyten des Belugawales. Zusätzlich wurden bei dieser Tierart 30% der peripheren Blutlymphozyten aufgrund ihrer CD4-Expression als T-Helferzellen identifiziert (De Guise et

al., 1997a). Durchflußzytometrische Untersuchungen mit T- (CD2) und B-Zellmarkern (CD19, CD21) bei 10 verschiedenen Walarten zeigen, dass prozentual deutlich mehr T- als B-Lymphozyten im peripheren Blut der Tiere vorkommen (De Guise et al., 2002). Beim Schweinswal liegt eine immunphänotypische Charakterisierung der Blutlymphozyten bisher nicht vor. Jedoch kann beim Schweinswal aufgrund der Ähnlichkeiten im Immunsystem der Zahnwale eine vergleichbare Zusammensetzung der Blutlymphozyten angenommen werden.

Durch die RT-PCR wurde die Mitogen-induzierte Expression der Zytokine nachgewiesen. In unstimulierten Lymphozyten lag keine Expression von IL-2, IL-4, IL-6, TGF- β und TNF- α vor. In Con A- und PWM-aktivierten Lymphozyten konnte die mRNA aller Zytokine amplifiziert werden. IL-10 fand sich sowohl in stimulierten als auch in unstimulierten Lymphozyten. Ob es sich hierbei um eine konstitutive oder eine intravital induzierte Gentranskription handelt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Studien beim Großen Tümmler zeigen, dass T-Lymphozyten durch Con A und PHA stimuliert werden (De Guise et al., 1996). Der fehlende Nachweis von IL-2 in PHA-behandelten Zellen kann möglicherweise auf eine unterschiedliche Kinetik der beiden T-Zellmitogene beim Schweinswal bzw. Spezies-spezifische Unterschiede zurückgeführt werden. Das Haushaltsgen GAPDH wurde unabhängig von der Mitogen-Stimulation in allen Proben nachgewiesen. Die Amplifikation dient als interne Kontrolle für die konventionelle RT-PCR sowie als Referenzgen für die semiquantitative Echtzeit RT-PCR (Gröne et al., 1996; 1999; Markus et al. 2002)

Die Nukleinsäuresequenzen der PCR-Produkte wurden durch DNS-Analysen ermittelt. Der Homologievergleich der Sequenzen mit denen anderer mariner und terrestrischer Säugetiere bestätigte die Spezifität der Amplifikate. Es fanden sich weitgehende bzw. vollständige Homologien zwischen den mRNAs der Schweinswale und denen des Großen Tümmlers, Schwertwals und Belugawals (97-100%). Weiterhin wiesen die Sequenzen der Wiederkäuer und Schweine 79 bis 96% bzw. 85 bis 96% homologe Abschnitte zu den Zytokinen der Schweinswale auf. Der Vergleich mit murinen Zytokinen zeigte deutlich geringere Sequenzhomologien (75-89%). Die mRNA von IL-2 und IL-4 der Kegelrobbe und des Seehundes wiesen größere Übereinstimmungen mit kaninen Sequenzen als mit denen der Wale auf. Die gefundenen Homologien sind auf die nahe, phylogenetische Verwandtschaft der Schweinswale mit den Paarhufern zurückzuführen (Milinkovitch et al., 1993). Weiterhin bilden die Zahnwale untereinander eine monophyletische Gruppe (Milinkovitch et al., 1993).

Ähnliche genetische Beziehungen finden sich zwischen den Aminosäure- und Nukleinsäuresequenzen der Zytokine anderer Wale und landlebender Säugetiere (King et al., 1996; Ness et al., 1998; St-Laurent et al., 1999; Inoue et al., 1999 a,b,c, 2001; St-Laurent und Archambault, 2000; Shoji et al., 2001).

Die ermittelten cDNS-Sequenzen von IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β und TNF- α sowie des Haushaltsgens GAPDH des Schweinswales wurden in der Gendatenbank des „National Center of Biotechnology Information“ (NCBI) veröffentlicht (AF 346296; AF 346295; AF 346297; AF 346294, AF 346299; AF 346298; AF 346300).

5.2. Immunphänotypische Veränderungen in Thymus und Milz unter besonderer Berücksichtigung der Zytokin-Expression

In der vorliegenden Studie wurden Thymi und Milzen von insgesamt 29 Schweinswalen auf Veränderungen der Lymphozyten-Subpopulation immunhistologisch untersucht. Mittels kreuzreagierender Antikörper gegen das CD2-, CD3 ϵ -, CD45R- und Pan-Leukozyten-Antigen sowie mittels der bovinen, kaninen und walspezifischen MHC Klasse II-Marker wurden die phänotypischen Veränderungen während der Thymusatrophie und Milzdepletion charakterisiert. Die semiquantitative Echtzeit RT-PCR ermöglichte die Messung der mRNS-Mengen von IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β und TNF- α in den lymphatischen Organen sowie im Blut dieser Schweinswale.

Die lymphozytäre Depletion des Thymus betraf vorwiegend kortikale Thymozyten (CD2 und CD3 ϵ), während die Abnahme der reifen T-Lymphozyten im Thymusmark weniger deutlich ausgeprägt war. Der bovine MHC Klasse II-spezifische Antikörper markierte alle medullären Thymozyten. Jedoch fanden sich im Kortex von unveränderten und geringgradig atrophischen Thymi zahlreiche unmarkierte Zellen, welche wahrscheinlich Populationen von immaturren Thymozyten darstellen. Die mittel- und hochgradige Thymusatrophie war mit einer Zunahme dieser MHC Klasse II-exprimierenden Zellen vergesellschaftet. Weiterhin wiesen nicht-atrophische Thymi in der Medulla mehrere prominente follikelartige Ansammlungen von B-Lymphozyten (CD45R⁺/CD3 ϵ /CD2⁻) auf. Mit zunehmender Thymusatrophie wurde eine kontinuierliche Reduktion dieser medullären B-Zellareale beobachtet.

Sowohl B- als auch T-Lymphozyten verschiedener Walspezies (Romano et al., 1992; Shirai et al., 1998a) exprimieren das MHC Klasse II-Antigen. Vergleichbare Verhältnisse fanden sich beim Schweinswal. Die Thymusatrophie war mit einem Verlust unreifer MHC Klasse II-negativer Zellen im Kortex vergesellschaftet. Verschiedene Experimente zeigen, dass unreife CD4⁻/CD8⁻/CD44⁻ (doppelt negativ) sowie CD4⁺/CD8⁺/CD44⁻-Thymozyten (doppelt positiv) der kortikalen und subkapsulären Areale die geringste Widerstandskraft gegenüber verschiedenen endogenen und exogenen Noxen aufweisen und für die Depletion im Verlauf der Thymusatrophie verantwortlich sind. Weiterhin kommt es durch präexistente Antigen-präsentierende Stromazellen und reife Thymozyten sowie durch eingewanderte Makrophagen zur MHC Klasse II-Aufregulation im Kortex. Mature CD4⁺/CD44⁻- und CD8⁺/CD44⁺-Thymozyten (einfach positiv) der kortiko-medullären Grenze und Medulla werden im Verlauf der Thymusatrophie weit weniger beeinflusst. Der prozentuale Verlust an CD2- und CD3ε-exprimierenden Zellen im Thymus kann durch eine vermehrte Apoptose-Induktion der Thymozyten oder durch die Infiltration von Makrophagen und Fibroblasten erklärt werden (Otto, 1984; Quaglino und Ronchetti, 2001).

Die Reduktion medullärer B-Zellen infolge der Thymusatrophie ist wahrscheinlich auf eine verminderte Proliferation ortständiger Zellen oder eine verminderte Besiedlung des Thymus aus peripheren B-Zellkompartimenten zurückzuführen (Flores et al., 2001). Wünschmann et al. (2000) beschreiben den Verlust von medullären B-Zellen bei der Staupevirus-induzierten Thymusatrophie des Hundes. Inwieweit der Verlust an medullären B-Zellen Auswirkungen auf die Thymopoese des Schweinswales hat, bleibt unklar. Allerdings sind B-Lymphozyten im Thymus für die negative Selektion während der T-Zellreifung mitverantwortlich, so dass im vorliegenden Fall ein gestörte Thymopoese nicht ausgeschlossen werden kann (Bornemann und Kirchner, 1996, Mazda et al., 1991).

Die histologischen Untersuchungen der Milzen zeigten eine deutliche Verschmälerung der PALS in mittel- und hochgradig depletierten Organen. Immunhistologisch fand sich mit zunehmender Milzdepletion in der PALS eine selektive Reduktion an T-Lymphozyten (CD2, CD3ε). Weiterhin war die lymphozytäre Depletion mit einem Verlust der Sekundärfollikel und einer Verkleinerung der Primärfollikel sowie der Marginalzone vergesellschaftet. Follikel und Marginalzone bestanden vorwiegend aus B-Lymphozyten (CD45R) und einzelnen T-Lymphozyten (CD3ε, CD2). Die Depletion beider Kompartimente war mit keinen immunphänotypischen Veränderungen assoziiert.

Vereinzelte germinative Zentren in prominenten Sekundärfollikeln zeigten eine verminderte oder fehlende Immunreaktion mit dem Pan-Leukozytenmarker. Ursächlich kann eine verminderte Expression dieses Antigens auf Zentroblasten angenommen werden. Jedoch waren diese Unterschiede statistisch nicht signifikant. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl T- als auch B-Zellkompartimente bei der Milzdepletion betroffen sind. Ob es sich hierbei um eine gestörte Besiedlung der Milz aus primären lymphatischen Organen oder um eine direkte Schädigung der ortständigen Zellen handelt, kann abschließend nicht geklärt werden (Dai et al., 1998. Wünschmann et al., 2000).

Aufgrund ihrer Wirkung auf das Immunsystem werden die **Zytokine** in pro- und anti-inflammatorische Mediatoren unterteilt. Zu den pro-inflammatorischen Zytokinen gehören IL-2 und TNF- α , während IL-4, IL-10 und TGF- β zu den anti-inflammatorischen Zytokinen zählen. IL-6 wird als pro-inflammatorisches Zytokin mit partieller anti-inflammatorischer Funktion bezeichnet. Aufgrund der kurzen Expressionszeit der Proteine sowie des autokrinen und/oder parakrinen Wirkungsmechanismus ist es notwendig, die zelluläre Produktion bzw. Expression des mRNA-Transkriptes zu untersuchen, um über die Produktion von Zytokinen eine Aussage zu erlangen (Olsson, 1995). Die Echtzeit-RT-PCR stellt eine sensitive Methode zum Nachweis von Zytokinen dar. Der Vergleich der mRNA-Konzentration des Zytokins mit der eines Referenz-Gens (Haushaltsgen; GAPDH), ermöglicht darüber hinaus eine relative Quantifizierung der Gen-Expression (Markus et al., 2002).

Die Amplifikation der mRNA von IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 und TNF- α gelang vorwiegend in nicht-atrophischen **Thymi** der Schweinswale. Eine deutlich geringerer Anzahl an atrophischen Thymi wies diese Zytokine auf. Die semiquantitative Auswertung zeigte eine signifikante Korrelation zwischen der Reduktion von IL-6 und der Thymusatrophie. Aufgrund der großen Variationen der mRNA-Mengen innerhalb der einzelnen Gruppen konnten zwischen der Abnahme der weiteren Zytokine und der Thymusatrophie keine Signifikanzen festgestellt werden. Ob es sich bei der verminderten Zytokin-Expression um die Ursache oder Folge der Thymusatrophie handelt, konnte aufgrund der vorliegenden Untersuchungen nicht geklärt werden. Die TGF- β -Expression blieb mit zunehmender Thymusatrophie relativ konstant, jedoch fand sich in einzelnen hochgradig atrophischen Thymi eine deutlich Aufregulation dieses Zytokins.

Die nachgewiesenen pro- und anti-inflammatorischen Zytokine spielen eine bedeutende Rolle in der T-Zell-Differenzierung und -Reifung. Sie werden konsitutiv oder in unterschiedlichen Stadien der Thymopoese exprimiert. Die Interaktion der Thymozyten untereinander sowie der Lymphozyten mit stromalen Zellen wird durch autokrine und parakrine Mechanismen hervorgerufen (Carding et al., 1991). IL-2 spielt eine entscheidende Rolle in den frühen Stadien der T-Zell-Entwicklung. Immature Thymozyten zeigen eine konstitutive Expression des IL-2-Rezeptors sowie eine geringe Sekretion von IL-2 (De la Hera et al., 1986, 1987; Toribio et al., 1989). In der Maus induziert IL-4 eine Proliferation von immaturren CD4⁺/CD8⁻-Zellen (doppelt negativ) sowie von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen (einfach positiv), jedoch nicht von CD4⁺/CD8⁺ Zellen (doppelt positiv). Weiterhin fördert IL-4 die Expression der CD3- und CD5-Oberflächenantigene in Verbindung mit der Expression des T-Zellrezeptors und einem Verlust des CD1-Antigens. Als Ko-Stimulator induziert IL-6 die Proliferation von Thymozyten und die IL-2-Produktion reifer T-Zellen. IL-10 hemmt die Produktion von IL-2 und TNF- α in T-Lymphozyten und fördert das Wachstum von zytotoxischen T-Vorläuferzellen (Chen und Zlotnik, 1991). TGF- β spielt eine regulatorische Rolle in der Differenzierung von T-Zellen. TNF- α wird konstitutiv in subkortikalen und medullären Arealen des Thymus exprimiert und induziert die Elimination von autoreaktiven Thymozyten. Hierbei kommt es bei der negativen Selektion zur Apoptose in CD3⁺/CD4⁺/CD8⁻/CD44⁻/CD25⁻- und CD3⁺/CD4⁺/CD8⁻/CD44⁻/CD25⁻-Prothymozyten. Untersuchungen *in vivo* zeigen, dass TNF-Rezeptor-Gen-defiziente „knockout“ Mäuse eine deutliche Hyperzellularität des Thymus aufweisen. Durch Aktivierung der TNF-Rezeptoren p55 (CD120a) und p75 (CD120b) zeigen murine Thymozyten vermehrt Apoptosen. Im Gegensatz hierzu induzieren höhere TNF- α -Konzentrationen durch die Bindung des p75-Rezeptors eine Thymozyten-Proliferation *in vitro*. Diese duale Funktion des TNF- α wird mit einem Konzentrationsgradienten innerhalb des Thymus erklärt, wodurch niedrige Konzentrationen eine Apoptose auslösen bzw. höhere Konzentrationen eine weitere Differenzierung der Zellen gewährleisten (Baseta und Stutman, 2000). Im Gegensatz zu der inhibitorischen Wirkung auf reife T-Lymphozyten beschleunigt TGF- β das Wachstum von immaturren Thymozyten und verhindert deren Apoptose-Induktion (Cerwenka et al., 1994; 1996). Weiterhin induziert TGF- β die Expression des CD8-Oberflächenantigenes. TGF- β fördert die Differenzierung von Th2-Zellen, während es Th1-Zellen inhibiert (Strober et al., 1997). TGF- β wird von Thymozyten und stromalen Zellen des Thymus gebildet. Die in hochgradig atrophischen Thymi des Schweinswales gefundene, deutliche Aufregulation ist wahrscheinlich auf die Fibrosierung zurückzuführen. TGF- β besitzt eine chemoattraktive und mitogene Wirkung auf

Fibroblasten. Weiterhin bewirkt es durch eine verminderte Expression von Proteasen und eine erhöhte Produktion von Protease-Inhibitoren eine Zunahme der extrazellulären Matrix, wie Kollagen, Fibronektin und Proteoglykane (Postlethwaite et al., 1987).

Die Expression von IL-6, TNF- α und TGF- β fand sich vorwiegend in nicht bzw. hochgradig depletierten **Milzen**. Die mRNA von IL-10 konnte in Organen der unterschiedlichen Depletionsgrade nachgewiesen werden. IL-2 wurde lediglich in nicht-depletierten Milzen nachgewiesen. Die Amplifikation von IL-4 verlief in allen Milzen mit negativem Ergebnis. Aufgrund der großen Variationen der Zytokin-Mengen innerhalb der einzelnen Gruppen konnten durch die semiquantitative Auswertung der Ergebnisse keine signifikanten Gruppenunterschiede festgestellt werden. Jedoch fanden sich in nicht und hochgradig depletierten Milzen deutliche Aufregulationen von IL-6, TGF- β und TNF- α .

Die Interaktion der detektierten Zytokine ist für den geregelten Ablauf der primären und sekundären Immunantwort in der Milz verantwortlich. IL-2 wird von Th1-Zellen gebildet und stimuliert die Biosynthese weiterer Zytokine sowie die Proliferation von T-Lymphozyten. Hierdurch wird die klonale Expansion von T-Effektorzellen nach Antigen-Stimulation gewährleistet. Die Reduktion der IL-2- und IL-2R-Expression führt zur Beendigung der T-Zellantwort (Smith, 1992). Weiterhin fördert IL-2 das Wachstum von B-Lymphozyten und die Immunglobulin (Ig)-Sekretion. IL-6 stellt einen multifunktionalen Mediator dar, welcher durch zahlreiche Immunzellen und nicht-lymphatische Zellen gebildet wird. Neben seiner Aufgabe in der Immunantwort und Hämatopoese führt es zur Auslösung der Akuten-Phase-Antwort (Le und Vilcek, 1990). IL-6 stimuliert die Antigen-induzierte Proliferation von B-Zellen sowie deren Differenzierung in Antikörper-produzierende Plasmazellen. Als Ko-Faktor (IL-1 und IL-5) induziert es die IgM- bzw. IgA-Synthese (Kishimoto und Hirano, 1988). IL-10 wird vorwiegend von Th2-Zellen produziert. Seine immunsuppressive und anti-inflammatorische Wirkung basiert auf der inhibierten Synthese der Th1-Zytokine IL-1, IFN- γ und TNF- α sowie auf der Hemmung von Antigen-präsentierenden Zellen (De Waal Malefyt et al., 1991). Weiterhin fördert IL-10 durch Induktion des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 das Überleben von B-Zellen. TGF- β besitzt eine immunmodulatorische und antiproliferative Funktion in der Immunantwort. Unter anderem hemmt das Zytokin die Proliferation von B-Zellen und die IL-2 Produktion. Weiterhin fördert TGF- β die Produktion von IgG.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Zytokin-Expression und der Milzdepletion festgestellt werden. Weiterhin bleibt die Ursache der Aufregulation von IL-6, TGF- β und TNF- α in einzelnen, hochgradig depletierten Milzen unklar. Allerdings wird in verschiedenen, immunsuppressiven Erkrankungen, wie z.B. der Afrikanischen Schweinepest, eine Zytokin-induzierte, lymphozytäre Depletion in der Milz beobachtet (Salguero et al., 2002). Weiterhin ist durch die Echtzeit-RT-PCR keine Differenzierung der mRNA-Expression in den einzelnen Kompartimenten eines Organs möglich. In diesem Zusammenhang kann eine Zytokin-Aufregulation durch aktivierte Lymphozyten und Makrophagen in der roten Pulpa der Milz nicht ausgeschlossen werden.

Der mRNA-Gehalt von IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β und TNF- α wurde im **Blut** der Schweinswale gemessen. Die Korrelationsanalyse ergab keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den Zytokin-Mengen und dem Grad der Thymusatrophie. Jedoch fand sich eine signifikante positive Korrelation zwischen dem Gehalt an IL-10 im Blut und der Milzdepletion. Der mRNA-Gehalt der anderen Zytokine im Blut wies keine Signifikanzen mit den Milzveränderungen auf.

In der Akuten-Phase-Antwort kann durch erhöhte TNF- α - und IL-6-Expressionen eine vermehrte Apoptose-Induktion in lymphatischen Organen beobachtet werden (Oberholzer et al., 2001, Wang et al., 1994). Die Kinetik der Zytokin-Synthese in stimulierten Lymphozyten ist durch kurze Expressionsdauern und Halbwertszeiten der mRNA gekennzeichnet (Fan et al., 1998; Yancy et al., 2001). Die fehlende Korrelation zwischen der Thymusatrophie bzw. der Milzdepletion und der Menge an pro-inflammatorischen Zytokinen ist wahrscheinlich auf die Dauer der Prozesse zurückzuführen. Als Ausdruck des akuten Stadium einer Immunantwort kann bei drei Tieren (HDW1, HDW15, pp1348) eine Mitbeteiligung von IL-6 an der Thymusatrophie nicht ausgeschlossen werden.

In der Frühphase einer Immunreaktion bzw. eines Entzündungsgeschehens kommt es durch Makrophagen und aktivierte Lymphozyten zu einer Überproduktion von TNF α , IFN- γ und IL-1, welche die Induktion von weiteren pro-inflammatorischen Zytokinen hervorrufen. In der Spätphase wird das Entzündungsgeschehen durch die Freisetzung der anti-inflammatorischen Zytokine TGF- β , IL-4 und IL-10 aus aktivierten Lymphozyten und Makrophagen gehemmt. IL-10 stellt ein anti-inflammatorisches Zytokin dar, welches vorwiegend von Th2-Zellen produziert wird. Die Aufregulation von IL-10 im Blut ist als Folge einer chronischen

Aktivierung des Immunsystems der Schweinswale zu interpretieren. IL-10 stellt durch seine anti-inflammatorische Wirkung einen protektiven Faktor bei verschiedenen Erkrankungen, wie z.B. Septikämien und Endotoxämien, dar. Jedoch führt die überschießende Synthese zu einer inhibierten Zytokin-Expression durch Th1-Zellen sowie einer verminderten T-Zellproliferation in der Milz. Die IL-10-vermittelten Veränderungen sind für die Immunsuppression in der Spätphase einer generalisierten, bakteriellen Infektion verantwortlich (Song et al., 1999). In diesem Zusammenhang kann in der murinen Milz eine durch IL-10 induzierte Apoptose von CD4+ Zellen demonstriert werden (Ayala et al., 2001).

5.3. Untersuchungen des Einflusses von Umweltchemikalien auf das Immunsystem der Schweinswale

Ziel der vorliegenden Studie war es, den möglichen Zusammenhang zwischen der Belastung mit persistierenden, organischen Umweltchemikalien und morphologischen Veränderungen der lymphatischen Organe der Schweinswale zu untersuchen.

In den vergangenen Jahren gelangten große Mengen an chlorierten Kohlenwasserstoffverbindungen aus Industrie und Landwirtschaft in das marine Ökosystem. Obwohl der Einsatz dieser Chemikalien in den meisten Ländern mittlerweile eingeschränkt bzw. verboten wurde, findet sich noch heute eine weltweite Verteilung dieser Substanzen (Bruhn et al., 1999; Minh et al., 2000; Watanabe et al., 1999). Als Endglieder der marinen Nahrungskette akkumuliert der Schweinswal eine Vielzahl an organischen und anorganischen Schadstoffen. Im Vergleich zu Vögeln und terrestrischen Säugetieren weisen diese Tiere einen extrem langsamen Metabolismus von Organochloriden auf. Hierdurch besteht beim Schweinswal die Gefahr einer chronischen Exposition mit Umweltchemikalien (Duinker et al., 1989; Tanabe et al., 1994). Zahlreiche Untersuchungen verdeutlichen den negativen Einfluss von Umweltchemikalien auf den Gesundheitsstatus von marinen Säugetieren. In diesem Zusammenhang wird ein immuntoxisches Potenzial von verschiedenen Schadstoffen bei wildlebenden Tierarten diskutiert. Jedoch liegen bisher keine immunologischen Untersuchungen beim Schweinswal vor (De Guise et al., 1995b; Luebke et al., 1997; Ross et al., 1996a; Siebert et al., 1999; Jepson et al., 1999; Wünschmann et al. 2001).

Der mögliche Einfluss von Umweltchemikalien auf das Immunsystem wurde an insgesamt 61 Schweinswalen untersucht. Die ausgewählten Schadstoffklassen stehen entweder im

Verdacht, besonders toxisch auf Meeressäuger zu wirken, oder kommen in vergleichsweise hohen Konzentrationen in diesen Tieren vor (Bruhn et al., 1999). Die histologische Gradeinteilung der Thymusatrophie und Milzdepletion dienten als Grundlage für den Vergleich mit der Schadstoffbelastung. Weiterhin wurden bei der statistischen Auswertung das Lebensalter, das Geschlecht und die Herkunft sowie der Ernährungs- und Gesundheitszustand der Tiere berücksichtigt.

Histologisch war die Thymusatrophie durch die lymphatische Depletion des Kortex, das Verschwinden der Mark-Rindengrenze und die Vermehrung des periseptalen und intralobulären Bindegewebes charakterisiert. Die akute Involution ist vor allem durch eine massive Lymphozytolyse bzw. durch eine diffuse Apoptose der kortikalen Thymozyten und durch eine Phagozytose der apoptotischen Zellen durch Makrophagen („tingible body macrophages“, „starry sky pattern“) gekennzeichnet (Otto, 1984; Quaglino und Ronchetti, 2001). Ob es sich bei der lymphozytären Depletion der Schweinswale um eine vermehrte Apoptose-Induktion handelt, wurde in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt. Obwohl histologische Kriterien eine Erkennung von apoptotischen Zellen erlauben, ist diese Differenzierung an Gefrierschnitten aufgrund mangelnder Detailerkennbarkeit nur eingeschränkt möglich. Im Endstadium der Thymusatrophie kann es durch einen vollständigen Verlust der Lymphozyten und Sichtbarwerden der Makrophagen, epithelialen Retikulumzellen und interdigitierenden Zellen der Rinde zu einer inversen Struktur des Thymus kommen. Vergleichbare Veränderungen werden im Verlauf der akzidentellen Thymusatrophie bei verschiedenen Tierarten, wie z.B. beim Kalb, beschrieben (Durchfeld et al., 1989).

Die Milzdepletion der Schweinswale war mit einer kontinuierlichen Reduktion der PALS vergesellschaftet. Weiterhin kam es in den Milzen zu einem Verlust der Sekundärfollikel und zur Ausbildung von kleinen Primärfollikeln. Die statistischen Analysen zeigten eine positive Korrelation zwischen der Milzdepletion und Thymusatrophie. Dai et al. (1998) demonstrierten, dass es durch die gestörte Thymopoese zu einer verminderten Besiedlung der peripheren T-Zellkompartimente kommt. Weiterhin können jedoch andere endogene und exogene Faktoren, welche inhibitorisch auf periphere T-Zellen wirken, als Ursache der Milzdepletion beim Schweinswal nicht ausgeschlossen werden (Ozeki et al., 1997; Quaglino und Ronchetti, 2001; Wyllie, 1980).

Die Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zeigte eine positive Korrelation zwischen dem Grad der Thymusatrophie sowie der Milzdepletion und dem erhöhten PCB- und PBDE-Gehalt der Schweinswale. Die Belastung mit Toxaphen, DDT und DDE wies keine signifikanten Zusammenhänge mit der Depletion in Thymus und Milz auf. Weiterhin bestand eine positive Korrelation zwischen der Depletion in beiden Organen und den errechneten Toxizitätsäquivalenten (TEQ). Unter Einbeziehung der verschiedenen Variablen in das Rechenmodell (schrittweise polytome logistische Regression) wies die PBDE-Belastung den größten statistischen Einfluss auf die Thymusatrophie auf. Weiterhin bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Thymusatrophie bzw. Milzdepletion und der Verschlechterung des Gesundheitszustandes. Die weiteren Schadstoffe hatten eine geringere bzw. keine Bedeutung zur Erklärung der Depletion. Zusätzlich zeigten das zunehmende Lebensalter, das Geschlecht sowie die Herkunft der Tiere keinen Einfluss auf die Thymusatrophie bzw. Milzdepletion.

Der Thymus stellt ein zentrales Organ der Lymphopoese dar, in dem es durch Differenzierung der T-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark zur Migration von selektierten T-Zellen in peripheren lymphatischen Organen kommt (Savino und Dardenne, 2000). Die vorliegenden Untersuchungen demonstrieren das Auftreten von lymphozytären Depletionen in Thymus und Milz von Schweinswalen. Die statistischen Analysen zeigten, dass vorwiegend neugeborene und juvenile Tiere (< 3 Jahre) eine Thymusatrophie aufwiesen. Im Vergleich hierzu konnte beim adulten Schweinswal keine hochgradige Thymusatrophie beobachtet werden. Die physiologische Thymusinvolutions setzt beim Schweinswal nach der Geschlechtsreife mit dem dritten bis vierten Lebensjahr ein. Jedoch vollzieht sich dieser Prozess beim Schweinswal relativ langsam, so dass noch bis zum 12. Lebensjahr ein makroskopisch erkennbarer Thymus nachweisbar ist (Wünschmann et al., 1999). In der vorliegenden Studie zeigten die meisten adulten Tieren (≥ 4 Jahre) keine bzw. eine gering- bis mittelgradige Depletion. Ebenfalls konnten deutliche Residuen des Thymusgewebe bei einem 12 Jahre alten Schweinswal nachgewiesen werden (pp1529). Eine vergleichbar langsame, altersabhängige Thymusinvolutions findet sich beim Großen Tümmler (Cowan, 1994). Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse handelt es sich bei der Thymusatrophie der jungen Schweinswale um eine akzidentelle Thymusatrophie.

Vorwiegend gestrandete Wale mit einem schlechten Ernährungszustand und Gesundheitsstatus wiesen eine hochgradige Thymusatrophie und Milzdepletion auf. Infolge

verschiedener chronischer Erkrankungen kann eine Thymusatrophie beobachtet werden (Dai et al., 1998; Durchfeld et al., 1989; Otto, 1984). In der vorliegenden Arbeit fanden sich Thymusatrophien, welche mit schwerwiegenden Erkrankungen assoziiert waren. Hierbei standen disseminierte, ulzerative bzw. pyogramulomatös-nekrotisierende Dermatitiden (HDW1; HDW7), fibrinös-eitrige Pleuropneumonien (HDW15), granulomatösen Bronchopneumonien (pp1642; pp1660; pp1670) und diffuse, eitrige Peritonitiden (pp1640) im Vordergrund. Die Tiere wiesen teilweise generalisierte, bakterielle Infektionen (*E.coli*; *Streptococcus spp*) auf. Weiterhin fand sich bei einem Tier eine pyogranulomatösen Myokarditis infolge einer *Staphylococcus aureus*-Septikämie (pp1481; Siebert et al., 2002).

Generalisierte, bakterielle Infektionen führen zu einer Depletion der lymphatischen Organe. Die Thymusatrophie steht hierbei im Vordergrund. Im Verlauf der Sepsis fördern Lipopolysaccharid (LPS), ein Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien, sowie Peptidoglykan, ein Zellwandbestandteil aller Bakterien, die vermehrte Apoptose-Induktion der Lymphozyten. Weiterhin wird durch Substanzen Gram-positiver Bakterien, wie z.B. Enterotoxin B von *Staphylococcus aureus*, eine vermehrte Apoptose von Thymozyten hervorgerufen. Die lymphatische Depletion basiert vorwiegend auf der bakteriell-bedingten Aufregulation pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-1, IL-6 und TNF- α sowie von Glukokortikoiden und Katecholaminen (Lin et al., 1999; Ozeki et al., 1997; Wang et al., 1994). Die resultierende Immunsuppression erhöht das Risiko von weiteren opportunistischen Infektionen (Oberholzer et al., 2001). Im Gegensatz dazu führen verschiedene Viren zu einer lytischen Infektion der Immunzellen. Vergleichbar den Verhältnissen bei terrestrischen Karnivoren werden bei verschiedenen Wal- und Robbensespezies eine Morbillivirus-bedingte Lymphozytolyse und transiente Thymusatrophien beschrieben (Kennedy, 1998; Wünschmann et al., 2000). Die pathologischen Untersuchungen zeigten jedoch, dass bei den Schweinswalen dieser Studie keine Erkrankungen durch Morbilliviren vorlagen. Diese Ergebnisse wurden durch immunhistologische Untersuchungen auf das Vorhandensein von Morbillivirus-Antigen in Lunge und ZNS der Tiere bestätigt (Müller et al., 2000; Dr. G. Müller; Institut für Veterinär-Pathologie; Justus-Liebig-Universität Giessen: persönliche Mitteilung).

Chronische Erkrankungen, physische und psychische Anstrengungen sowie multiple Traumata führen zu einer gesteigerten adrenalen Sekretion von Glukokortikoiden. Im Verlauf der Stress-induzierten Thymusatrophie wird eine gesteigerte Endonuklease-Aktivität und DNS-Degradation in Thymozyten beobachtet (Wyllie, 1980). In der Regel sind von diesem

Szenario nicht alle Lymphozyten gleichermaßen betroffen. So findet man im Verlauf der T-Zelldepletion einen selektiven Verlust an immaturren CD4⁺/CD8⁺-Zellen (doppelt positiv), während in reifen CD4⁺- sowie CD8⁺-Zellen (einfach negativ) der Medulla keine vermehrte Apoptose-Rate nachgewiesen wird. Thymozyten in der G₀-Phase zeigen eine höhere Sensitivität gegenüber der Apoptose-Induktion als aktivierte Thymozyten. Durch das selektive Absterben der Zellen in der G₀-Phase kommt es zur klonalen Expansion der Thymozyten, welche sich bereits im Zellzyklus befinden (Bruno et al., 1992; Quaglini und Ronchetti, 2001). Weiterhin werden protektive Faktoren im Thymus (z.B. Zytokine) sowie die Interaktionen mit Stromazellen für die erhöhte Resistenz der medulären Thymozyten verantwortlich gemacht (Oldenburg et al., 1997).

Im Gegensatz zu beigefangenen Tieren stellt bei gestrandeten Schweinswalen die Abmagerung einen häufigen Befund dar. Diese Wale zeigen deutlich reduzierte Unterhautfettdepots und eine ausgeprägte Atrophie des *M. longissimus dorsi* (Benke et al., 1998; Kuiken et al., 1994). Untersuchungen verschiedener Spezies verdeutlichen eine erhöhte Empfänglichkeit für infektiöse oder neoplastische Erkrankungen im Zusammenhang mit einer alimentären Unterversorgung. Hierbei spielen Proteine, Vitamine und Spurenelemente, wie Zink, die entscheidende Rolle (King und Fraker, 2000). Ursächlich wird hierfür eine gestörte Thymopoese mit resultierender verminderter zellulärer Immunantwort verantwortlich gemacht. B-Lymphozyten werden durch die alimentäre Unterversorgung weniger beeinflusst. Neben einer Thymusatrophie (Hungertypus) finden sich Depletionen in den T-Zellkompartimenten der Milz, Lymphknoten und MALT sowie eine Reduktion des CD4/CD8-Verhältnisses im peripheren Blut. Ursächlich kann eine verminderte Mitogen- und Antigen-induzierte T-Zellproliferation *in vitro* sowie eine verminderte Produktion der Th1-Zytokine IL-2 und IFN- γ beobachtet werden (Dai et al., 1998). Zur Sicherstellung lebenswichtiger Funktionen des Zentralen Nervensystems, der Leber, der Nieren und des Herzens wird der Metabolismus der Immunzellen reduziert. Im Verlauf der Abmagerung findet sich eine erhöhte endogene Glukokortikoid-Ausschüttung sowie ein verminderter Blutspiegel an Schilddrüsenhormonen (Thyroxin, Trijodthyronin). Weiterhin spielt das Absinken des Adipozyten-spezifischen Hormons Leptin in der Pathogenese der Thymusatrophie eine entscheidenden Rolle (Howard et al., 1999; Matarese, 2000).

Untersuchungen verschiedener Schweinswal-Populationen der Nord- und Ostsee zeigen deutliche Abmagerungen in Verbindung mit ausgeprägten, chronischen Erkrankungen. Wie in

der vorliegenden Arbeit beschrieben, kann in den meisten Fällen nicht mehr nachvollzogen werden, inwieweit die Abmagerung eine Prädisposition für die Erkrankung oder dessen Folge darstellt (Jauniaux et al., 2002; Siebert et al., 2001). Siebert et al. (1999) vermuten, dass die Abmagerung durch Endoparasitosen hervorgerufen wird. Bei neonatalen Schweinswalen findet sich durch eine verminderte Milchaufnahme eine Abmagerung ohne zugrundeliegende Erkrankung. Weiterhin wurde bei älteren Walen durch den Verlust der Zähne eine Nährstoffunterversorgung beobachtet (Baker und Martin, 1992; Kirkwood et al., 1997). Ebenfalls kann eine Dezimierung der Fischbeständen in den Gewässern als Ursache für die Abmagerung nicht ausgeschlossen werden (Jauniaux et al., 2002).

Ob es sich bei den Ergebnissen der toxikologischen Analysen um Veränderungen im Sinne einer schadstoffbedingten Immunsuppression handelt, bleibt spekulativ. Jedoch finden sich in experimentelle Studien bei Seehunden eine **PCB**-induzierte, verminderte Funktion der Natürlichen Killerzellen, der Mitogen-induzierten T-Zellantwort und der Antigen-spezifischen Lymphozytenproliferation *in vitro*. Als Ausdruck einer Hemmung der T-Helferzellen bzw. der Gedächtnisfunktion des Immunsystems weisen PCB-belastete Seehunde eine supprimierte, zellvermittelte Allergie vom verzögerten Typ (Typ IV-Überempfindlichkeit) und eine verminderte Antikörperbildung nach intradermaler Injektion von Ovalbumin *in vivo* auf (De Swart et al., 1995; Ross et al., 1995; 1996a; Van Loveren et al., 2000). Weiterhin kann durch die Applikation von akkumulierten Schadstoffen aus Meeressäugern eine Thymusatrophie in Ratten induziert werden (Ross et al., 1996b, 1997).

Die Mechanismen einer PCB-induzierten Immunsuppression sind teilweise ungeklärt, jedoch spielt die vermehrte Apoptose-Induktion in unreifen, kortikalen Thymozyten eine entscheidende Rolle. Koplanare PCB-Kongenere zeigen aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit dem 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD) eine erhöhte Bindungsaffinität für den zytosolischen Arylhydrocarbon (Ah)-Rezeptor (Tryphonas, 1994). Die besondere Empfindlichkeit der Thymozyten gegenüber Schadstoffen wird durch deren relativ hohen Gehalt an Ah-Rezeptoren erklärt. Die Hemmung von NF- κ B durch Aktivierung des Ah-Rezeptor wird für die vermehrte Induktion des programmierten Zelltodes in lymphatischen Zellen verantwortlich gemacht (Tian et al., 1999). Dioxin-empfindliche Elemente in den Promotor-Genen zahlreicher Zytokine, wie IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- β und TNF- α , werden zusätzlich für die immuntoxische Wirkung von Schadstoffen verantwortlich gemacht (Lai et al., 1997). Weiterhin kommt es durch Ah-Rezeptor-bindende Organochloride

zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Thymus, verbunden mit einer beschleunigten positiven Selektion und Reifung der Pro-Thymozyten in reife CD8⁺-Zellen (Kremmer et al., 1995). Neben den direkten Ah-Rezeptor vermittelten Effekten gibt es jedoch noch weitere, weitgehend unbekannte Mechanismen, welche für die immuntoxische Wirkung verantwortlich sind. In diesem Zusammenhang demonstrieren Hossain et al. (1998), dass es nach Inkubation von 2,3,7,8-TCDD zu einer Ah-Rezeptor-unabhängigen, verminderten Expression des anti-apoptischen Proteins Bcl-2 und resultierender Apoptose von Lymphozyten *in vitro* kommt.

In den letzten Jahren wird eine zunehmende Belastung mit **PBDE** in verschiedenen Robben- und Walpopulationen, inklusive der Schweinswale beobachtet (Boon et al., 2002). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit 2,3,7,8-TCDD besitzt PBDE eine Ah-Rezeptor-agonistische Wirkung. Die subchronische PBDE-Exposition von Mäusen bewirkt eine Gewichtsreduktion des Thymus (Fowles et al., 1994; McDonald, 2002). Untersuchungen bezüglich eines möglichen negativen Einflusses auf den Gesundheitsstatus bzw. auf das Immunsystem von marinen Säugetiere liegen bisher nicht vor.

Der Mittelwert des PCB-Gehaltes der Schweinswale mit hochgradigen Thymusatrophien (Gruppe IV: 11,29 ± 9,15 mg PCB /kg Lipid) lagen innerhalb der Werte von Seehunden mit PCB-induzierten, immunologischen Defekten (11–22 mg PCB /kg Lipid). Der direkte Vergleich wird jedoch dadurch erschwert, dass in diesen Studien z.T. unterschiedliche PCB-Kongener analysiert wurden (Ross et al., 1996a). Weiterhin sind Spezies-spezifische Unterschiede im Metabolismus und der Detoxifizierung von PCBs bei der Interpretation der Daten zu berücksichtigen (Lapierre et al., 1999, Tryphonas, 1994).

Die toxikologischen Analysen zeigten, dass Dioxin-ähnliche Substanzen, wie die koplanaren PCB-Kongener CB77, 126, 169 sowie das mono-ortho PCB-Kongener CB118, in den Schweinswalen akkumulieren. Zur Abschätzung der Toxizität von chlorierten Kohlenwasserstoffen wird das internationale Konzept der Toxizitätsäquivalente (TEQ) angewendet. Dabei wird die Toxizität der einzelnen Substanzen mittels Toxizitätsfaktoren (TEF) relativ zum 2,3,7,8-TCDD angegeben (Tryphonas, 1994). In der vorliegenden sowie in früher durchgeführten Schadstoffanalysen stellt CB118 mit ca. 60% an der Gesamtoxizität (ΣTEQ) das wichtigste Kongener in der Risikoabschätzung beim Schweinswal dar (Bruhn et al., 1999; Prof. Dr. M. McLachlan; Institut für Ostseeforschung der Universität Rostock:

persönliche Mitteilung). In der vorliegenden Arbeit wurden die TEQ auf der Basis des CB118 errechnet und mit dem Grad der Thymusatrophie und Milzdepletion korreliert. Tiere mit erhöhten TEQ wiesen gehäuft eine mittel- bis hochgradige Thymusatrophie bzw. Milzdepletion auf. Der Mittelwert der Toxizitätsäquivalente der Tiere mit hochgradigen Thymusatrophien lag mit $76,0 \pm 54,6$ ng TEQ /kg Lipid unter den Werten von Seehunden mit einer PCB-induzierten Immunsuppression ($208,7 \pm 11,6$ ng TEQ/kg Lipid; Ross et al., 1995). Jedoch wird auch hier der direkte Vergleich durch mögliche Unterschiede zwischen Seehunden und Schweinswalen im Metabolismus der Kohlenwasserstoffe erschwert. Weiterhin bezieht sich das Prinzip der TEQ lediglich auf Ah-Rezeptor-vermittelte Effekte, so dass andere Ah-Rezeptor-unabhängige Mechanismen sowie agonistische Effekte verschiedener Schadstoffklassen unberücksichtigt bleiben (Hossain et al., 1998; Lapierre et al., 1999; Tryphonas, 1994).

Der relativ hohe Gehalt an Schadstoffen in neonatalen und juvenilen Schweinswalen ist auf den transplazentaren Transfer auf den Fetus zurückzuführen. Weiterhin spielt die Aufnahme von Xenobiotika durch neugeborene Tiere während der Laktation eine entscheidende Rolle. Bei verschiedenen Walspezies wird während der ersten Kalbung der größte, maternale Transfer von Organochloriden beobachtet (Borrell et al., 1995; Jepson et al., 1999). In diesem Zusammenhang zeigen Ross et al. (1996b), dass die perinatale Exposition von chlorierten Kohlenwasserstoffen ein höheres immuntoxisches Risiko als die Schadstoffaufnahme beim adulten Individuum darstellt.

Durch die gesteigerte Lipolyse infolge der Abmagerung werden Schadstoffe vermehrt mobilisiert. Der katabole Zustand bewirkt eine Freisetzung der lipophilen Substanzen aus den Fettdepots, sodass sich diese Substanzen im Blutplasma anreichern und toxische Grenzwerte überschreiten können (Korytko et al., 1999; Imbeault et al., 2001). De Swart et al. (1995) zeigen an hungernden Seehunden, dass der Verlust von 16,5% des Körpergewichtes eine Verdopplung des Organochlorid-Gehaltes im Blut hervorruft. In der vorliegenden Arbeit kann aufgrund fehlender Daten bezüglich des Metabolismus von Organochloriden der ursprüngliche Schadstoffgehalt in abgemagerten Schweinswalen nicht extrapoliert werden.

Schweinswale mit lymphozytären Depletionen in Thymus und Milz wiesen i.d.R. deutliche pathologische Befunde, wie Abmagerungen, Pneumonien, Septikämien bzw. Dermatitisden, auf. Jedoch handelt es sich bei diesen Erkrankungen nicht um die Folge einer spezifischen

Noxe, wie beispielsweise eine Infektion mit hochvirulenten Morbilliviren. In der vorliegenden Untersuchung wurden vorwiegend parasitäre Infestationen und Infektionen mit fakultativ pathogenen, bakteriellen Erregern beobachtet. Die Nematoden und Bakterien finden sich im Lebensraum der Tiere, ohne lebensbedrohende Erkrankungen hervorzurufen. Erst durch eine Immunsuppression der Tiere kommt es zur Exazerbation. Jepson et al. (1999) beschreiben die Korrelation der PCB-Belastung mit dem Auftreten von infektiösen Erkrankungsursachen bei Schweinswalen aus Gewässern um England und Wales. Zusätzlich findet sich ein negativer Einfluss von nicht-organischen Umweltchemikalien, wie beispielsweise Quecksilberverbindungen, auf den Gesundheitsstatus der Schweinswale aus der deutschen Nord- und Ostsee. Wie in der vorliegenden Arbeit, werden in diesen pathologischen Untersuchungen nur unspezifische Erkrankungsursachen gefunden (Siebert et al., 1999). Die Autoren folgern daraus, dass mögliche immuntoxische Effekte der Umweltchemikalien zu einer erhöhten Krankheitsanfälligkeit der Schweinswale führen können. Eine erhöhte Inzidenz von neoplastischen Erkrankungen, wie sie bei PCB- und Benzoapyren-belasteten Belugawalen im St. Lawrence Strom (Kanada) beschrieben werden, konnte in der vorliegenden Studie nicht festgestellt werden (De Guise et al., 1994, Martineau et al., 1987).

5.4. Schlußbetrachtung

Die Untersuchungen unterstützen die Hypothese einer schadstoffbedingten Immunsuppression beim Schweinswal (Jepson et al., 1999, Siebert et al., 1999). Erstmals wurde der Schwund an lymphatischen Zellen in Thymus und Milz dieser Tierart beschrieben und ein Zusammenhang mit der PBDE- und PCB-Belastung aufgezeigt. Weiterhin wurden assoziierte Veränderungen der Lymphozyten-Subpopulationen und der Zytokin-Expression ermittelt. Allerdings stellen die Befunde am Immunsystem der Wale keine spezifischen immuntoxischen Veränderungen dar, sondern werden infolge verschiedener immunsuppressiver Einflüsse beobachtet (Durchfeld et al., 1989; Quaglino und Ronchette, 2001; Wünschmann et al., 2000). Inwieweit die lymphozytäre Depletion in Thymus und Milz primär durch Organochloride verursacht oder als Folge der beschriebenen Krankheitserscheinungen anzusehen ist, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Weiterhin blieb die Kontamination der Schweinswale mit anorganischen Xenobiotika, vor allem mit Quecksilberverbindungen, in der vorliegenden Untersuchung unberücksichtigt (Joiris et al., 2001; Siebert et al., 1999). Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen bleibt spekulativ, ob die Thymusatrophie und Milzdepletion mit einer

verminderten Immunantwort vergesellschaftet und damit für die Häufung von bakteriellen und parasitären Erkrankungen der Tiere verantwortlich sind. Die Quantifizierung der zellulären Immunantwort mittels des Lymphozytenstimulationstests sowie der Zytokin-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR am lebenden Tier stellen sinnvolle Ergänzungen zur Untersuchung möglicher immunologischer Defizite beim Schweinswal dar (Gröne et al., 1998; Kristensen et al., 1982).

6. Zusammenfassung

1. Neben hohen Beifangzahlen und einem verminderten Nahrungsangebot sind die Schweinswale der Deutschen Nord- und Ostsee durch die zunehmende Häufigkeit bakterieller und parasitärer Erkrankungen gefährdet. Weiterhin akkumulieren die Wale große Mengen an organischen und anorganischen Schadstoffen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den möglichen Zusammenhang zwischen der Schadstoffbelastung und Veränderungen im Immunsystem der Schweinswale zu untersuchen.

2. Im Literaturteil wird die Taxonomie und Ökologie sowie die aktuelle Situation der Schweinswale in der Nord- und Ostsee dargestellt. Weiterhin werden Studien zur zellulären und humoralen Immunantwort sowie zur Immuntoxizität bei marinen Säugetieren beschrieben. Neben morphologischen Aspekten werden pathologische Veränderungen der lymphatischen Organe verschiedener Wal- und Robbenarten berücksichtigt. Abschließend wird der gegenwärtige Stand der Forschung auf dem Gebiet der Immunphänotypisierung lymphatischer Zellen und der Zytokine bei Meeressäugtieren erläutert.

3. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden 26 monoklonale (mAK) und ein polyklonaler Antikörper (pAK) unterschiedlicher Spezies auf ihre immunhistologische Kreuzreaktivität mit gefrorenen und Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten lymphatischen Geweben des Schweinswales getestet. T-Lymphozyten wurden durch einen mAK und pAK Anti-CD3-Antikörper sowie durch zwei monoklonale walspezifische Anti-CD2-Antikörper markiert. Ein walspezifischer CD45R-Marker zeigte eine starke Reaktion auf B-Lymphozyten, während T-Lymphozyten eine schwache Reaktion aufwiesen. MHC Klasse II-Antigen, welches durch einen bovinen und walspezifischen mAK erkannt wurde, fand sich auf T- und B-Lymphozyten. Ein kaniner MHC Klasse II-spezifischer mAK reagierte mit Oberflächenantigenen von Antigen-präsentierenden Zellen und B-Lymphozyten. Ein equiner Pan-Leukozytenmarker erkannte die meisten Zellen der T- und B-Zellkompartimente.

4. Zur Untersuchung der zellulären Immunantwort wurden periphere Blutlymphozyten von vier Schweinswalen isoliert. Nach Inkubation mit Concanavalin A (Con A), Phytohämagglutinin (PHA) und „pokeweed mitogen“ (PWM) wurde die Zellproliferation durch BrdU-Inkorporation photometrisch gemessen. Con A und PHA stellten die effektivsten Mitogene dar, während PWM eine vergleichsweise geringe Proliferation der Lymphozyten induzierte.

5. Mittels RT-PCR wurde die Genexpression ausgewählter Zytokine und des Haushaltsgens GAPDH im Lymphozytenstimulationstest untersucht. Durch die selektierten Primer konnte die mRNA von IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β und TNF- α in Con A und PWM-stimulierten Zellen detektiert werden. In PHA-stimulierten Zellen konnte keine IL-2-mRNA nachgewiesen werden. IL-10 und GAPDH fanden sich in unstimulierten und stimulierten Zellen. Die Spezifität der Amplifikate wurde durch die DNS-Analyse bestätigt.

6. Gegenstand der Hauptuntersuchungen waren 61 gestrandete und beigefangene Schweinswale aus der Nord- und Ostsee sowie aus isländischen und norwegischen Gewässern. Für die histologische Befunderhebung wurden Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettete, HE-gefärbte Gewebsschnitte verwendet. Die Gradierung der Thymusatrophie und Milzdepletion erfolgte anhand morphologischer Kriterien. Weiterhin wurde der Gesundheitsstatus der Tiere aufgrund des Ernährungszustandes und der pathologischen Veränderungen ermittelt. Durch toxikologische Analysen wurden die PCB-, PBDE-, Toxaphen-, DDE- und DDT-Konzentrationen im Fettgewebe quantifiziert.

7. Der Respirationstrakt wies die häufigsten, pathologischen Befunde auf. Gestrandete Schweinswale zeigten einen schlechteren Ernährungs- und Gesundheitszustand als beigefangene Tiere. Weiterhin fand sich eine positive Korrelation zwischen der Thymusatrophie bzw. Milzdepletion und erhöhten PCB- und PBDE-Konzentrationen. Zusätzlich bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Depletion beider Organe und dem Gesundheits- bzw. Ernährungszustand.

8. Mittels Immunhistologie wurden unterschiedlich stark depletierte Thymi und Milzen von 29 Tieren phänotypisch charakterisiert. Zusätzlich wurde mittels semiquantitativer Echtzeit-RT-PCR die Zytokin-Expression in diesen Organen und dem Blut der Tiere gemessen.

9. Die Thymusatrophie war mit einer Depletion der CD2⁺/CD3e⁺-Zellen vergesellschaftet. In hochgradig atrophischen Thymi fand sich mit dem bovinen Antikörper eine kortikale MHC Klasse II-Aufregulation. Weiterhin war die Thymusatrophie mit einem Verlust der medullären CD45R- und MHC Klasse II-exprimierenden Zellen verbunden. Die Milzdepletion war durch einen Zellschwund in den Follikeln und der Marginalzone, ohne

phänotypische Veränderungen charakterisiert. Jedoch fand sich in der PALS ein selektiver Verlust der CD2⁺- und CDe⁺-Lymphozyten.

10. Mittels Echtzeit-RT-PCR konnte mit zunehmender Atrophie eine verminderte Expression von IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 und TNF- α im Thymus nachgewiesen werden, jedoch zeigte lediglich die Reduktion von IL-6 einen signifikanten Zusammenhang. Die Zytokin-Expression in der Milz wies keine eindeutige Verbindung mit der Depletion auf. In einzelnen intakten und hochgradig depletierten Organen konnte jedoch eine Aufregulation von IL-6, TNF- α und TGF- β festgestellt werden.

11. Die mRNA-Menge von IL-10 im Blut wies einen signifikanten Zusammenhang mit der Milzdepletion auf. Es konnte keine eindeutige Korrelation zwischen der Thymusatrophie und den Zytokinen im Blut festgestellt werden. Jedoch wiesen drei Schweinswale mit hochgradiger Thymusatrophie eine deutliche IL-6-Aufregulation auf.

12. Mit zunehmender Thymusatrophie wird ein T-Zellverlust beobachtet. Die immunphänotypischen Veränderungen sprechen für eine Depletion der unreifen, kortikalen Thymozyten. Weiterhin ist die Reduktion medullärer B-Lymphozyten möglicherweise mit einer gestörten Thymopoese vergesellschaftet. Die Depletion der T- und B-Zellkompartimente in der Milz sowie der selektive Verlust von T-Lymphozyten in der PALS kann als eine Suppression ortständiger Zellen oder eine gestörte Migration aus primären lymphatischen Organen interpretiert werden.

13. Die semiquantitative Echtzeit-RT-PCR stellt ein sensitives Verfahren für den Zytokin-Nachweis dar. Die ausgewählten Zytokine spielen eine Rolle in der Thymopoese und Immunantwort der Schweinswale und der mögliche Zusammenhang mit der Thymusatrophie bzw. Milzdepletion wird diskutiert. Möglicherweise induziert die IL-10-Aufregulation im Blut eine lymphozytäre Suppression in der Milz der untersuchten Wale.

14. Die Untersuchungen unterstützen die Hypothese eines negativen Einflusses von PCB und PBDE auf das Immunsystem der Schweinswale. Jedoch müssen bei der Interpretation weitere immunsuppressive Faktoren wie chronische Erkrankungen und Kachexie der Tiere, welche ebenfalls zu einer lymphozytären Depletion führen können, berücksichtigt werden.

7. Summary

1. The harbor porpoises in the German North and Baltic Seas represents an endangered species due to high by-catch rates, depletion of food sources, and a growing incidence of bacterial and parasitic diseases. As a top predator, whales accumulate environmental contaminants. The aim of the present study was to investigate the possible influence of xenobiotics on the immune system of harbor porpoises.

2. Taxonomy, ecology, and the current status of harbor porpoises in the North and Baltic Seas is reviewed in the literature section. Additionally, investigations upon the cellular and humoral immune response, as well as upon the immunotoxicity in marine mammals are described. Special emphasis is given to the morphology and pathological changes in lymphoid organs of different cetacean and pinniped species. Finally, techniques for immunophenotyping of lymphoid cells and detection of cytokines in marine mammals are described.

3. In the first part of the study 26 monoclonal antibodies (mAb) and one polyclonal antibody (pAb) of different species were tested for immunohistochemical cross-reactivity on frozen or formalin-fixed, paraffin-embedded lymphatic tissues of the harbor porpoise. T-lymphocytes were labeled by a mAb and a pAb directed against the CD3 complex and by two cetacean mAb specific for CD2 antigen. CD45R, labeled by a cetacean mAb, was strongly expressed on B and weakly on T cells. MHC class II antigen, recognized by cetacean and bovine-specific mAbs, was expressed on T and B cells. A canine MHC class II-specific mAb recognized an epitope on the surface of antigen-presenting cells and B lymphocytes. An equine-pan-leukocyte marker labeled the majority of cells in B- and T-cell compartments.

4. To investigate the cellular immune response of peripheral lymphocytes, blood cells were isolated from four harbor porpoises. After concanavalin A (Con A)-, phytohemagglutinin (PHA)-, and pokeweed mitogen (PWM)-stimulation cell proliferation was measured photometrically using BrdU-assay. Con A and PHA were the most effective mitogens, while PWA induced only a comparatively low proliferation.

5. Gene expression of selected cytokines and the housekeeping gene GAPDH in the lymphocyte transformation test was investigated by RT-PCR. Using specific primers IL-2-,

IL-4-, IL-6-, IL-10-, TGF- β - and TNF- α -cDNA were amplified in Con A- and PWM-stimulated cells. IL-2 was not detected in PHA-activated cells. The mRNA of IL-10 and GAPDH was expressed in non-stimulated and stimulated cells. Additionally, specificity of PCR-products was confirmed by sequence analysis.

6. Sixty one by-caught and stranded harbor porpoises from the North and Baltic Seas, as well as from Icelandic and Norwegian waters were investigated. Histological examination was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded and HE-stained tissue sections. Grading of thymic atrophy and splenic depletion was based on morphological criteria. Additionally, the nutritional state and health status of harbor porpoises was determined. Body burden of PCB, PBDE, toxaphen, DDE and DDT was quantified by toxicological analysis.

7. The most severe pathological findings were demonstrated in the respiratory tract. In comparison to by-caught harbor porpoises, most stranded animals showed a poor nutritional state and health status. Furthermore, thymic atrophy and splenic depletion was positively correlated to increased PCB- and PBDE-concentrations. In both organs lymphoid depletion was correlated with a poor nutritional state and health status.

8. Phenotypical changes in thymus and spleen of 29 harbor porpoises were investigated using immunohistochemistry. Furthermore, cytokine expression in these organs and the blood was measured using semiquantitative real-time RT-PCR.

9. Thymic atrophy was associated with a depletion of CD2⁺/CD3 ϵ ⁺-cells. Using the bovine mAb a cortical MHC class II-up-regulation was found in severely atrophic thymuses. Furthermore, thymic atrophy was correlated to a decrease of medullary CD45R- and MHC class II-expressing cells. Splenic depletion was characterized by cellular loss in follicles and the marginal zone, without phenotypical changes. However, in the PALS a selective loss of CD2⁺- and CD3 ϵ ⁺-lymphocytes was demonstrated.

10. Using real-time RT-PCR a loss of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 and TNF- α expression was demonstrated in atrophic thymuses. However, only down-regulation of IL-6-mRNA was statistically significant. Cytokine expression in the spleen showed no association with lymphoid depletion, and in few normal and severely depleted organs a marked up-regulation of IL-6, TNF- α and TGF- β was found.

11. Splenic depletion was significantly associated with an up-regulation of IL-10 in the blood. No definite correlation was found between cytokine expression and thymic atrophy. However, in three animals with severe thymic atrophy high levels of IL-6 were found in the blood samples.

12. Thymic atrophy of the harbor porpoise is associated with a loss of T cells predominantly in the cortex. Furthermore, immunophenotypical changes demonstrated a depletion of immature cortical thymocytes. Reduction of medullary B cells may be associated with diminished thymopoiesis. Additionally depletion of splenic T and B cell compartments can be interpreted due to suppression of splenic stem cells or a failure of immigration from primary lymphoid organs.

13. Semiquantitative real time RT-PCR is a sensitive method for the detection of cytokines. The possible role of selected cytokines in the thymopoiesis and the immune response as well as the possible interaction with the observed lymphoid depletion in harbor porpoises is discussed. Up-regulation of IL-10 in the blood may induce a splenic suppression in the investigated harbor porpoises.

14. The results of the present investigation indicate a potential negative influence of PCB and PBDE upon the immune system of harbor porpoises. However, other immunosuppressive factors, such as chronic illness and emaciation can lead to similar changes in lymphoid organs of the animals.

8. Literaturverzeichnis

- Aguilar, A., Borrell, A. (1994). Abnormally high polychlorinated biphenyl levels in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) affected by the 1990-1992 Mediterranean epizootic. *The Science of the Total Environment* 154: 237-247.
- Andersen, S.H. (1982). Change in the occurrence of the harbour porpoise, *Phocoena phocoena*, in Danish waters as illustrated by catch statistics from 1834 to 1970. *Mammals in The Sea (FAO)* 4: 131-133.
- Anderson, G., Moore, N.C., Owen, J.J.T., Jenkinson, E.J. (1996). Cellular interactions in thymocyte development. *Annual Reviews Immunology* 14: 73-99.
- Andresdottir, V., Magnadottir, B., Andresson, O.S., Petursson, G. (1987). Subclasses of IgG from whales. *Developmental and Comparative Immunology* 11: 801-806.
- Ayala, A., Chung, C., Song, G.Y., Chaudry, I.H. (2001). IL-10 mediation of activation-induced Th1 cell apoptosis and lymphoid dysfunction in polymicrobial sepsis. *Cytokine* 14: 1043-4666.
- Baker, J.R., Martin, A.R. (1992). Cause of mortality and parasites and incidental lesions in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from British waters. *Veterinary Record* 130: 554-558.
- Bandomir-Krischak, B. (1993). Anatomische und histologische Untersuchungen zur Reproduktionsbiologie des Schweinswals (*Phocoena phocoena*) in Deutschen Gewässern. Diplomarbeit, Institut für Haustierkunde der Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
- Barbis, D.P., Bainbridge, D., Crump, A.L., Zhang, C.H., Antczak, D.F. (1994). Variation in expression of MHC-II antigens on horse lymphocytes determined by MHC haplotype. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 42: 103-114.
- Baseta, J.G., Stutman, O. (2000). TNF regulates thymocyte production by apoptosis and proliferation of the triple negative (CD3-/CD4-/CD8-) subset. *Journal of Immunology* 165: 5621-5630.
- Benke, H., Siebert, U., Lick, R., Bandomir, B., Weiss, R. (1998). The current status of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in German waters. *Archives of Fishery and Marine Research* 46: 97-123.
- Bernier, J., De Guise, S., Martineau, D., Beland, P., Beaudet, M., Fournier, M. (2000). Purification of functional T lymphocytes from splenocytes of the beluga

- whales (*Delphinapterus leucas*). *Developmental and Comparative Immunology* 24: 653-662.
- Blaylock, B.L., Holladay, S.D., Comment, C.E., Heindell, J.J., Luster, M.I. (1992). Exposure to tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters fetal thymocytes maturation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 112: 207-213.
- Boon, J.P., Lewis, W.E., Tjoen-A-Choy, M.R., allchin, C.R., Law, R.J., De Boer, J., Ten Hallers-Tjabbes, C.C., Zegers, B.N. (2002). Levels of polybrominated diphenyls ether (PBDE) flame retardants in animals representing different trophic levels of the North Sea food web. *Environmental Science and Technology* 36: 4025-4032.
- Bornemann, A., Kirchner, T. (1996). An immuno-electron-microscopic study of human thymic B cells. *Cell Tissue Research* 284: 481-487.
- Borrell, A., Bloch, D., Desportes, G. (1995). Age trends and reproductive transfer of organochlorine compounds in long-finned pilot whales from the Faroe Islands. *Environmental Pollution* 88: 283-292.
- Bruhn, R., Kannan, N., Petrick, G., Schulz-Bull, D.E., Duinker, J.C. (1999). Persistent chlorinated organic contaminants in harbour porpoises from the North Sea, the Baltic Sea and Arctic waters. *The Science of the Total Environment* 237/238: 351-361.
- Bruno, S., Lassota, P., Giaretti, W., Darzynkiewicz, Z. (1992). Apoptosis of rat thymocytes triggered by prednisolone, camptothecin, or teniposide is selective to G0 cells and is prevented by inhibitors of proteases. *Oncology Research* 4: 29-35.
- Cardering, S.R., Hayday, A.C., Bottomly, K. (1991). Cytokines in T-cell development. *Immunology Today* 12: 239-246.
- Carter, S.D., Hughes, D.E., Baker, J.R. (1990). Characterization and measurement of immunoglobulins in the grey seal (*Halichoerus grypus*). *Journal of Comparative Pathology* 102: 13-23.
- Cavagnolo, R.Z. (1979). The immunology of marine mammals. *Developmental and Comparative Immunology* 3: 245-257.
- Cervenka, A., Kovar, H., Majdic, O., Holter, W. (1996). Fas- and activation-induced apoptosis are reduced in human T cells preactivated in the presence of TGF-beta 1. *Journal of Immunology* 156: 459-464.
- Cervenka, A., Bevec, B., Majdic, O., Knapp, W., Holter, W. (1994). TGF-beta 1 is a potent inducer of human effector T cells. *Journal of Immunology* 153: 4367-4377.

- Chen, W.F., Zlotnik, A. (1991). IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *Journal of Immunology* 147: 528-534.
- Cobbold, S., Metcalfe, S. (1994). Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: Summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). *Tissue Antigens* 43:137-154.
- Colgrove, G.S. (1978). Stimulation of lymphocytes from a dolphin (*Tursiops truncatus*) by phytomitogens. *American Journal of Veterinary Research* 39: 141-144.
- Cowan, D.F. (1994). Involution and cystic transformation of the thymus in the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*. *Veterinary Pathology* 31: 648-653.
- Cowan, D.F., Smith, T.L. (1995). Morphology of complex lymphoepithelial organs of the anal canal ("anal tonsil") in the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*. *Journal of Morphology* 223: 263-268.
- Cowan, D.F., Smith, T.L. (1999). Morphology of the lymphoid organs of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*. *Journal of Anatomy* 194: 505-517.
- Dai, G., Phalen, S., McMurray, D.N. (1998). Nutritional modulation of host responses to mycobacteria. *Frontiers in Bioscience* 20: 110-122.
- De Guise, S., Bernier, J., Dufresne, M.M., Martineau, D., Beland, P., Fournier, M. (1996). Immune function in beluga whales (*Delphinapterus leucas*): Evaluation of mitogen-induced blastic transformation of lymphocytes from peripheral blood, spleen and thymus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 50: 117-126.
- De Guise, S., Bernier, J., Martineau, D., Beland, P., Fournier, M. (1997a). Phenotyping of beluga whale blood lymphocytes using monoclonal antibodies. *Developmental and Comparative Immunology* 21: 425-433.
- De Guise, S., Erickson, K., Blanchard, M., DiMolfetto, L., Lepper, H.D., Wang, J., Stott, J.L., Ferrick, D.A. (2002). Monoclonal antibodies to lymphocyte surface antigens for cetacean homologues to CD2, CD19 and CD21. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 84: 209-221.
- De Guise, S., Erickson, K., Blanchard, M., Dimolfetto, L., Lepper, H., Wang, J., Stott, J.L., Ferrick, D.S. (1998a). Characterization of a monoclonal antibody that recognizes a lymphocyte surface antigen for the cetacean homologue to CD45R. *Immunology* 94: 207-212.
- De Guise, S., Flipo, D., Boehm, J.R., Martineau, D., Beland, P., Fournier, M. (1995a). Immune function in beluga whales (*Delphinapterus leucas*): Evaluation of

- phagocytosis and respiratory burst with peripheral blood leukocytes using flow cytometry. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 47: 351-362.
- De Guise, S., Lagace, A., Beland, P. (1994). Tumors in St. Lawrence Beluga Whales (*Delphinapterus leucas*). *Veterinary Pathology* 31: 444-449.
- De Guise, S., Martineau, d., Beland, P., Fournier, M. (1995b). Possible mechanisms of action of environmental contaminants on St. Lawrence beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *Environmental Health Perspectives* 103: 73-77.
- De Guise, S., Martineau, D., Beland, P., Fournier, M. (1998b). Effects of in vitro exposure of beluga whale leukocytes to selected organochlorines. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 55: 479-493.
- De Guise, S., Ross, P.S., Osterhaus, A.D.M.E., Martineau, D., Beland, P., Fournier, M. (1997b). Immune function in beluga whales (*Delphinapterus leucas*): evaluation of natural killer cell activity. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 58: 345-354.
- De Heer, C., Schuurman, H.J., Vos, J.G., VanLoveren, H. (1994). Lymphodepletion of the thymus cortex in rats after single oral intubation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Chemosphere* 29: 2295-2299.
- De la Hera, A., Toribio, M.L., Marcos, M.A., Marquez, C., Martinez, C. (1987). Interleukin 2 pathway is autonomously activated in human T11+3-4-6-8-thymocytes. *European Journal of Immunology* 17: 683-687.
- De la Hera, A., Toribio, M.L., Marquez, C., Marcos, M.A., Cabrero, E., Martinez, C. (1986). Differentiation of human mature thymocytes: existence of a T3+4-8-intermediate stage. *European Journal of Immunology* 16: 653-658.
- De Swart, R.L., Kluten, R.M.G., Huizing, C.J., Vedder, L.J., Reijnders, P.J.H., Visser, I.K.G., UytdeHaag, F.G.C.M., Osterhaus, A.D.M.E. (1993). Mitogen and antigen induced B and T cell responses of peripheral blood mononuclear cells from the harbour seal (*Phoca vitulina*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 37: 217-230.
- De Swart, R.L., Ross, P.S., Timmermann, H.H., Vos, H.W., Reijnders, P.J.H., Vos, J.G., Osterhaus, A.D.M.E. (1995). Impaired cellular immune response in harbour seals (*Phoca vitulina*) feeding on environmentally contaminated herring. *Clinical and Experimental Immunology* 101: 480-486.
- De Swart, R.L., Ross, P.S., Vos, J.G., Osterhaus, A.D. (1996). Impaired immunity in harbour seals (*Phoca vitulina*) exposed to bioaccumulated environmental contaminants:

- review of a long-term feeding study. *Environmental Health Perspectives* 104: 823-828.
- De Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C., De Vries, J. (1991). IL-10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 by monocytes. *Journal of Experimental Medicine* 174: 1209-1220.
- Dixon, W.J. (1993). *BMDP statistical software manual*. Volume 1 and 2. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London.
- Domingo, M., Visa, J., Pumarola, M., Marco, A.J., Ferrer, L., Rabanal, R., Kennedy, S. (1992). Pathologic and immunocytochemical studies of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Veterinary Pathology* 29: 1-10.
- Doveren, R., Buurman, W.A., Schutte, B., Groenewegen, G., Van der Linden, C.J. (1985). Class II antigens on canine T lymphocytes. *Tissue Antigens* 25: 255-265.
- Duinker, J.C. Hillebrand, M.T.J., Zeinstra, T., Boon, J.P. (1989). Individual chlorinated biphenyls and pesticides in tissues of some cetacean species from the North Sea and the Atlantic Ocean; tissue distribution and biotransformation. *Aquatic Mammals* 15: 95-124.
- Durchfeld, B., Käufer-Weiss, I., Weiss, E. (1989). Akzidentelle Thymusinvolutions bei Kälbern. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 102: 400-405.
- Fan, J., Nishanian, P., Breen, E.C., McDonald, M., Fahey, J.L. (1998). Cytokine gene expression in normal human lymphocytes in response to stimulation. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 5: 335-340.
- Fine, J.S., Silverstone, A.E., Gasiewicz, T.A. (1990). Impairment of prothymocyte activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Journal of Immunology* 144: 1169-1176.
- Fisher, H.D., Harrison, R.J. (1970). Reproduction in the common porpoise (*Phocoena phocoena*) of the North Atlantic. *Journal of Zoology and Sociology* 161: 471-486.
- Flores, K.G., Li, J., Hale, L.P. (2001). B cells in epithelial and perivascular compartments of human adult thymus. *Human Pathology* 32: 926-934.
- Fournier, M., Degas, V., Colborn, T., Omara, F.O., Denizeau, F., Potworowski, E.F., Brousseau, P. (2000). Immunosuppression in mice fed on diets containing beluga whale blubber from the St. Lawrence estuary and the arctic populations. *Toxicological Letters* 15: 311-317.

- Fowles, J.R., Fairbrother, A., Baecher-Steppan, L., Kerkvliet, N.I. (1994). Immunologic and endocrine effects of the flame-retardant pentabromodiphenyl ether (DE-71) in C57BL/6J mice. *Toxicology* 26: 49-61.
- Friess, A.E., Schlüns, J. (1990). Das Immunsystem und die Organe der Abwehr. In: Mosiman, W., Kohler, T. *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haustiere*. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg.
- Frisk, A.L., Baumgärtner, W., Gröne, A. (1999). Dominating interleukin-10 mRNA expression induction in cerebrospinal fluid cells of dogs with natural canine distemper virus induced demyelination and non-demyelinating CNS lesions. *Journal of Neuroimmunology* 97: 102-109.
- Funke, C., King, D.P., Brotheridge, R.M., Adelung, D., Stott, J.L. (1997). Harbor seal (*Phoca vitulina*) C-reactive protein (C-RP): purification, characterization of specific monoclonal antibodies and development of an immuno-assay to measure serum C-RP concentrations. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 59: 151-162.
- Gauthier, J.M., Dubeau, H., Rassart, E., Jarman, W.M., Wells, R.S. (1999). Biomarkers of DNA damage in marine mammals. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 44: 427-439.
- George, A.J.T., Ritter, M.A. (1996). Thymic involution with aging: obsolescence or good housekeeping? *Immunology Today* 6: 267-272.
- Godfraind, C., Holmes, K.V., Coulelier, J. (1995). Thymus involution induced by mouse hepatitis virus A59 in BALB/c mice. *Journal of Virology* 10: 6541-6547.
- Gröne, A., Fonfara, S., Markus, S., Baumgärtner, W. (1999). RT-PCR amplification of various cytokines and so-called house-keeping genes in a species-specific macrophage cell line (DH82) and canine peripheral blood leukocytes. *Journal of Veterinary Medicine* 46: 301-310.
- Gröne, A., Frisk, A.L., Baumgärtner, W. (1998). Cytokine mRNA expression in whole blood samples from dogs with natural canine distemper virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 65: 11-27.
- Gröne, A., Weckmann, M.T., Capen, C.C., Rosol, T.J. (1996). Canine glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complementary DNA: Polymerase chain reaction amplification, cloning, partial sequence analysis, and use as loading control in ribonuclease protection assay. *American Journal of Veterinary Research* 57: 254-256.

- Haagmans, B.L., Egberink, H.F., Horzinek, M.C. (1996). Apoptosis and T-cell depletion during feline infectious peritonitis. *Journal of Virology* 70: 8977-8983.
- Hall, A.J., Law, R.J., Harwood, J., Ross, H.M., Kennedy, S., Allchin, C.R., Campell, L.A., Pomeroy, P.P. (1992). Organochlorine levels in common seals (*Phoca vitulina*) which were victims and survivors of the 1988 phocine distemper epizootic. *The Science of the Total Environment* 115: 145-162.
- Hammond, P.S., Benke, H., Berggren, P., Borchers, D.L., Buckland, S.T., Collet, A., Heide-Jorgensen, M.P., Heimlich-Boran, S., Hiby, A.R., Leopold, M.F., Oien, N. (1995). Distribution and abundance of the harbour porpoise and other small cetaceans in the North Sea and adjacent waters. Final report to the European Commission. Life 92-2/UK/02/.
- Hewitt, C.R.A., Feldman, M., (1989). Human T cell clones present antigen. *Journal of Immunology* 142, 1429-1436.
- Hoelzel, A.R., Stephens, J.C. O'Brien, S.J. (1999). Molecular genetic diversity and evolution at the MHC DQB locus in four species of pinnipeds. *Molecular Biology and Evolution* 16: 611-618.
- Hopkins, J., Ross, A., Dutia, B.M. (1993). Summary of workshop findings of leukocytes antigens for sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 39: 49-59.
- Hossain, A., Tsuchiya, S., Minegishi, M., Osada, M., Ikawa, S., Tezuka, F., Kaji, M., Konno, T., Watanabe, M., Kikuchi, H. (1998). The Ah receptor is not involved in 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated apoptosis in human leukemic T cell lines. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 19853-19858.
- Howard, C.J., Naessens, J. (1993). Summary of workshop findings for cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 39: 25-48.
- Howard, J.K., Lord, G.M., Matarese, G., Vendetti, S., Ghatei, M.A., Ritter, M.A., Lechler, R.I., Bloom, S.R. (1999). Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *The Journal of Clinical Investigation* 104: 1051-1059.
- Huggenberger, S., Benke, H. (2002). Geographical variation in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) skulls: Support for a separate non-migratory population in the Baltic Proper. *Ophelia* 56: 1-12.
- Hutchison, J.M., Garry, F.B., Johnson, L.W., Quackenbush, S.L., Getzy, D.M., Jensen, W.A., Hoover, E.A. (1992). Immunodeficiency syndrome associated with wasting and

- opportunistic infections in juvenil Llamas: 12 cases (1988-1990). *Journal of the American Veterinary Medicine Association* 201:1070-1076.
- Imbeault, P., Chevrier, J., Dewailly, E., Ayotte, P., Despres, J.P., Tremblay, A., Mauriege, P. (2001). Increase in plasma pollutant levels in response to weight loss in humans is related to in vitro subcutaneous adipocyte basal lipolysis. *International Journal of Obesitas and related Disorders*. 25: 1585-1591.
- Inoue, Y., Itou, T., Jimbo, T., Sakai, T., Ueda., K., Imajoh-Ohmi, S., Iida, T. (2000). Molecular cloning and identification of bottle-nosed dolphin flavocytochrome b gp91^{phox} and p22^{phox} subunits. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 76: 137-150.
- Inoue, Y., Itou, T., Jimbo, T., Sakai, T., Ueda., K., Imajoh-Ohmi, S., Iida, T. (2001a). Molecular cloning and identification of bottle-nosed dolphin p40^{phox}, p47^{phox} and p67^{phox}. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 78: 21-33.
- Inoue, Y., Itou, T., Jimbo, T., Syouji, Y., Ueda, K., Sakai, T. (2001b). Molecular cloning and functional expression of bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*) interleukin-1 receptor antagonist. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 78: 131-141.
- Inoue, Y., Itou, T., Oike, T., Sakai, T. (1999a). Cloning and sequencing of the bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*) interferon-gamma gene. *Journal of Veterinary Medicine Science* 61: 939-942.
- Inoue, Y., Itou, T., Sakai, T., Oike, T. (1999b). Cloning and sequencing of a bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*) interleukin-4 encoding cDNA. *Journal of Veterinary Medicine Science* 61: 693-696.
- Inoue, Y., Itou, T., Ueda, K., Oike, T., Sakai, T. (1999c). Cloning and sequencing of a bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*) interleukin-1alpha and -1beta complementary DNAs. *Journal of Veterinary Medicine Science* 61: 1317-1321.
- Itou, T., Sugisawa, H., Inoue, Y., Jimbo, T., Sakai, T. (2001). Oxygen radical generation and expression of NADPH oxidase genes in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) neutrophils. *Developmental and Comparative Immunology* 25: 47-53.
- Jauniaux, T., Petitjean, D., Brenez, C., Borrens, M., Brosens, L., Haelters, J., Taverniers, T., Coignoul, F. (2002). Post-mortem findings and causes of death of harbour porpoises (*phocoena phocoena*) stranded from 1990 to 2000 along the

- coastlines of Belgium and northern France. *Journal of Comparative Pathology* 126: 243-253.
- Jensen, T., van de Bildt, M., Dietz, H.H., Andersen, T.H., Hammer, A.S., Kuiken, T., Osterhaus, A. (2002). Another phocine distemper outbreak in Europe. *Science* 297: 209
- Jepson, P.D., Baker, J.R., Kuiken, T., Simpson, V.R., Kennedy, S., Bennett, P.M. (2000). Pulmonary pathology of harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded in England and Wales between 1990 and 1996. *Veterinary Record* 146: 721-728.
- Jepson, P.D., Bennett, P.M., Allchin, C.R., Law, R.J., Kuiken, T., Baker, J.R., Rogan, E., Kirkwood, J.K. (1999). Investigating potential associations between chronic exposure to polychlorinated biphenyls and infectious disease mortality in harbour porpoises from England and Wales. *The Science of the Total Environment* 243/244: 339-348.
- Joiris, C.R., Holsbeek, L., Bolba, D., Gascard, C., Stanev, T., Komakhidze, A., Baumgärtner, W., Birkun, A. (2001). Total and organic mercury in the Black Sea harbour porpoise *Phocoena phocoena relicta*. *Marine Pollution Bulletin* 42: 905-911.
- Jones, M., Cordell, J.L., Beyer, A.D., Tse, A.G. and Mason, D.Y. (1993). Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive anti-peptide antibodies. *Journal of Immunology* 150: 5429-5435.
- Kamath, A.B., Camacho, I., Nagarkatti, P.S., Nagarkatti, M. (1999). Role of Fas-Fas Ligand interactions in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induced immunotoxicity: increased resistance of thymocytes from Fas-deficient (*lpr*) and Fas ligand-defective (*gld*) mice to TCDD-induced toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 160:141-155.
- Kashner, K. (2001). Harbour porpoise in the North Sea and the Baltic – bycatch and current status. Report for the Umweltstiftung WWF Deutschland.
- Kennedy, S. (1998). Morbillivirus infections in aquatic mammals. *Journal of Comparative Pathology* 119: 201-225.
- Kennedy, S., Kuiken, T., Ross, H.M., McAliskey, M., Moffett, D., McNiven, C.M., Carole, M. (1992). Morbillivirus infection in two common porpoises (*Phocoena phocoena*) from the coast of England and Scotland. *Veterinary Record* 131: 286-290.

- Kennedy, S., Smyth, J.A., Cush, P.F., McAliskey, M., McCullough, S.J., Rima, B.K. (1991). Histopathologic and immunocytochemical studies of distemper in harbor porpoises. *Veterinary Pathology* 28: 1-7.
- King, D.P., Hay, A.W.M., Robinson, I., Evans, S.W. (1995). Leucocyte interleukin-1-like activity in the common seal (*Phoca vitulina*) and grey seal (*Halichoerus grypus*). *Journal of Comparative Pathology* 113: 253-261.
- King, D.P., Robinson, I., Hay, A.W., Evans, S.W. (1993). Identification and partial characterization of common seal (*Phoca vitulina*) and grey seal (*Halichoerus grypus*) interleukin-6-like activities. *Developmental and Comparative Immunology* 17: 449-458.
- King, D.P., Schrenzel, M.D., McKnight, M.L., Reidarson, T.H., Hanni, K.D., Stott, J.L., Ferrick, D.A. (1996). Molecular cloning and sequencing of interleukin 6 cDNA fragments from the harbor seal (*Phoca vitulina*), killer whale (*Orcinus orca*) and Southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*). *Immunogenetics* 43: 190-195.
- King, L.E., Fraker, P.J. (2000). Variations in the cell cycle status of lymphopoietic and myelopoietic cells created by zinc deficiency. *The Journal of Infectious Diseases* 182: 16-22.
- Kirkwood, J.K., Bennett, P.M., Jepson, P.D., Kuiken, T., Simpson, V.R., Baker, J.R. (1997). Entanglement in fishing gear and other causes of death in cetaceans stranded on the coast of England and Wales. *Veterinary Record* 141: 94-98.
- Kishimoto, T., Hirano, T. (1988). Molecular regulation of B lymphocyte response. *Annual Reviews of Immunology* 6: 485-512.
- Koopman, H.N., Westgate, A.J, Read, A.J. (1999). Hematology values of wild harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the bay of Fundy, Canada. *Marine Mammal Science* 15: 52-64.
- Korytko, P.J., Casey, A.C., Bush, B., Quimby, F.W. (1999). Induction of hepatic cytochromes P450 in dogs exposed to a chronic low dose of polychlorinated biphenyls. *Toxicological Sciences* 47: 52-61.
- Kremmer, J., Lai, Z.W., Esser, C. (1995). Evidence for promotion of positive selection of thymocytes by Ah receptor agonist 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *European Journal of Pharmacology* 293: 413-427.
- Kristensen, F., Kristensen, B., Lazary, S. (1982). The lymphocyte stimulation test in veterinary immunology. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 3: 203-277.

- Kuiken, T., Bennet, P.M., Allchin, Kirkwood, J.K., Baker J.R., Lockyer, C.R., Walton, M.J., Sheldrick, M.C. (1994). PCBs, cause of death and body condition in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from British waters. *Aquatic Toxicology* 28: 13-28.
- Kuiken, T., Hartmann, M.G. (1993). Cetacean pathology: dissection techniques and tissue sampling. In: *Proceedings of the European Cetacean Society Workshop*, Leiden.
- Kumar, D., Cowan, D.F. (1994). Cross-reactivity of antibodies to human antigens with tissues of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, using immunoperoxidase techniques. *Marine Mammal Science* 10: 188-194.
- Lahvis, G., Wells, R.S., Kuehl, D.W., Stewart, J.L., Rhinehard, H.L., Via, C.S. (1995). Decreased lymphocyte response in free-ranging bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) are associated with increased concentrations of PCBs and DDT in peripheral blood. *Environmental Health Perspectives* 103: 67-72.
- Lahvis, G.P., Wells, R.S., Casper, D., Via, C.S. (1993). In-vitro lymphocyte response of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): Mitogen-induced proliferation. *Marine Environment Research* 35: 115-119.
- Lai, Z., Hundeiker, C., Gleichmann, E., Esser, C. (1997). Cytokine gene expression during ontogeny in murine thymus on activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Molecular Pharmacology* 52: 30-37.
- Lapierre, P., De Guise, S., Muir, D.C.G., Norstrom, R., Beland, P., Fournier, M. (1999). Immune functions in the Fisher rat fed beluga whale (*Delphinapterus leucas*) blubber from the contaminated St. Lawrence estuary. *Environmental Research* 80: 104-112.
- Le, J., Vilcek, J. (1990). Interleukin-6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and acute phase protein response. *Laboratory Investigation* 61: 588-602.
- Lin, Y.S, Huang, Y.T., Chen, P.S., Lin, C.F., Jan, M.S., Lei, H.Y. (1999). Requirement of I-E molecule for thymocyte apoptosis induced by staphylococcal enterotoxin B in vivo. *Cellular Immunology* 193: 71-79.
- Lockyer, C. (1995). A review of factors involved in zonation in odontocete teeth, and an investigation of the likely impact of environmental factors and major life events on harbour porpoise tooth structure. Report of the International Whaling Commission , Special Issue 16: 511-529.

- Luebke, R.W., Hodson, P.V., Faisal, M., Ross, P.S., Grasman, K.A., Zelikoff, J. (1997). Aquatic pollution-induced immunotoxicity in wildlife species. *Fundamental and Applied Toxicology* 37: 1-15.
- Lunn, D.P., Holmes, M.A., Antczak, D.F. (1996). Summary of the second equine leukocyte antigen workshop. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 54: 159-161.
- Markus, S., Failing, K., Baumgärtner, W. (2002). Increased expression of pro-inflammatory cytokines and lack of up-regulation of anti-inflammatory cytokines in early distemper CNS lesions. *Journal of Neuroimmunology* 125: 30-41.
- Martineau, B., Beland, P., Desjardins, C., Lagace, A. (1987). Levels of organochlorine chemicals in tissues of beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence estuary, Quebec, Canada. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 16: 137-147.
- Martineau, D., Lair, S., De Guise, S., Lipscomb T.P., Beland, P. (1999). Cancer in beluga whales from the St Lawrence estuary, Quebec, Canada: a potential biomarker of environmental contamination. *The Journal of Cetacean Research and Management (Special issue 1)* 83: 249-265.
- Matarese, G. (2000). Leptin and the immune system: how nutritional status influences the immune response. *European Cytokine Network* 11: 7-14.
- Mazda, O., Watanabe, Y., Gyotoku, J.I., Katsura, Y. (1991). Requirement of dendritic cells and B cells in the clonal deletion of MIs-reactive T cells in the thymus. *Journal of Experimental Medicine* 173: 539-547.
- McDonald, T.A. (2002). A perspective on the potential health risk of PBDEs. *Chemosphere* 46: 745-755.
- Mikaelian, I., Boisclair, J., Dubey, J.P., Kennedy, S., Martineau, D. (2000). Toxoplasmosis in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence estuary: two case reports and a serological survey. *Journal of Comparative Pathology* 122: 73-76.
- Milinkovitch, M.C., Orti, G., Meyer, A. (1993). Revised phylogeny of whales suggested by mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Nature* 361: 346-348.
- Minh, T.B., Nakata, H., Watanabe, M., Tanabe, S., Miyazaki, N., Jefferson, T.A., Prudente, M., Subramanian, A. (2000). Isomer-specific accumulation and toxic assessment of polychlorinated biphenyls, including coplanar congeners, in cetaceans from the North Pacific and Asian coastal waters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39: 398-410.

- Mohr, E. (1935). Historisch-zoologische Walfischstudien. Beitrag zur Heimatforschung Schleswig-Holstein, Hamburg und Lübeck, Nordelbingen 11: 335-393.
- Moskov, M., Schiwatschewa, T., Bonev, S. (1969). Vergleichshistologische Untersuchungen der Lymphknoten der Säuger. Anatomischer Anzeiger 124: 49-67.
- Müller, G., Siebert, U., Wünschmann, A., Artelt, A., Baumgärtner, W. (2000). Immunohistological and serological investigation of morbillivirus infection in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the German Baltic and North Sea. Veterinary Microbiology 75: 17-25.
- Mumford, D.M., Stockman, G.D., Barsales, P.B., Whitman, T., Wilbur, J.R. (1975). Lymphocyte transformation studies of sea mammal blood. *Experientia* 31: 498-500.
- Murray, B.W., White, B.N. (1998). Sequence variation at the major histocompatibility complex DRB loci in beluga (*Delphinapterus leucas*) and narwhal (*Monodon Monoceros*). *Immunogenetics* 48: 242-252.
- Nash, D.R., Mach, J. (1971). Immunoglobulin classes in aquatic mammals. *Journal of Immunology* 107: 1424-1431.
- Ness, T.L., Bradley, W.G., Reynolds, J.E., Roess, W. B. (1998). Isolation and expression of the interleukin-2 gene from the killer whale, *Orcinus orca*. *Marine Mammal Science* 14: 531-543.
- Oberholzer, C., Oberholzer, A., Clare-Salzler, M., Moldawer, L.L. (2001). Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *The FASB Journal* 15: 879-892.
- Oldenburg, N.B.E., Evans-Storms, R.B., Cidlowski, J.A. (1997). In vivo resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in rat thymocytes with normal steroid receptor function in vitro. *Endocrinology* 138: 810-818.
- Olsson, T. (1995). Critical influence of the cytokine orchestration on the outcome of myelin antigen-specific T-cell autoreactivity in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunological Reviews* 144: 245-268.
- Otto, H.F. (1984). Thymus. In: Otto, H.F. (Hrsg.) *Pathologie des Thymus*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Ozeki, Y., Kaneda, K., Fujiwara, N., Morimoto, M., Oka, S., Yano, M. (1997). In vivo induction of apoptosis in the thymus by administration of mycobacterial cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate). *Infection and Immunity* 5: 1793-1799.

- Pohl-Koppe, A., Balashov, K.E., Steere, A.C., Logigian, E.L., Hafler, D.A. (1998). Identification of a T cell subset capable of both IFN- γ and IL-10 secretion in patients with chronic *Borrelia burgdorferi* infection. *Journal of Immunology*. 160: 1804-1810.
- Pollock, J.M., Rowan, T.G., Dixon, J.B., Carter, S.D., Spiller, D., Warenus, H. (1993). Alteration of cellular immune response by nutrition and weaning in calves. *Research in Veterinary Science*. 55: 298-305.
- Postlethwaite, A.E., Keski-Oja, J., Moses, H.L., Kang, A.H. (1987). Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. *Journal of Experimental Medicine* 165: 251-256.
- Quaglino, D., Ronchetti, P.I. (2001). Cell death in rat thymus: a minireview. *Apoptosis* 6: 389-401.
- Rappolee, D.A. 1990. Optimizing the sensitivity of RT-PCR. *Amplifications. A Forum for PCR Users* 4: 5-7.
- Rawson, A.J., Patton, G.W., Brooks, J.S.J. (1992). Lymphangiomyomatosis in the atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Wildlife Disease* 28: 323-325.
- Reijnders, P.J.H. (1994). Toxicokinetics of chlorobiphenyls and associated physiological responses in marine mammals, with particular reference to their potential for ecotoxicological risk assessment. *The Science of the Total Environment* 154: 229-236.
- Rideout, B. A., Moore, P.F. and Pederson, N.C. (1990). Distribution of MHC class II antigens in feline tissues and peripheral blood. *Tissue antigens* 36: 221-227.
- Romano, T., Felten, S.Y., Olschowka, J.A., Felten, D.L. (1993). A microscopic investigation of the lymphoid organs of the beluga, *Delphinapterus leucas*. *Journal of Morphology* 215: 261-287.
- Romano, T., Ridgway, S., Quaranta, V. (1992). MHC class II molecules and immunoglobulins on peripheral blood lymphocytes of the bottlenosed dolphin, *Tursiops truncatus*. *Journal of Experimental Zoology* 263: 96-104.
- Romano, T.A., Felten, S.Y., Olschowka, J.A., Felten, D.L. (1994). Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid organs in the beluga, *Delphinapterus leucas*: an anatomical link between the nervous and immune systems. *Journal of Morphology* 221: 243-259.

- Romano, T.A., Ridgway, S.H., Felten, L.F., Quaranta, V. (1999). Molecular cloning and characterization of CD4 in an aquatic mammal, the white whale *Delphinapterus leucas*. *Immunogenetics* 49: 376-383.
- Ross, P., De Swart, R., Addison, R., Van Loveren, H., Vos, J., Osterhaus, A. (1996a). Contaminant-induced immunotoxicity in harbour seals: wildlife at risk ? *Toxicology* 112: 157-169.
- Ross, P.S., De Swart, R.L., Reijnders, P.J., Van Loveren, H., Osterhaus, A.D. (1995). Contaminant-related suppression of delayed-type hypersensitivity and antibody response in harbor seals fed herring from the Baltic Sea. *Environmental Health Perspectives* 103: 162-167.
- Ross, P.S., De Swart, R.L., Van der Vliet, H., Willemsen, L., De Klerk, A., Van Amerongen, G., Groen, J., Brouwer, A., Schipholt, I., Morse, D.C., Van Loveren, H., Osterhaus, A.D., Vos, J.G. (1997). Impaired cellular immune response in rats exposed perinatally to Baltic Sea herring oil or 2,3,7,8-TCDD. *Archives of Toxicology* 71: 563-574.
- Ross, P.S., De Swart, R.L., Visser, I.K.G., Vedder, L.J., Murk, W., Bowen, W.D., Osterhaus, A.D.M.E. (1994). Relative immunocompetence of the newborn harbour seal, *Phoca vitulina*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 42: 331-348.
- Ross, P.S., Van Loveren, H., De Swart, R.L., van der Vliet, H., de Klerk, A., Timmerman, H.H., van Binnendijk, R., Brouwer, A., Vos, J.G., Osterhaus, A.D. (1996b). Host resistance to rat cytomegalovirus (RCMV) and immune function in adult PVG rats feed herring from the contaminated Baltic Sea. *Archives of Toxicology* 70: 661-671.
- Saalmüller, A., Aasted, B., Cannals, A. (1994). Summary of workshop findings for porcine T-lymphocyte antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 43: 219-228.
- Salguero, F.J., Ruiz-Villamor, E., Bautista, M.J., Sanchez-Cordon, P.J., Carrasco, L., Gomez-Villamandos, J.C. (2002). Changes in macrophages in spleen and lymph nodes during acute african swine fever. Expression of cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 90: 11-22.
- Savino, W., Dardenne, M. (2000). Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocrine Reviews* 21: 412-443.
- Schulze, G., (1996). *Die Schweinswale*. Westarp Wissenschaften, Magdeburg.

- Shirai, K., Sakai, T., Fukuda, M., Oike, T. (1998a). A monoclonal antibody against dolphin lymphocytes (6E9) which recognizes bovine MHC class II antigen. *Journal of Veterinary Medicine Science* 60: 291-293.
- Shirai, K., Sakai, T., Oike, T. (1998b). Molecular cloning of bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*) MHC class I cDNA. *Journal of Veterinary Medicine Science* 60: 1093-1096.
- Shoda, L.K., Brown, W.C., Rice-Ficht, A.C. (1998). Sequence and characterization of phocine interleukin 2. *Journal of Wildlife Disease* 34: 81-90.
- Shoji, Y., Inoue, Y., Sugisawa, H., Itou, T., Endo, T., Sakai, T. (2001). Molecular cloning and functional characterization of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) tumor necrosis factor alpha. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 82: 183-192.
- Siebert, U., Joiris, C., Holsbeek, L., Benke, H., Failing, K., Frese, K., Petzinger, E. (1999). Potential relation between mercury concentrations and necropsy findings in cetaceans from German waters of the North and Baltic Seas. *Marine Pollution Bulletin* 38: 285-29
- Siebert, U., Müller, G., Desportes, G., Weiss, R., Hansen, K., Baumgärtner, W. (2002). Pyogranulomatous myocarditis due to *Staphylococcus aureus* septicemia in two harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). *Veterinary Record* 150: 273-277.
- Siebert, U., Wünschmann, A., Weiss, R., Frank, H., Benke, H., Frese, K. (2001). Post-mortem findings in harbour porpoises (*phocoena phocoena*) from the German North and Baltic Sea. *Journal of Comparative Pathology* 124: 102-114.
- Slade, R.W. (1992). Limited MHC polymorphism in the southern elephant seal: implications for MHC evolution and the marine mammal population biology. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* 22: 163-171.
- Smith, K.A. (1992): Interleukin-2. *Current Opinion in Immunology* 4: 271-276.
- Smith, T.L., Turnbull, B.S., Cowan, D.F. (1999). Morphology of the complex laryngeal gland in the Atlantic bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*. *The Anatomical Record* 254: 98-106.
- Song, G.Y., Chung, C.S., Chaudry, I.H., Ayala, A. (1999). What is the role of interleukin 10 in polymicrobial sepsis: anti-inflammatory agent or immunosuppressant? *Surgery* 126: 378-383.

- St-Laurent, G., Archambault, D. (2000). Molecular cloning, phylogenetic analysis and expression of beluga whale (*Delphinapterus leucas*) interleukin 6. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 73: 31-44.
- St-Laurent, G., Beliveau, C., Archambault, D. (1999): Molecular cloning and phylogenetic analysis of beluga whale (*Delphinapterus leucas*) and grey seal (*Halichoerus grypus*) interleukin 2. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 67: 385-394.
- Strober, W., Kelsall, B., Fuss, I., Marth, T., Ludviksson, B., Ehrhardt, R., Neurath, M. (1997). Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunology Today* 18: 61-64.
- Tanabe, S., Iwata, H., Tatsukawa, R. (1994). Global contamination by persistent organochlorines and their ecotoxicological impact on marine mammals. *The Science of the Total Environment* 154: 163-177.
- Tian, Y., Ke, S., Denison, M.S., Rabson, A.B., Gallo, M.A. (1999). Ah receptor and NF- κ B interaction, a potential mechanism for dioxin toxicity. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 510-515.
- Tiedemann, R., Harder, J, Gmeiner, C., Haase, E. (1996). Mitochondrial DNA sequence patterns of the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) from the North and Baltic Sea. *Zeitschrift für Säugetierkunde* 61: 104-111.
- Tolley, K.A., Rosel, P.E., Walton, M., Bjorge, A., Oien, N. (1999). Genetic population structure of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in the North Sea and Norwegian waters. *Journal of Cetacean Research and Management* 1: 265-274.
- Tolley, K.A., Vikingsson, G.A., Rosel, P.E. (2001). Mitochondrial DNA sequence variation and phylogenetic patterns in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the North Atlantic. *Conservation Genetics* 2: 346-361.
- Toribio, M.L., Gutierrez-Ramos, J.C., Pezzi, L., Marcos, M.A., Martinez, C. (1989). Interleukin-2-dependent autocrine proliferation in T-cell development. *Nature* 342: 82-85.
- Travis, J.C., Sanders, B.G. (1972). Whale immunology-II. Heavy chain structure. *Comparative Biochemistry and Physiology* 43: 637-641.
- Tryphonas, H. (1994). Immunotoxicity of polychlorinated biphenyls: present status and future considerations. *Experimental and Clinical Immunogenetics* 11: 149-162.

- Turnbull, B.S., Cowan, D.F. (1999). Angiomatosis, a newly recognized disease in atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Gulf of Mexiko. *Veterinary Pathology* 36: 28-34.
- Van Loveren, H., Ross, P.S., Osterhaus, A.D., Vos, J.G. (2000) Contaminant-induced immunosuppression and mass mortalities among harbor seals. *Toxicology Letters* 112-113: 319-324.
- Waddell, V.G., Milinkovitch, M.C., Berube, M., Stanhope, M.J. (2000). Molecular phylogenetic examination of the Delphinoidea trichotomy: congruent evidence from three nuclear loci indicates that porpoises (Phocoenidae) share a more recent common ancestry with white whales (Monodontidae) than they do with true dolphins (Delphinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15: 314-318.
- Wagner, U., Burkhardt, E., Failing, K. (1999). Evaluation of canine lymphocyte proliferation: comparison of three different colorimetric methods with the ³H-thymidine incorporation assay. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 70: 151-159.
- Wang, S.D., Huang, K.J., Lin, Y.S., Lei, H.Y. (1994). Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *Journal of Immunology* 15: 5014-5021.
- Watanabe, M., Tanabe, S., Tatsukawa, R., Amano, M., Miyazaki, N., Petrov, E.A., Khiraskin, S.L. (1999). Contamination levels and specific accumulation of persistent organochlorines in Caspian Seal (*Phoca caspica*) from the Caspian Sea, Russia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37: 396-407.
- Watts, P., Gaskin, D.E. (1985). Habitat index analysis of the harbor porpoise (*Phocoena phocoena*) in the southern coastal bay of Fundy, Canada. *Journal of Mammology* 66: 733-744.
- Wünschmann, A., Kremmer, E., Baumgärtner, W. (2000). Phenotypical characterization of T- and B cell areas in lymphoid tissues of dogs with spontaneous distemper. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 73: 83-98.
- Wünschmann, A., Siebert, U., Frese, K. (1999a). Thymic cysts in harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) from the German North Sea, Baltic Sea, and Waters of Greenland. *Veterinary Pathology* 36: 391-396.
- Wünschmann, A., Siebert, U., Frese, K., Weiss, R., Lockyer, C., Heide-Jorgensen, M.P., Müller, G., Baumgärtner, W (2001). Evidence of infectious diseases in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) hunted in the waters of Greenland and by-

- caught in the German North Sea and Baltic Sea. *Veterinary Record* 148: 715-720.
- Wünschmann, A., Siebert, U., Weiss, R. (1999b). Rhizopusmycosis in a harbor porpoise from the Baltic Sea. *Journal of Wildlife Disease* 35: 569-573.
- Wyllie, A.H. (1980). Glucocortikoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556.
- Yancy, H., Ayers, S.L., Farrell, D.E., Day, A., Myers, M.J. (2001). Differential cytokine mRNA expression in swine whole blood and peripheral blood mononuclear cell cultures. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 79: 41-52.
- Yonezawa, M., Nakamine, H., Tanaka, T., Miyaji, T. (1989). Hodgkin's disease in a killer whale (*Orcinus orca*). *Journal of Comparative Pathology* 100: 203-207.
- Zwillenberg, H.H.L. (1959). Über die Milz des Brautfisches [*Phocoena phocoena* (L.)]. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 121: 9-18.

Teile dieser Arbeit wurden vorab veröffentlicht:

- Beineke, A., Siebert, U., Wünschmann, A., Stott, J.L., Prengel, I., Kremmer, E., Baumgärtner, W. (2001). Immunohistochemical investigation of the cross-reactivity of selected cell markers from various species for characterization of lymphatic tissues in the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*). *Journal of Comparative Pathology* 125: 311-317.

9. Anhang

9.1. Bezugsquellen für Chemikalien, Enzyme und Antikörper

Advanced Biotechnologies, Hamburg

Superladder-Low (100bp Längenstandard), SLL-100S

Typ II sample loading buffer (6x), 1,0 ml 15%w/v Ficol 400 (Pharmacia), 0,06% w/v Xylol

Zyanol FF, 30 mM EDTA

Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim

DNase I, RNase-frei, 776 785

Ethidiumbromid, 200271

Canon, Laborservice GmbH, Wiesbaden

biotiniliertes Pferd anti-Maus-Immunglobulin (Vector Laboratories), BA 2000

biotiniliertes Kaninchen anti-Ratte-Immunglobulin (Vector Laboratories), BA 4000

biotiniliertes Ziege anti-Kaninchen-Immunglobulin (Vector Laboratories), BA 1000

Vectastain ABC-Kit, (Vector Laboratories), PK 4000

Dianova, Hamburg

RNaid[®]PLUS Kit (bio 101), 1009 200

Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm

Diethyl-Pyrokarbonat (DEPC), purum, 32490

Di-Natrium-Ethylendiamino-tetra-Essigsäure (EDTA) puriss. p.a. ACS, 03680

Imidazol puriss. p. a., 56750

3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) purum p.a., 32750

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 93352

Isopentan, 59075

Gibco-BRL, Eggstein

Agarose Ultra Pure[™], 15510-019

TRIZOL[®]-Reagenz, 15596-0926

Hecht I., Kiel-Hassee

Eukitt® (Corbit-Balsam)

MBI Fermentas

Ribonuklease-Inhibitor, E00312

Merck E., Darmstadt

Aceton p.a. ACS, ISO, 100014

Äthanol (Alkohol) absolut p.a., 972

Borsäure krist. Reinst, 160

Eosin (gelblich), 1345

Giemsa-Lösung, 9204

Hämatoxylin, 4305

May-Grünwald-Lösung, modifiziert 1424

Natriumchlorid reinst, 6400

Papanicolaou-Lösung 1b, 9254

Perhydrol® 30%iges H₂O₂ p.a., 107210

2-Propanol (Isoproylalkohol) reinst, 8995

Tritisol® (1N HCl) 1M/l, 9970

Xylol, reinst, 8685

PAA Laboratories, Cölbe

Eagles Minimal Essential Medium mit Earle'scher Salzlösung und Glutamin, E15-852

Fetales Kälberserum, A14-042

Perkin Elmer, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt

GeneAmp RNA PCR Core Kit, N 808 0143

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I, 3003230

LightCycler Capillaries, 1909339

Roth C., Karlsruhe

Agarose, Rotigarose®, 2267

Äthanol, Rotipuran® >99,8% p.a. MW 46,07, 9065,1
2-Propanol, (Isopropylalkohol) Rotipuran® >99,7% p.a., MW60, 10,6752,1
Formaldehyd 36%ig
Methanol 99,8%ig p.p., 4627
Natriumchlorid, 3957.1
Roti®-Histol, 6640
Trichlormethan/Chloroform, MW 119,38,7331.1
Trypanblau (C.N.I.23850), 4856

Seromed

Penicillin-Streptomycin, 10000U/ml, A2212

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Concanavalin A, C5275
Phytohämagglutinin, L9132
Pokeweed Mitogen, L8777
Bakterielle Protease, Typ XXIV, P8038

Vogel GmbH & Co KG, Gießen

Tissue Tec® O.C.T.-Einbettmittel, LT 45839
Tissue-embedding medium, Schmelzpunkt 56/58°C (Paraffin), 4583

9.2. Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel

Bessier, Wiesbaden

Polaroid Film, Noir & Blanc, A667, Tageslichtfilm

Biozym, Deutschland

Multicycler® PTC 200
Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 1000 µl, 781002
Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 200 µl, 780202
Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 20 µl, 7810027
PCR-Tubes 0,5 ml, 710910

Consort, Belgien

Mikrocomputer Elektrophoresis Power Supply, E425

Engelbrecht, Edermünde

Star Frost® Objektträger

Eppendorf Hamburg

Eppendorf Zentrifuge, 5415 C

Fischer, Frankfurt

96-Flachloch-Mikrotiterplatte, Falcon® Becton Dickenson, 3072

Heraeus

Laminar Air® LB-48-C

Hettich, A., Tuttlingen

Kühlzentrifuge Rotina, 48 RC

Keutz, Reiskirchen

Flachgel-Elektrophoresekammer „Midi“, horizontal, 0030191-00

Gießvorrichtung, 0030191-03

Shandon, Frankfurt

Zytozentrifuge, Shandon Elliot Cytospin

Menzel Gläser, Glasbearbeitungswerke GmbH & Co KG, Braunschweig

Super Frost Plus®-Objektträger, 041300

Pharmacia Biotech, Freiburg

Spektralphotometer GenQuant 2

Polaroid, Massachusetts, USA

Kamera MP 4

Reichert-Jung GmbH, Nußloch

Krytom Frigocut, Modell 2700

Roche Diagnostics GmbH

Roche LightCycler Instrument, 2011468

LightCycler Software Version 3.5

Schleicher & Schuell, Dassel

Papierfilter, 110 mm Durchmesser, 311643

Science Service (SCI), München

Pap-Pen®

Serva, Heidelberg

Reaktionsgefäße (1,5 ml), 72.690

Reaktionsgefäße (2,0 ml), 72.699.050

Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting

SLG-Qualitäts.Laborhandschuhe (Latex), 46221S

Vilber Lourmat, Torcy, Frankreich

UV-Transilluminator 312 nm

Vogel, Giessen

Tissue-Tec® Eindeckautomat, Modell 4765

Privileg, Quelle, Giessen

Mikrowellengerät, 7020

9.3. Lösungen und Puffer

Immunhistologie

3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochloridlösung (DAB):

100 mg DAB in 200 ml 0,1M Imidazol/HCl Puffer (pH 7,1) lösen und mischen (Magnetrührer), anschließend filtrieren und 70 μ l H₂O₂ (30%ig) zugeben. (Endkonzentration im Imidazolpuffer 0,01%).

0,1M Imidazol/HCl-Puffer, pH 7,1:

6,81 g Imidazol in 1000 ml Aqua dest. lösen und ca. 500 ml 0,1M HCl zufügen bis pH-Wert 7,1 eingestellt ist.

Tris-Puffer-Stammlösung („tris buffered saline“, TBS), pH 7,6:

Stammlösung: 60,57 g Tris (hydroxymethyl)-aminomethan in 610 ml Aqua dest. lösen und ca. 390 ml 1N HCl (Titrisol[®]) zufügen bis pH-Wert 7,6 eingestellt ist.

Gebrauchslösung: 100 ml Stammlösung auf 1000 ml mit 0,8%iger NaCl-Lösung Aqua dest. auffüllen.

Papanicolaou Lösung:

Papanicolaou-Lösung und Aqua dest im Verhältnis 1:20 mischen und filtrieren

Phosphat-gepuffertes Natriumchlorid („phosphate buffered saline“, PBS):

80,0 g NaCl

2,0 g KCl

14,4 g Na₂HPO₄

2,4 g KH₂PO₄

1000 ml Aqua bidest.

Protease-Lösung (0,05%):

Vor jedem Versuchsansatz 5 mg Protease in 10 ml PBS (37°C) frisch auflösen.

RT-PCR

Aqua bidest./ Diethylpyrokarbonat (DEPC)-behandelt:

1 ml DEPC-Reinsubstanz ad 1000ml Aqua bidest.

Schütteln bis gelöst, über Nacht auf einem Magnetrührer unter Abzug stehen lassen, danach autoklavieren.

2% Agarosegel:

1,82 g Agarose in 91ml Puffer durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle lösen, auf ca. 64°C erkalten lassen, 1,8 μ l Ethidiumbromid zufügen in Gießvorrichtung geben und erstarren lassen.

Ethidiumbromidlösung (10mg/ml):

0,2 g Ethidiumbromid (MW 394,3) ad 20 ml Aqua bidest. Gut schütteln, lichtgeschützt bei 4°C lagern.

10x TBE-Elektrophoresepuffer:

108,8 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (MW 121,14)

55,0 g Borsäure (MW 61,83)

40,0 ml 0,5M EDTA- Na_2 (pH8,0)

ad 100 ml Aqua dest, autoklavieren

(zur Herstellung der Gebrauchslösung 100 ml 10x TBE-Puffer und 900 ml Aqua bidest mischen)

9.4. Abkürzungen

ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
Aqua dest.	Aqua destillata
AS	Antisense
bp	Basenpaare
CD	„cluster of differentiation“
cDNA	komplementäre DNA
CDV	„canine distemper virus“
Con A	Concanavalin A
C _t	„threshold cycle“, Schwellenzyklus
DAB	3,3` Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
dATP	Desoxyadenintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrokarbonat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DMV	„dolphin morbillivirus“
DNS	Desoxyribonucleinsäure
dTTP	Desoxythymintriphosphat
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
g x	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyzeraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HE	Hämatoxylin-Eosin
herdf.	herdförmig
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
MALT	„mucosa-associated lymphoid tissue“; Schleimhaut-assoziertes lymphatisches Gewebe
MEME	Eagle`s minimal essential medium mit Earlescher Salzlösung
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNS	„messenger“ RNS
n.d.	nicht durchgeführt

NFκB	Nuklearfaktor kappa B
NK	Natürliche Killerzellen
Nr.	Nummer
o.b.B	ohne besonderen Befund
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase
PBS	„phosphat buffered saline“, Phosphatpuffer
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerase-Kettenreaktion
PDV	„phocines distemper virus“
PMV	„porpoise morbillivirus“
RNS	Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
S	sense
TBE	Tris-Borar-EDTA-Puffer
TBS	„tris buffered saline“, Trispuffer
TGF	„transforming growth factor“, Transformierender-Wachstumsfaktor
Tm	„melting temperatur“, Schmelztemperatur
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ZNS	Zentralnervensystem

9.5 Abbildungen und Tabellen

Anhang 1: Alter, Geschlecht, Herkunft, Fundart, Ernährungsstatus, Gesundheitsstatus, pathologischer und mikrobiologischer Befund sowie Grad der Thymusatrophie und Milzdepletion der Schweinswale

Tier	Alter (in Jahren)	EZ/GS 1 = sehr gut 2 = gut 3 = mäßig 4 = schlecht	Pathologischer Befund		Mikrobiologischer Befund	Grad der lymphozytären Depletion	
			Geschlecht	Herkunft/ Fundart		Thymus	Milz
pp1279	1,0	2/2		mgr. akutes diffuses alveoläres Lungenödem mgr. herdf. lymphoplasmazelluläre Pericholangitis multiple subkutane Blutungen mit Fibrinexsudation	<ul style="list-style-type: none"> • γ-häm. Streptokokken: Leber +++, Milz ++, Niere ++ • Erwinia sp.: Leber +++, Milz, Niere +, • Pseudomonas sp.: Darm ++ • Hefen: Darm, Leber, Niere, Milz + 	I	II
	weiblich						
	Ostsee/ Beifang						
pp1318	1,0	2/3		mgr. granulomatöse Bronchopneumonie mgr. bis hgr. diffuse kleintropfige Leberverfettung multiple subkutane Blutungen	n.d.	I	n.d.
	weiblich						
	Ostsee/ Beifang						
pp1348	0,1	4/n.d.		mgr. akute Stauungshypertämie der Lunge mgr. großtropfige Leberverfettung mit Itozellhyperplasie und herdf. Gallengangshyperplasie herdf. zerebrale Blutungen	n.d.	IV	III
	weiblich						
	Nordsee/ Strandfund						
pp1366	0,9	4/3		mgr. granulomatöse, teils eitrig Bronchopneumonie multiple subkutane Blutungen	<ul style="list-style-type: none"> • Staph. epidermidis: Lunge +++, Darm, Darmlymphknoten ++, Niere +, Leber + • γ-häm. Streptokokken: Leber, Darm, Darmlymphknoten + • α-häm. Streptokokken: Darm, Darmlymphknoten + • Micrococcus sp.: Darm + • Hefen: Lunge + 	IV	III
	weiblich						
	Nordsee/ Strandfund						
pp1423	0,1	4/2		multifokale pulmonale und periaorale Blutungen sowie subkapsuläre Nierenblutungen und perivaskuläre Blutungen im ZNS myokardiale Einzelfasernekrosen mgr. großtropfige Leberverfettung mit Itozellhyperplasie	kein Keimwachstum	I	I
	männlich						
	Ostsee/ Beifang						

Clostr. = Clostridium; E. = Escherichia; EZ = Ernährungsstatus; GS = Gesundheitsstatus; mgr. = geringgradig; häm. = hämolyzierende; hgr.= hochgradig; mgr. = mittelgradig; n.d. = nicht durchgeführt; Staph. = Staphylococcus; V. a. = Verdacht auf; I=keine, II=geringgradige, III=mittelgradige, IV=hochgradige Thymusatrophie bzw. Milzdepletion

Anhang 1: Alter, Geschlecht, Herkunft, Fundart, Ernährungsstatus, Gesundheitsstatus, pathologischer und mikrobiologischer Befund sowie Grad der Thymusatrophie und Milzdepletion der Schweinswale (Fortsetzung)

Tier	Alter (in Jahren)		EZ/GS 1 = sehr gut 2 = gut 3 = mäßig 4 = schlecht	Pathologischer Befund		Mikrobiologischer Befund	Grad der lymphozytären Depletion	
	Geschlecht	Herkunft/ Fundart		Thymus	Milz			
pp1473	0,1	weiblich	2/2	<ul style="list-style-type: none"> V. a. Fruchtwasseraspiration ggr. fokuläre Pankreatitis multiple subkutane Blutungen 	<ul style="list-style-type: none"> α-häm. Streptokokken: Lunge + γ-häm. Streptokokken: Lunge + 	II	II	
pp1481	1,7	weiblich	1/4	<ul style="list-style-type: none"> hgr. akute diffuse fibrinöse Peritonitis hgr. akute diffuse fibrinöse Pleuritis hgr. eitrige, teils abszedierende Myokarditis und chronische fibrinöse-eitrige Epikarditis ggr. granulomatöse, teils eitrige Bronchopneumonie mit Verkalkungen 	<ul style="list-style-type: none"> Staph. aureus: Myokard +++, Leber, Milz, Niere + γ-häm. Streptokokken: Darm +++, Darmlymphknoten ++, Lunge, Niere, Myokard +, Leber +, Milz (+) Serratia liquefaciens: Lunge +++, Niere ++, Milz, Fibrin, Darm, Darmlymphknoten +, Myokard (+) 	III	II	
pp1500	7,0	männlich	2/2	<ul style="list-style-type: none"> ggr. herdf. granulomatöse Bronchopneumonie chron. Magenulzera (1. Komp.) mgr. lymphoplasmazelluläre Pankreatitis mgr. lymphoplasmazelluläre Cholangitis chondroide Metaplasie eines Nucleus pulposus der Wirbelsäule linksseitiges Hyphaema 	kein Keimwachstum	I	I	
pp1501	1,0	weiblich	2/1	<ul style="list-style-type: none"> mgr. akutes diffuses alveoläres Ödem und akute Stauungshyperämie der Lunge mgr. lymphoplasmazelluläre Cholangitis mgr. gemischtropfige Leberverfettung 	<ul style="list-style-type: none"> Pseudomonas sp.: Lunge ++ 	I	I	
pp1502	5,0	männlich	2/3	<ul style="list-style-type: none"> mgr. herdf. granulomatöse, teils eitrige Bronchopneumonie mgr. granulomatöse Pericholangitis multiple zerebrale Ringblutungen linksseitiges Hyphaema 	<ul style="list-style-type: none"> Staph. epidermidis: Niere, Lunge + Braunhamella sp.: Niere, Lunge ++ 	I	II	

Clostr. = Clostridium; E. = Escherichia; EZ = Ernährungsstatus; GS = Gesundheitsstatus; ggr. = geringgradig; häm. = hämolyisierende; hgr. = hochgradig; mgr. = mittelgradig; n.d. = nicht durchgeführt; Staph. = Staphylococcus; V. a. = Verdacht auf; I=keine, II=geringgradige, III=mittelgradige, IV=hochgradige Thymusatrophie bzw. Milzdepletion

Anhang I: Alter, Geschlecht, Herkunft, Fundart, Ernährungsstatus, Gesundheitsstatus, pathologischer und mikrobiologischer Befund sowie Grad der Thymusatrophie und Milzdepletion der Schweinswale (Fortsetzung)

Tier	Alter (in Jahren)		EZ/GS 1 = sehr gut 2 = gut 3 = mäßig 4 = schlecht	Pathologischer Befund		Mikrobiologischer Befund	Grad der lymphozytären Depletion	
	Geschlecht	Herkunft/Fundart		Thymus	Milz			
pp1503	8,0		2/2	<ul style="list-style-type: none"> ggr. herdf. granulomatöse Bronchopneumonie hgr. granulomatöse Pericholangitis und proliferative Cholangitis multiple zerebrale Herdbildungen 	kein Keimwachstum	II	II	
	männlich	Island/Beifang						
	6,0							
pp1504	weiblich		2/3	<ul style="list-style-type: none"> mgr. bis hgr. granulomatöse Bronchopneumonie hgr. granulomatöse, teils nekrotisierende, teils proliferative Cholangitis und Pericholangitis mgr. herdf. granulomatöse, teils nekrotisierende Gastritis (1. Komp.) multiple zerebrale und spinale Ringblutungen 	<ul style="list-style-type: none"> Staph. epidermidis: Leber + 	I	I	
	Island/Beifang							
	5,0							
pp1505	weiblich		2/2	<ul style="list-style-type: none"> ggr. herdf. granulomatöse Bronchopneumonie mit herdförmigen Verkalkungen multiple zerebrale Ringblutungen chron. Magenulkus (1. Komp.) 	<ul style="list-style-type: none"> Micrococcus sp. Niere, Lunge, Darmlymphknoten + 	I	II	
	Island/Beifang							
	2,0							
pp1506	weiblich		2/2	<ul style="list-style-type: none"> ggr. akutes diffuses alveoläres Ödem und akute Stauungshyperämie der Lunge herdf. granulomatöse Oesophagitis ggr. bis mgr. granulomatöse Cholangitis und Pericholangitis 	kein Keimwachstum	II	II	
	Island/Beifang							
	n.d.							
pp1507	weiblich		2/2	<ul style="list-style-type: none"> mgr. akutes diffuses alveoläres Lungenödem hgr. granulomatöse Cholangitis und Pericholangitis mgr. herdf. granulomatöse Pankreatitis chron. lymphohistiozytäre Mastitis mit Fibrose multiple chron. Magenulkura (1. Komp.) 	kein Keimwachstum	II	II	
	Island/Beifang							

Clostr. = Clostridium; E. = Escherichia; EZ = Ernährungsstatus; GS = Gesundheitsstatus; ggr. = geringgradig; hgr. = hochgradig; häm. = hämolyisierende; mgr. = mittelgradig; n.d. = nicht durchgeführt; Staph. = Staphylococcus; V. a. = Verdacht auf; I=keine, II=geringgradige, III=mittelgradige, IV=hochgradige Thymusatrophie bzw. Milzdepletion

Anhang 1: Alter, Geschlecht, Herkunft, Fundart, Ernährungsstatus, Gesundheitsstatus, pathologischer und mikrobiologischer Befund sowie Grad der Thymusatrophie und Milzdepletion der Schweinswale (Fortsetzung)

Tier	Alter (in Jahren)		EZ/GS 1 = sehr gut 2 = gut 3 = mäßig 4 = schlecht	Pathologischer Befund		Mikrobiologischer Befund	Grad der lymphozytären Depletion	
	Geschlecht	Herkunft/ Fundart		Thymus	Milz			
pp1508	1,0		2/3		<ul style="list-style-type: none"> mgr. granulomatöse Bronchopneumonie mit herdförmigen Verkalkungen hgr. granulomatöse Cholangitis und Pericholangitis mgr. gemischttriffige Leberverfärbung beidseitiges Hyphaema multiple chron. Magenzulzera (1. Komp.) 	kein Keimwachstum	I	I
	weiblich							
	Island/ Beifang							
pp1509	4,0		2/3		<ul style="list-style-type: none"> mgr. granulomatöse Bronchopneumonie hgr. granulomatöse Cholangitis und Pericholangitis mgr. gemischttriffige Leberverfärbung mgr. ulzerative, teils granulomatöse Gastritis (1. Komp.) hgr. granulomatöse Pankreatitis beidseitiges perforierendes Hornhautulkus 	<ul style="list-style-type: none"> Micrococcus sp. Auge + Branhamella sp. Auge ++ 	I	II
	weiblich							
	Island/ Beifang							
pp1510	1,0		2/2		<ul style="list-style-type: none"> mgr. akutes diffuses alveoläres Ödem und akute Stauungshyperämie der Lunge hgr. granulomatöse Cholangitis und Pericholangitis mgr. granulomatöse Gastritis (1. Komp.) herdf. granulomatöse Pankreatitis 	<ul style="list-style-type: none"> Micrococcus sp. Niere, Darm + 	I	I
	weiblich							
	Island/ Beifang							
pp1511	n.d.		2/3		<ul style="list-style-type: none"> mgr. granulomatöse, teils nekrotisierende Bronchopneumonie multiple zerebrale und leptomeningeale Blutungen ggr. nichttriffige Pericholangitis herdf. lymphohistiozytäre Pankreatitis mit interstitieller Fibrose 	kein Keimwachstum	I	II
	weiblich							
	Island/ Beifang							
pp1512	3,0		3/3		<ul style="list-style-type: none"> mgr. diffuse eitrige, teils lymphozytäre Bronchopneumonie mgr. kleintropfige Leberverfärbung, mgr. herdf. Gallengangsproliferation und periportale Fibrose mgr. herdf. eosinophile Gastritis (2. Komp.) mgr. akute diffuse katarthaltische Enteritis 	kein Keimwachstum	I	I
	weiblich							
	Norwegen/ Beifang							

Clostr. = Clostridium; E. = Escherichia; EZ = Ernährungsstatus; GS = Gesundheitsstatus; ggr. = geringgradig; häm. = hämolysierende; hgr. = hochgradig; mgr. = mittelgradig; n.d. = nicht durchgeführt; Staph. = Staphylococcus; V. a. = Verdacht auf; !=keine, II=geringgradige, III=mittelgradige, IV=hochgradige Thymusatrophie bzw. Milzdepletion

Anhang 1: Alter, Geschlecht, Herkunft, Fundart, Ernährungszustand, Gesundheitsstatus, pathologischer und mikrobiologischer Befund sowie Grad der Thymusatrophie und Milzdepletion der Schweinswale (Fortsetzung)

Tier	Alter (in Jahren)		EZ/GS 1 = sehr gut 2 = gut 3 = mäßig 4 = schlecht	Pathologischer Befund		Mikrobiologischer Befund		Grad der lymphozytären Depletion	
	Geschlecht	Herkunft/Fundart						Thymus	Milz
pp1514	1,5	männlich	2/2		• ggr. periportale Fibrose und Gallengangfibrose	kein Keimwachstum	(+) einige Einzelkolonien, + geringer Keimgehalt, ++ milderer Keimgehalt, +++ hoher Keimgehalt	II	II
pp1515	1,6	Norwegen/Beifang	2/2	männlich	• ggr. herdf. eitrige Bronchoepneumonie • hgr. herdf. teils eitrige Cholangitis und Pericholangitis • herdf. chronische ulzerative Gastritis (1.Komp.) • multiple subkutane Blutungen	kein Keimwachstum		III	II
pp1516	1,7	weiblich	2/2	Norwegen/Beifang	• mgr. herdf. alveoläres Ödem und Emphysem der Lunge • hgr. herdf. periportale Fibrose der Leber und Gallengangsproliferation • hgr. chronische ulzerative Gastritis (1. Komp.)	kein Keimwachstum		I	II
pp1517	2,9	weiblich	2/2	Norwegen/Beifang	• ggr. herdf. katarthalsche Bronchoepneumonie, alveoläres Lungenödem • mgr. herdf. gemischtzellige Hepatitis mit periportal Fibrose und Gallengangsproliferation • multiple subkutane Blutungen	• Pseudomonas sp.: Darm + • Micrococcus sp.: Darm +		II	III
pp1520	3,5	weiblich	2/2	Norwegen/Beifang	• ggr. eitrige, teils granulomatöse Bronchoepneumonie • hgr. herdf. Cholangitis und Pericholangitis	kein Keimwachstum		III	II
pp1521	1,5	weiblich	2/2	Norwegen/Beifang	• ggr. herdf. Parenchymlutungen, alveoläres Ödem und akute Stauungshyperämie der Lunge • ggr. kleintropige Leberverfettung • mgr. Pericholangitis und herdf. periportale Fibrose • multiple subkutane Blutungen	• Staph. epidermidis Leber, Milz + • Pseudomonas sp.: Milz +, Darmlymphknoten (+) • Micrococcus sp.: Darmlymphknoten (+)		II	I
pp1523	5,0	männlich	2/3	Norwegen/Beifang	• mgr. eitrige Bronchoepneumonie • ggr. Gallengangsproliferation • hgr. herdf. ulzerative Gastritis (1. Komp.) • multiple subkutane Blutungen	kein Keimwachstum		III	n.d.

Clost. = Clostridium; E. = Escherichia; EZ = Ernährungszustand; GS = Gesundheitsstatus; ggr. = geringgradig; hgr. = hochgradig; mgr. = mittelgradig; n.d. = nicht durchgeführt; Staph. = Staphylococcus; V. a. = Verdacht auf; !=keine, II=geringgradige, III=mittelgradige, IV=hochgradige Thymusatrophie bzw. Milzdepletion

Anhang 1: Alter, Geschlecht, Herkunft, Fundart, Ernährungszustand, Gesundheitsstatus, pathologischer und mikrobiologischer Befund sowie Grad der Thymusatrophie und Milzdepletion der Schweinswale (Fortsetzung)

Tier	Alter (in Jahren)	EZ/GS 1 = sehr gut 2 = gut 3 = mäßig 4 = schlecht	Pathologischer Befund		Mikrobiologischer Befund		Grad der lymphozytären Depletion	
			Geschlecht	Herkunft/ Fundart			Thymus	Milz
pp1524	2,0	2/3		<ul style="list-style-type: none"> mgr. herdf. eitrig, teils granulomatöse Bronchopneumonie mgr. herdf. periportale Fibrose, eitrig Cholangitis und Pericholangitis multiple subkutane Blutungen 	<ul style="list-style-type: none"> Staph. epidermidis: Milz, Niere, Lunge +, Darmlymphknoten (+) coliforme Keime: Lunge + γ-häm. Streptokokken: Lunge + Erwinia sp.: Lunge (+) Micrococcus sp.: Lunge (+) Acinetobacter sp.: Darmlymphknoten (+) 	II	II	
			weiblich					
				Norwegen/ Beifang				
pp1525	2,5	2/3		<ul style="list-style-type: none"> mgr. eitrig Bronchopneumonie hgr. herdf. periportale Fibrose, Gallengangsproliferation, Cholangitis und Pericholangitis hgr. chronische ulzerative Gastritis (1. Komp.) ggr. periportale Fibrose des Pankreas 	<ul style="list-style-type: none"> Staph. epidermidis: Milz, Darmlymphknoten ++, Niere, Lunge + 	II	II	
			weiblich					
				Norwegen/ Beifang				
pp1526	2,6	2/4		<ul style="list-style-type: none"> hgr. eitrig, teils granulomatöse Bronchopneumonie hgr. herdf. periportale Cholangitis, Pericholangitis, periportale Fibrose und Gallengangsproliferation hgr. chronische ulzerative Gastritis (1. Komp.) 	<ul style="list-style-type: none"> Staph. epidermidis: Milz + Micrococcus sp.: Milz + γ-häm. Streptokokken: Milz + Branhamella sp.: Milz + Pseudomonas sp.: Milz + 	I	n.d.	
			weiblich					
				Norwegen/ Beifang				
pp1527	2,0	2/2		<ul style="list-style-type: none"> ggr. eitrig, teils granulomatöse Bronchopneumonie herdf. Hyperkeratose der Magenschleimhaut ggr. herdf. nekrotisierende Vaginitis multiple subkutane Blutungen 	<ul style="list-style-type: none"> Staph. epidermidis: Milz +, Leber (+), Pseudomonas sp.: Milz, Lunge + 	IV	II	
			weiblich					
				Norwegen/ Beifang				
pp1528	4,0	3/3		<ul style="list-style-type: none"> mgr. herdf. granulomatöse Pneumonie ggr. kleintropfige Leberverfettung hgr. herdf. periportale Fibrose, teils eitrig Cholangitis und Pericholangitis, ggr. Gallengangsproliferation hgr. herdf. ulzerative, teils eitrig Gastritis (1. Komp.) 	<ul style="list-style-type: none"> Pseudomonas sp.: Uterus, Plazenta ++, Nabel, Milz + Staph. epidermidis: Milz, Plazenta +, Uterus (+) 	III	n.d.	
			weiblich					
				Norwegen/ Beifang				

Clost. = Clostridium; E. = Escherichia; EZ = Ernährungszustand; GS = Gesundheitsstatus; ggr. = geringgradig; mgr. = mittelgradig; n.d. = nicht durchgeführt; Staph. = Staphylococcus; V.a. = Verdacht auf; I=keine, II=geringgradige, III=mittelgradige, IV=hochgradige Thymusatrophie bzw. Milzdepletion

Anhang 1: Alter, Geschlecht, Herkunft, Fundart, Ernährungszustand, Gesundheitsstatus, pathologischer und mikrobiologischer Befund sowie Grad der Thymusatrophie und Milzdepletion der Schweinswale (Fortsetzung)

Tier	Alter (in Jahren)		EZ/GS 1 = sehr gut 2 = gut 3 = mäßig 4 = schlecht	Pathologischer Befund		Mikrobiologischer Befund		Grad der lymphozytären Depletion	
	Geschlecht	Herkunft/ Fundart				(+) einige Einzelkolonien, + geringer Keimgehalt, ++ mittlerer Keimgehalt, +++ hoher Keimgehalt	Thymus	Milz	
pp1529	12		3/3		männlich Norwegen/ Beifang	<ul style="list-style-type: none"> mgr. eitrige Bronchopneumonie ggr. eitrige Cholangitis und Pericholangitis 	<ul style="list-style-type: none"> Pseudomonas sp.: Niere, Lunge, Darm, Darmlymphknoten + Staph. epidermidis: Lunge +, Darmlymphknoten (+) 	III	II
pp1531	2,0	weiblich	3/3		weiblich Norwegen/ Beifang	<ul style="list-style-type: none"> mgr. herdf. eitrige Bronchopneumonie, alveoläres Ödem hgr. chron. ulzerative Gastritis (1. Komp.) multiple subkutane Blutungen 	<ul style="list-style-type: none"> Pseudomonas sp.: Milz, Niere, Lunge, Darm + Staph. epidermidis: Niere, Lunge + γ-häm. Streptokokken Niere, Lunge + Pseudomonas sp.: Lunge (+) 	II	II
pp1532	3,0	weiblich	2/2		weiblich Norwegen	<ul style="list-style-type: none"> ggr. eitrige Bronchopneumonie ggr. herdf. Leberverfettung chron. Magengulcus (1. Komp.) 		II	n.d.
pp1534	3,0	männlich	3/3		männlich Norwegen/ Beifang	<ul style="list-style-type: none"> mgr. herdf. eitrige Bronchopneumonie hgr. Cholangitis und Fibrose hgr. chronische ulzerative Gastritis (1. Komp.) multiple subkutane Blutungen 	<ul style="list-style-type: none"> Staph. epidermidis: Milz, Lunge, Leber, Darm (+) Pseudomonas sp.: Lunge + 	II	II
pp1535	2,5	männlich	2/2		männlich Norwegen/ Beifang	<ul style="list-style-type: none"> ggr. eitrige, teils granulomatöse Bronchopneumonie mgr. chronische ulzerative Gastritis (1. Komp.) subkutanes Hämatom 	kein Keimwachstum	III	n.d.
pp1536	4,0	männlich	2/4		männlich Norwegen/ Beifang	<ul style="list-style-type: none"> hgr. eitrige, teils abszedierende bis nekrotisierende Bronchopneumonie mgr. herdf. periportale Fibrose, Gallengangsproliferation, Cholangitis und Pericholangitis mgr. chron. eitrige Gastritis (1. Komp.) 	<ul style="list-style-type: none"> Staph. epidermidis: Lunge, Niere, Darm +, Darmlymphknoten (+) 	II	n.d.
pp1640	0,2	männlich	2/4		männlich Nordssee/ Beifang	<ul style="list-style-type: none"> hgr. diffuse fibrinös-eitrige Peritonitis ulzerative transmurale Enteritis mgr. akute Stauungshyperämie der Lunge hgr. gemischtropfige Leberverfettung hgr. Verfettung der Nieren tubulosepithelzellen 	<ul style="list-style-type: none"> Clostr. perfringens: Darm ++, Darmveränderung +, Darmpuffer (+) Heifen: Lunge + 	III	IV

Clostr. = Clostridium; E. = Escherichia; EZ = Ernährungszustand; GS = Gesundheitsstatus; ggr. = geringgradig; häm. = hämolyisierende; hgr. = hochgradig; mgr. = mittelgradig; n.d. = nicht durchgeführt; Staph. = Staphylococcus; V. a. = Verdacht auf; |=keine, II=geringgradige, III=mittelgradige, IV=hochgradige Thymusatrophie bzw. Milzdepletion

Anhang 1: Alter, Geschlecht, Herkunft, Fundart, Ernährungszustand, Gesundheitsstatus, pathologischer und mikrobiologischer Befund sowie Grad der Thymusatrophie und Milzdepletion der Schweinswale (Fortsetzung)

Tier	Alter (in Jahren)			EZ/GS	Pathologischer Befund		Mikrobiologischer Befund		Grad der lymphozytären Depletion	
	Geschlecht	Herkunft/ Fundart	Ostsee/ Beifang				Thymus	Milz		
pp1641		0,6		2/3		<ul style="list-style-type: none"> mgr. katarhalisch-eitrige, teils granulomatöse Bronchopneumonie mit multiplen Nekrosen hgr. granulomatöse Cholangitis und Pericholangitis 	<ul style="list-style-type: none"> Arcanobacterium phocae: Milz ++, Niere +, Darmlymphknoten (+) Branhamella sp. Lunge + Pseudomonas sp. + 	IV	III	
		4,0		4/4	<ul style="list-style-type: none"> hgr. granulomatöse, teils katarhalisch-eitrige Bronchopneumonie hgr. herdf. eitrig-nekrotisierende Nephritis herdf. nichteitrig Panenzephalitis hgr. granulomatöse Cholangitis und Pericholangitis hgr. granulomatöse, teils eitrige Gastritis (1. Komp.) 	<ul style="list-style-type: none"> Corynebakterium sp.: Milz ++, Niere + Staph. epidermidis: Niere ++, Milz +, Acinetobacter sp. Niere + E. coli: Niere +, Darmlymphknoten (+) Hefen: Niere +, Lunge (+), Milz (+) 	III	IV		
		7,0		2/3	<ul style="list-style-type: none"> mgr. granulomatöse, teils eitrige Bronchopneumonie, herdförmiger Fibrose und Verkalkungen ulzerative, teils granulomatöse Gastritis (1. Komp.) granulomatöse Cholangitis und Pericholangitis, herdförmige Fibrose und Verkalkung ggr. lymphohistiozytäre Vaginitis mit einzelnen neutrophilen Granulozyten 	kein Keimwachstum	I	II		
pp1659		3,0		2/2	<ul style="list-style-type: none"> ggr. herdförmige granulomatöse, teils katarhalisch-eitrige Bronchopneumonie granulomatöse, teils nekrotisierende Gastritis (2. Komp.) subkutanes Hämatom 	<ul style="list-style-type: none"> coryneforme Bakterien: Leber, Milz, Lunge +, Niere (+) Staph. epidermidis: Leber, Milz + Pseudomonas sp.: Niere + E. coli: Leber (+) 	I	III		

Clstr. = Clostridium; E. = Escherichia; EZ = Ernährungszustand; GS = Gesundheitsstatus; ggr. = geringgradig; hgm. = hämolyisierende; hgr. = hochgradig; mgr. = mittelgradig; n.d. = nicht durchgeführt; Staph. = Staphylococcus; V. a. = Verdacht auf; !=keine, II=geringgradige, III=mittelgradige, IV=hochgradige Thymusatrophie bzw. Milzdepletion

Anhang 1: Alter, Geschlecht, Herkunft, Fundart, Ernährungsstatus, Gesundheitsstatus, pathologischer und mikrobiologischer Befund sowie Grad der Thymusatrophie und Milzdepletion der Schweinswale (Fortsetzung)

Tier	Alter (in Jahren)		EZ/GS	Pathologischer Befund		Mikrobiologischer Befund	Grad der lymphozytären Depletion	
	Geschlecht	Herkunft/ Fundart		Thymus	Milz			
pp1660	1,0		2/3	mgr. granulomatöse Bronchopneumonie		<ul style="list-style-type: none"> coryneforme Bakterien: Leber + 	III	II
	männlich							
	Nordsee/ Beifang							
pp1661	1,0		2/2	<ul style="list-style-type: none"> ggr. herdf. granulomatöse Bronchopneumonie chronisch-eitrige Endometritis ggr. kleintropfige Leberverfettung 	<ul style="list-style-type: none"> γ-häm. Streptokokken: Niere, Lunge ++, Leber, Milz + Corynebakterium sp.: Lunge +++, Leber ++, Milz ++, Darmlymphknoten + 	I	I	
	männlich							
	Ostsee/ Beifang							
pp1662	0,3		2/2	<ul style="list-style-type: none"> ggr. granulomatöse Bronchopneumonie ggr. lymphohistiozytäre Vaginitis mit einzelnen neutrophilen Granulozyten 	<ul style="list-style-type: none"> Micrococcus sp.: Lunge +++, Niere + Acinetobacter sp.: Lunge + γ-häm. Streptokokken: Lunge + 	I	II	
	weiblich							
	Ostsee/ Beifang							
pp 1663	1,5		3/4	<ul style="list-style-type: none"> hgr. granulomatöse, teils eitrig-nekrotisierende Bronchopneumonie mit Verkalkungen chron. Magenulkus (1. Komp.) mgr. gemischtropfige Leberverfettung 	kein Keimwachstum	I	II	
	weiblich							
	Nordsee/ Beifang							
pp1664	0,5		1/1	mgr. akutes diffuses alveoläres Lungenödem		<ul style="list-style-type: none"> Hefen: Leber (+) 	II	I
	weiblich							
	Ostsee/ Beifang							
pp1665	1,0		2/3	<ul style="list-style-type: none"> ggr. bis mgr. herdf. granulomatöse Bronchopneumonie herdf. granulomatöse Pericholangitis 	<ul style="list-style-type: none"> Clostr. perfringens: Darm +++) Hefen: Lunge + 	II	III	
	männlich							
	Nordsee/ Beifang							
pp1666	1,0		2/3	<ul style="list-style-type: none"> mgr. granulomatöse Bronchopneumonie herdf. granulomatöse Pericholangitis und Cholangitis chron. lymphozytäre Urethritis 	kein Keimwachstum	II	II	
	männlich							
	Ostsee/ Beifang							

Clostr. = Clostridium; E. = Escherichia; EZ = Ernährungsstatus; GS = Gesundheitsstatus; ggr. = geringgradig; häm. = hämolyisierende; hgr. = hochgradig; mgr. = mittelgradig; n.d. = nicht durchgeführt; Staph. = Staphylococcus; V. a. = Verdacht auf; I=keine, II=geringgradige, III=mittelgradige, IV=hochgradige Thymusatrophie bzw. Milzdepletion

Anhang 1: Alter, Geschlecht, Herkunft, Fundart, Ernährungsstatus, Gesundheitsstatus, pathologischer und mikrobiologischer Befund sowie Grad der Thymusatrophie und Milzdepletion der Schweinswale (Fortsetzung)

Tier	Alter (in Jahren)		EZ/GS	Pathologischer Befund		Mikrobiologischer Befund		Grad der lymphozytären Depletion		
	Geschlecht	Herkunft/Fundart					Thymus	Milz		
pp1667		0,1	2/1					II	II	
	männlich				• mgr. akutes diffuses alveoläres Lungenödem		• Hefen: Darmlymphknoten (+)			
	Ostsee/ Beifang	3,0	2/3		• ggr. bis mgr. herdf. granulomatöse Bronchopneumonie mit herdförmigen Verkalkungen und Fibrose sowie deutlicher Mediathyperplasie • mgr. granulomatöse Cholangitis und Pericholangitis mit Fibrose und Gallengangshyperplasie • ggr. zerebrale Blutungen • herdf. myokardiale Blutungen • ggr. bis mgr. lymphoplasmazelluläre Vaginitis	• Pseudomonas sp.: Leber + • E. coli: Lunge ++ • Hefen: Lunge +		III	II	
pp1678		0,8	2/2		• ggr. herdf. granulomatöse Bronchopneumonie • ggr. Gallengangshyperplasie		• Branhamella sp.: Lunge ++ • Clost. perfringens: Darm +		II	II
	männlich									
	Ostsee/ Beifang	0,4	4/n.d.		• mgr. akute Stauungshyperämie der Lunge • ggr. lymphohistiozytäre Pericholangitis • Fibrose und Hyperplasie der Ausführungsgänge des Pankreas	kein Keimwachstum		IV	III	
pp1700		0,7	2/2		• ggr. herdförmige granulomatöse Bronchopneumonie mit einzelnen neutrophilen Granulozyten • mgr. gemischtropfige Leberverfettung • ggr. lymphoplasmazelluläre Hepatitis mit zahlreichen eosinophilen Granulozyten, Einzelzellnekrosen, dezente Fibrose		kein Keimwachstum		II	II
	männlich									
	Ostsee/ Beifang									

Clost. = Clostridium; E. = Escherichia; EZ = Ernährungsstatus; ggr. = geringgradig; häm. = hämolysierende; hgr.= hochgradig; mgr. = mittelgradig; n.d. = nicht durchgeführt; Staph. = Staphylococcus; V.a. = Verdacht auf; I=keine, II=geringgradige, III=mittelgradige, IV=hochgradige Thymusatrophie bzw. Milzdepletion

Anhang 1: Alter, Geschlecht, Herkunft, Fundart, Ernährungsstatus, Gesundheitsstatus, pathologischer und mikrobiologischer Befund sowie Grad der Thymusatrophie und Milzdepletion der Schweinswale (Fortsetzung)

Tier	Alter (in Jahren)		EZ/GS	Pathologischer Befund		Mikrobiologischer Befund	Grad der lymphozytären Depletion	
	Geschlecht	Herkunft/ Fundart		Thymus	Milz			
pp1715	0,8		1/3	<ul style="list-style-type: none"> mgr. herdf. granulomatöse Bronchopneumonie mgr. gemischtropfige Leberverfettung herdf. chron. Pankreatitis mit Hyperplasie der Ausführungsgänge 	n.d.		I	III
	weiblich							
	Osisee/ Beifang							
pp1720	0,1		3/2	<ul style="list-style-type: none"> Dysolektase, mittelgradiges akutes alveoläre Lungenödem V. a. einzelne Kryptabszesse im Darm 	n.d.		III	
	weiblich							
	Nordsee/ Strandfund							
HDW1	2,0		4/4	<ul style="list-style-type: none"> hgr. akutes diffuses alveoläres Lungenödem hgr. disseminierte ulzerative Dermatitis Einzelzellnekrosen in Leber 	<ul style="list-style-type: none"> E.coli: Leber, Milz (keine Quantifizierung) 		IV	IV
	weiblich							
	Nordsee/ Strandfund							
HDW7	2,0		4/4	<ul style="list-style-type: none"> hgr. disseminierte oberflächliche vesikuläre und pustuläre, teils nekrotisierende Dermatitis, hgr. multifokale tiefe pyogranulomatöse, teils nekrotisierende Dermatitis mgr. mukopurulente Bronchopneumonie Hypopyon, Keratitis 	<ul style="list-style-type: none"> Pseudomonas sp.: Lunge (keine Quantifizierung) Streptococcus sp.: Haut (keine Quantifizierung) 		IV	II
	männlich							
	Nordsee/ Strandfund							
HDW14	0,1		1/1	<ul style="list-style-type: none"> mgr. herdf. Lungenatektase 	<ul style="list-style-type: none"> β-häm. E.coli: Lunge, Bronchialtupfer +++ 		I	n.d.
	weiblich							
	Nordsee/ Strandfund							
HDW15	2,0		4/4	<ul style="list-style-type: none"> hgr. diffuse fibrinös-eitrige Pleuropneumonie ggr. diffuse fibrinöse Perikarditis multifokale ulzerative Oesophagitis chronisch-ulzerative Gastritis (L. Komp.) 	<ul style="list-style-type: none"> β-häm. E. coli: Pleura, Tracheobronchiallymphknoten ++ Aspergillus sp.: Lunge ++ 		IV	III
	weiblich							
	Nordsee/ Strandfund							

Clostr. = Clostridium; E. = Escherichia; EZ = Ernährungsstatus; ggr. = geringgradig; häm. = hämolyisierende; hgr.= hochgradig; mgr. = mittelgradig; n.d. = nicht durchgeführt; Staph. = Staphylococcus; V. a. = Verdacht auf; |=keine, II=geringgradige, III=mittelgradige, IV=hochgradige Thymusatrophie bzw. Milzdepletion

Anhang 3: PCB-, PBDE- DDE-, DDT- und Toxaphen-Konzentrationen sowie Toxizitätsäquivalente (TEQ) im Fettgewebe der untersuchten Schweinswale

Nr.	Tier Sektionsnr.	PCB (ng/g Lipid)	PBDE (ng/g Lipid)	DDE (ng/g Lipid)	DDT (ng/g Lipid)	Toxaphen (ng/g Lipid)	TEQ (ng/g Lipid)
1	pp1279	7,25E+03	7,80E+01	1,88E+03	3,37E+02	8,00E+02	0,040
2	pp1318	2,84E+03	3,20E+01	5,49E+02	1,22E+02	1,46E+02	0,021
3	pp1348	9,15E+03	3,76E+03	1,25E+03	1,91E+02	1,31E+03	0,060
4	pp1366	1,93E+04	4,92E+03	3,54E+03	7,75E+02	7,42E+03	0,079
5	pp1423	2,72E+03	7,60E+01	7,72E+02	1,03E+02	3,30E+01	0,023
6	pp1481	2,33E+03	3,35E+02	4,25E+02	6,80E+01	2,68E+02	0,026
7	pp1500	2,44E+03	7,90E+01	1,28E+03	2,58E+02	1,25E+03	0,013
8	pp1501	7,82E+02	5,10E+01	4,61E+02	1,36E+02	8,79E+02	0,010
9	pp1502	7,58E+02	9,60E+01	5,17E+02	1,47E+02	1,93E+03	0,008
10	pp1503	5,89E+03	6,30E+01	2,62E+03	5,69E+02	2,39E+03	0,012
11	pp1504	4,37E+02	3,00E+01	1,43E+02	7,30E+01	3,21E+02	0,003
12	pp1505	2,17E+03	5,20E+01	1,33E+03	3,21E+02	5,70E+02	0,013
13	pp1506	4,01E+02	3,00E+01	5,76E+02	1,60E+02	1,36E+03	0,007
14	pp1507	4,75E+02	1,70E+01	2,04E+02	7,60E+01	3,18E+02	0,004
15	pp1508	9,86E+02	5,20E+01	7,15E+02	1,42E+02	9,20E+02	0,012
16	pp1509	1,62E+03	7,70E+01	1,35E+03	3,38E+02	1,57E+03	0,016
17	pp1510	1,27E+03	3,60E+01	6,02E+02	2,01E+02	1,30E+03	0,012
18	pp1511	1,37E+03	3,90E+01	9,56E+02	2,86E+02	1,46E+03	0,011
19	pp1512	4,33E+03	2,81E+02	1,04E+03	4,98E+02	1,05E+03	0,022
20	pp1514	2,07E+03	1,65E+02	9,64E+02	4,08E+02	1,69E+03	0,025
21	pp1515	1,94E+03	n.d.	9,06E+02	3,87E+02	n.d.	0,023
22	pp1516	2,11E+03	1,38E+02	7,27E+02	2,35E+02	1,57E+03	0,021
23	pp1517	4,89E+03	n.d.	1,38E+03	6,26E+02	n.d.	0,034
24	pp1520	3,70E+03	3,04E+02	9,48E+02	3,09E+02	1,63E+03	0,022
25	pp1521	4,93E+03	2,35E+02	3,46E+03	7,02E+03	5,26E+02	0,047
26	pp1523	7,16E+03	5,55E+02	2,38E+03	1,45E+03	2,04E+03	0,025
27	pp1524	2,83E+03	9,80E+01	8,46E+02	2,24E+02	1,59E+03	0,049
28	pp1525	2,94E+03	n.d.	1,14E+03	2,82E+02	1,56E+03	0,030
29	pp1526	4,89E+03	5,58E+02	1,30E+03	7,13E+02	1,36E+03	0,030
30	pp1527	1,62E+03	8,60E+01	5,86E+02	1,32E+02	1,07E+03	0,029
31	pp1528	3,40E+03	3,23E+02	1,33E+03	2,67E+02	2,44E+03	0,029
32	pp1529	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
33	pp1531	2,23E+03	2,20E+02	1,20E+03	3,74E+02	1,61E+03	0,024
34	pp1532	4,43E+03	5,01E+02	1,30E+03	8,52E+02	9,48E+02	0,021
35	pp1533	9,57E+03	1,06E+03	2,63E+03	1,44E+03	1,40E+03	0,030
36	pp1534	1,09E+04	4,08E+02	4,84E+03	1,64E+03	1,22E+03	0,110
37	pp1535	2,54E+03	n.d.	8,81E+02	1,59E+02	n.d.	0,016
38	pp1536	3,08E+03	5,41E+02	1,20E+03	3,08E+02	2,40E+03	0,024
39	pp1640	4,80E+03	5,50E+01	5,65E+02	8,00E+01	6,90E+01	0,037
40	pp1641	1,10E+04	2,17E+02	3,83E+03	9,96E+02	4,71E+02	0,076
41	pp1642	1,42E+04	8,26E+02	1,73E+03	3,68E+02	9,02E+02	0,076
42	pp1658	8,81E+03	1,09E+02	1,78E+03	2,80E+02	2,40E+02	0,050
43	pp1659	5,03E+03	7,59E+02	8,08E+02	1,45E+02	7,10E+02	0,028
44	pp1660	5,87E+03	1,44E+03	7,80E+02	1,61E+02	6,40E+02	0,027
45	pp1661	6,43E+03	n.d.	1,43E+03	3,33E+02	n.d.	0,033
46	pp1662	6,55E+03	n.d.	1,28E+03	1,89E+02	n.d.	0,040
47	pp1663	9,39E+03	3,97E+02	9,83E+02	1,91E+02	5,87E+02	0,055
48	pp1664	4,78E+03	5,60E+01	7,19E+02	1,56E+02	1,94E+02	0,033
49	pp1665	2,91E+03	1,38E+02	6,84E+02	2,70E+02	4,92E+02	0,033
50	pp1666	2,26E+04	1,57E+02	4,44E+03	1,07E+03	9,83E+02	0,055
51	pp1667	1,61E+04	3,82E+02	2,81E+03	9,38E+02	1,72E+03	0,068
52	pp1670	1,87E+03	3,90E+01	3,39E+02	5,20E+01	1,10E+01	0,015
53	pp1678	7,37E+03	1,07E+02	2,10E+03	5,39E+02	4,48E+02	0,038
54	pp1680	1,18E+03	1,04E+02	3,62E+02	7,30E+01	7,47E+02	0,012
55	pp1700	2,78E+03	8,80E+01	6,44E+02	2,09E+02	3,21E+02	n.d.
56	pp1715	2,53E+03	8,90E+01	6,22E+02	8,20E+01	7,10E+01	0,032
57	pp1720	4,35E+03	5,90E+01	4,09E+02	7,90E+01	1,37E+02	0,028
58	HDW1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
59	HDW7	1,01E+04	8,21E+02	1,24E+03	5,45E+02	4,34E+02	0,099
60	HDW14	2,20E+03	n.d.	1,50E+02	7,40E+01	n.d.	n.d.
61	HDW15	2,67E+04	2,53E+03	3,47E+03	1,61E+03	2,51E+03	0,180

n.d. = nicht durchgeführt; TEQ= Toxizitätsäquivalente

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Baumgärtner für die Überlassung des Themas, seine Fachkompetenz und seine freundschaftlichen Ratschläge in allen Labor- und Lebensfragen.

Herrn Prof. Dr. Manfred Reinacher danke ich für die freundliche Aufnahme im Institut für Veterinär-Pathologie sowie Prof. Dr. Knut Frese und Prof. Dr. Eberhardt Burkhardt für ihre kompetente Unterstützung während meiner Fachtierarztausbildung.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinen lieben Kolleginnen und Kollegen am Institut für Veterinär-Pathologie, insbesondere bei meinen beiden treuen Zimmernachbarn Ute und Dirk für eine unvergessliche Zeit.

Frau Annette Artelt und Frau Ute Zeller danke ich für die Einführung in die Techniken der Immunhistologie und sowie für die ausgezeichnete Verrichtung labortechnischer und photographischer Arbeiten.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Forschungs- und Technologiezentrums Westküste, insbesondere Frau Dr. Ursula Siebert, danke ich für die Sektionen der Schweinswale und die nette Kooperation bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Michael McLachlan, Dr. Kristina Thron und Dr. Regina Bruhn (Institut für Ostseeforschung Warnemünde; Universität Rostock) für die toxikologischen Analysen der Schweinswale danken.

Dr. Gundi Müller und Dr. Arndt Vossen danke ich für ihr unermüdliches Engagement im Rahmen der „Walprojektes“ und ihre Freundschaft.

Dr. Niels van Elk („Dolfinarium Harderwijk“) und Dr. Thijs Kuiken („Erasmus Universiteit Rotterdam, Afdeling Virologie“) danke ich für die Blutprobenentnahmen und Obduktionen der niederländischen Schweinswale. Weiterhin möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des „Fjord und Beltcenter“ in Kerteminde für die Blutprobenentnahme der dänischen Schweinswale danken.

Herrn Dr. Klaus Failing und Herrn Horst Heiter von der Arbeitsgruppe Biomathematik des Fachbereiches Veterinärmedizin danke ich für die Unterstützung bei den statistischen Analysen und graphischen Darstellungen der Ergebnisse.

Dr. Barbara Block und Dr. Martina Beineke danke ich für die Durchsicht des Manuskriptes und das Ausmerzen orthographischer und stilistischer Ungereimtheiten.

Abschließend möchte ich meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinem Onkel Alfons sowie meiner Frau Silke für ihre ausdauernde und liebevolle Unterstützung danken.

