

5 ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

Bei der Mucosal Disease (MD) des Rindes geht den schweren Epithelveränderungen beim totalen Zusammenbruch der gastrointestinalen Barriere eine hochgradige Schädigung des Darmschleimhautimmunsystems voraus. Die Lymphfollikel der Peyerschen Platten (PP) sind hochgradig depletiert. Das zytopathogene (zp) BVD-Virus ist immunhistologisch bevorzugt in Assoziation an Zellen mit einer dendritischen Morphologie, die vermutlich den bei anderen Spezies beschriebenen follikulären dendritischen Zellen (FDCs) entsprechen, nachweisbar, während sich die B-Lymphozyten trotz der massiven Schädigung nur selten positiv darstellen. Ziel der vorliegenden Arbeit war die ultrastrukturelle Untersuchung der Lymphfollikel der PP mit Nachweis der FDCs beim Rind, um zum Verständnis der Pathogenese der Lymphfollikeldepletion in den PP bei Rindern mit MD beizutragen.

Es wurden Gewebeproben des Darmes mit PP aus dem Jejunum und dem Ileum von 22 persistierend virämischen Rindern, bei denen durch Inokulation mit zp BVD-Virus experimentell MD erzeugt wurde, untersucht. Elf Rinder wurden in der Frühphase der MD vor dem Auftreten der klinischen Symptome am 5., 7., 9., und 13. Tag nach der Inokulation getötet, elf weitere Rinder gelangten in moribundem Zustand mit klinisch akuter MD zur Sektion. Zum Vergleich wurden Gewebeproben von sieben klinisch gesunden Rindern, die nicht mit zp BVD-Virus inokuliert waren, herangezogen.

Das Stroma des Lymphfollikels in den PP wurde an Gefrierschnitten zunächst lichtmikroskopisch untersucht. Der enzymhistologische Nachweis der 5'-Nucleotidase stellte bei Rindern der Kontrollgruppe ein feinmaschiges Netzwerk von Zellfortsätzen dar, wobei die äußere und innere Zone des Lymphfollikels anhand unterschiedlicher Enzymaktivitäten der FDCs voneinander abgegrenzt werden konnten. Immunhistologisch markierten zwei monoklonale Antikörper (mAK) FDC1 und FDC2 bei den Rindern der Kontrollgruppe zwei unterschiedliche Subpopulationen von FDCs in der äußeren bzw. inneren Zone des Lymphfollikels. Bei Rindern mit MD waren zunächst einzelne, später Gruppen von Lymphfollikeln und schließlich nahezu alle Lymphfollikel der PP von Veränderungen betroffen. Der Nachweis der

5'Nukleotidase stellte das Netzwerk der Stromazellen grobmaschig und aufgelockert dar, wodurch die Abgrenzung der verschiedenen Zonen des Lymphfollikels nicht möglich war. Der mAκ FDC1 stellte immunhistologisch mehr Zellfortsätze von FDCs dar, die zunächst in der äußeren Zone lokalisiert waren und im späten Krankheitsstadium diffus den Lymphfollikel durchsetzten. Mit dem mAκ FDC2 dagegen konnten bei Rindern mit MD weniger FDCs in der inneren Zone nachgewiesen werden.

Die ultrastrukturellen Untersuchungen wurden an glutaraldehydfixierten, in Epon eingebetteten Gewebeproben der PP durchgeführt. Die ultrastrukturellen Befunde der Lymphfollikel der PP bei den Rindern der Kontrollgruppe entsprachen weitgehend den Literaturangaben über die Morphologie von lymphatischen Geweben. Bei Rindern mit MD korrelierte das Ausmaß der Schädigung mit dem immunhistologischen Nachweis des zp BVD-Virus. In der frühen Phase der MD wurde unter dem Einfluß der Virusinfektion ein hochgradiger apoptotischer Zelltod der B-Lymphozyten vorwiegend in den zentralen Bereichen des Lymphfollikels induziert. Vermutlich sekundär trat eine Schädigung der FDCs ein. In der späten Phase der MD konnten in der überwiegenden Zahl der hochgradig verkleinerten Lymphfollikel dicht gelagerte FDCs, Makrophagen sowie vereinzelte B-Lymphozyten nachgewiesen werden. Das Netzwerk der FDCs in diesen Lymphfollikeln kann sich aus einer unreifen, subkapsulär lokalisierten, von der Schädigung nicht betroffenen Subpopulation von FDCs durch Hypertrophie entwickelt haben. Andere Lymphfollikel enthielten ausschließlich Makrophagen. Das Fehlen des Stromagerüsts hatte die Bildung eines zentralen Hohlraumes zur Folge, in den die Darmschleimhaut verfallen und sich zystisch erweitern konnte.

Trotz des immunhistologischen Nachweises des zp BVD-Virus in den Lymphfollikeln der PP waren ultrastrukturell keine BVD-Viruspartikel nachweisbar. Weiterführende Untersuchungen sollten gezielt der Lokalisierung des BVD-Virus im Lymphfollikel dienen, um darzustellen, ob der lymphozytären Depletion eine produktive Infektion der B-Lymphozyten oder eine indirekte Wirkung des BVD-Virus über lösliche Faktoren zugrunde liegt und weiterhin ob die FDCs durch die Bindung des nativen Virus auf der Zelloberfläche als Erregerreservoir fungieren.

SUMMARY**Ulrike Teichmann (1997)****Changes of lymphoid follicles of Peyer's patches in cattle with experimental mucosal disease**

In mucosal disease (MD) of cattle, severe lesions of the gut-associated lymphoid tissues are followed by alterations of the intestinal mucosa finally resulting in a breakdown of the gastrointestinal barrier. Within the highly depleted lymphoid follicles of Peyer's patches (PP), cytopathic (cp) BVD-virus can be demonstrated by immunohistology predominantly in association to cells with dendritic morphology rather than in B-lymphocytes. The cells with dendritic morphology may correspond to the follicular dendritic cells (FDCs), which are well investigated in species other than cattle. The objective of this study is the ultrastructural investigation of the lymphoid follicles of PP to contribute to the understanding of the pathogenesis of the depletion of lymphoid follicles in cattle with MD.

Tissues from jejunal and ileal PP of 22 persistently viremic cattle, in which MD was experimentally induced by inoculation with cp BVD-virus, were investigated. Eleven cattle were necropsied in the early phase of MD before the onset of clinical signs of MD at days 5, 7, 9 and 13 post inoculation. Eleven cattle were euthanized when they had developed acute MD and were moribund. For comparison, tissues from seven clinically healthy cattle, which were not inoculated with cp BVD-virus, were investigated.

Stromal cells within lymphoid follicles of PP were investigated in cryostat sections. Enzyme histochemistry of 5'nucleotidase revealed a fine mesh of stromal cell processes within lymphoid follicles of cattle of the control group. Differences in staining intensity separated the outer and the inner zone of the lymphoid follicles. Two monoclonal antibodies (mabs), FDC1 and FDC2, were used for immunohistological detection of two different subpopulations of FDCs in the outer and the inner zone of the lymphoid follicles of PP within lymphoid follicles of cattle of the control group. Alterations were first found in single lymphoid follicles, then in an increasing number and finally in all lymphoid

follicles. With mab FDC1, an increased labeling of cell processes of FDCs was found first in the outer zone and later extending into the inner zone of the lymphoid follicles. In contrast, a decreased labeling of cell processes of FDCs with mab FDC2 in the inner zone of the lymphoid follicles was obvious.

For ultrastructural investigation, tissues were fixed in glutaraldehyde and embedded in epon. The morphology of the lymphoid follicles of PP of the cattle from the control group corresponded to the data of lymphoid tissues given in the literature. In cattle with MD, the degree of the alterations of lymphoid follicles correlated with distribution of cp BVD-virus demonstrated by immunohistology. In the early phase of MD, the infection with cp BVD-virus resulted in extensive apoptotic death of B-lymphocytes within lymphoid follicles. This is followed by secondary alteration of the FDCs in the central part of the lymphoid follicles. In the advanced phase of MD, densely packed FDCs, macrophages and single B-lymphocytes were found in most of the shrunken lymphoid follicles. The network of FDCs may have been developed from immature FDCs in the subcapsular areas by hypertrophy. However, other lymphoid follicles contained macrophages only. The complete loss of the stromal cells in these lymphoid follicles resulted in the formation of central cavities which are in some cases lined by a layer of invaginating intestinal epithelium.

Despite the immunohistological demonstration of cp BVD-virus within the lymphoid follicles of PP, no virus particles were found in the ultrastructural investigation. Further investigations should focus on the localization of the cp BVD-virus to clarify whether the depletion of the B-lymphocytes in the lymphoid follicles of PP is due to either productive infection of the lymphocytes with BVD-virus or to soluble factors and furthermore, whether FDCs are the reservoir of BVD-virus by retaining native viral particles on their cell surface.