

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwigs-Maximilians-Universität München
und
dem Departement für Veterinärwissenschaften der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. R. Wanke

**Qualitative und quantitativ-morphologische Analyse von
Organveränderungen nach experimenteller *Psoroptes ovis*-Infektion des
Rindes und akarizider Behandlung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Pierre Björn Börjes
aus Nordhorn

München 2011

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Wanke

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Pfister

Tag der Promotion: 12. Februar 2011

Für Mareike und meine Familie

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung.....	1
II.	Literaturübersicht	2
1.	<i>Psoroptes ovis</i>	2
1.1.	Einleitung	2
1.2.	Geschichte	2
1.3.	Taxonomie	3
1.4.	Morphologie von <i>Psoroptes ovis</i>	4
1.5.	Entwicklungszyklus von <i>Psoroptes ovis</i>	6
2.	Epidemiologie.....	8
2.1.	Übertragung	8
2.2.	Prädisposition	9
2.3.	Prävalenz	9
2.4.	Schäden im Wirt.....	10
3.	Entzündungsreaktion und Immunantwort	11
4.	Pathogenese.....	11
5.	Diagnose und Differentialdiagnosen.....	13
6.	Therapie	14
7.	Prognose	16
8.	Ökonomische Schäden durch <i>Psoroptes ovis</i>-Infektionen.....	16
9.	Untersuchte Organe.....	17
9.1.	Haut	17
9.2.	Lymphknoten	19
9.3.	Nebennieren	20
9.3.1.	Morphologie	20
9.3.2.	Physiologie der Nebenniere	22
9.3.2.1.	Nebennierenrindenhormone	22
9.3.2.2.	Nebennierenmarkhormone	24
9.3.3.	Wachstumsprozesse der Nebenniere	24
10.	Stress.....	26

III.	Material und Methoden	28
1.	Versuchsaufbau	28
1.1.	Tiere	29
1.2.	Experimentelle <i>Psoroptes ovis</i> Infektion	30
1.3.	Einteilung der Tiere in die behandelte und unbehandelte Gruppe	30
1.4.	Behandlung bzw. Scheinbehandlung	30
1.5.	Bestimmung der Milbenzahlen	31
1.6.	Schlachtung und Bestimmung der Buglymphknoten- und Nebennierengewichte	31
1.7.	Bestimmung der Serumkortisolkonzentration	32
1.8.	Übersicht zu Probenumfang, Probenprozessierung und untersuchten Parametern	32
2.	Probennahme	35
2.1.	Haut	35
2.2.	Buglymphknoten	35
2.2.1.	Bestimmung der Volumina der Lymphknoten	36
2.3.	Nebennieren	37
3.	Prozessierung der Gewebeproben für histologische, morphometrische und quantitativ-stereologische Analysen ...	37
3.1.	Fixation	37
3.2.	Prozessierung der Nebennieren	37
3.2.1.	Entnahme von Stanzproben der Nebennierenrinde für quantitativ-stereologische Analysen	37
3.3.	Paraffineinbettung und Schnittherstellung	39
3.3.1.	Paraffinextraktion und Rehydrierung	40
3.3.2.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) der Paraffinschnitte	40
3.4.	Kunststoffeinbettung und Schnittherstellung	41
3.4.1.	Hämatoxylin-Eosin-Phloxin Färbung der Kunststoffschnitte	43
3.4.2.	Giemsa-Färbung der Kunststoffschnitte	44
3.5.	Eponeinbettung der Nebennierenrindenstanzproben	44
3.5.1.	Herstellung von seriellen Semidünnschnitten	45
3.5.2.	Toluidinblau-Safraninfärbung der Semidünnschnitte	46

4.	Morphometrische und quantitativ-stereologische Analysen ...	48
4.1.	Haut	48
4.1.1.	Bestimmung der Dicke der Haut und ihrer Schichten.....	48
4.1.2.	Bestimmung der Volumendichten der Hautschichten in der Haut ..	50
4.1.3.	Bestimmung der numerischen Flächendichte eosinophiler Granulozyten und Mastzellen in den einzelnen Hautschichten	51
4.2.	Lymphknoten	55
4.2.1.	Bestimmung der Volumendichten von Keimzentren, sonstigen lymphatischen und nichtlymphatischen Geweben im Lymphknoten.....	55
4.2.2.	Bestimmung der Volumina der Keimzentren sowie sonstiger lymphatischer und nichtlymphatischer Lymphknotenkompartimente	56
4.3.	Nebenniere	57
4.3.1.	Bestimmung der Volumendichten der Nebennierenrindenzonen und des Nebennierenmarkes	57
4.3.2.	Bestimmung der Volumina der Nebennierenzonen und des Nebennierenmarkes in der Nebenniere	58
4.3.3.	Bestimmung des mittleren Zellvolumens und der Anzahl der Zona fasciculata-Zellen in der Nebennierenrinde.....	59
4.3.4.	Prinzip des physikalischen Disektors	59
4.3.5.	Bestimmung der orthogonalen Linearprojektion der Zona fasciculata-Zellkerne	60
4.3.6.	Bestimmung der numerischen Volumendichte der	
	Zona fasciculata-Zellen der Nebennierenrinde	61
4.3.7.	Bestimmung des mittleren Zellvolumens der Zona fasciculata-Zellen.....	66
4.3.8.	Bestimmung der Anzahl der Zona fasciculata-Zellen in der Nebennierenrinde.....	68
4.3.9.	Überprüfung der nominellen Schnittdicke der Semidünnschnitte...	69
5.	Statistische Berechnungen	70

IV.	Ergebnisse.....	71
1.	Milbenzahlen	71
2.	Körpergewichtsentwicklung zwischen Tag 0 und 56.....	72
3.	Physikalische Messgrößen	73
3.1.	Gewichte, spezifisches Gewicht und Volumina der Buglymphknoten	73
3.2.	Gewichte, spezifisches Gewicht und Volumina der Nebennieren ..	74
4.	Histologische Befunde	76
4.1.	Haut	76
4.1.1.	Tarsusbereich (nicht infizierte Lokalisation)	76
4.1.2.	Widerrist (infizierte Lokalisation)	76
4.2.	Lymphknoten	80
4.3.	Nebenniere	81
5.	Quantitativ-morphologische Befunde	82
5.1.	Haut	82
5.1.1.	Tarsusbereich (nicht infizierte Lokalisation)	82
5.1.1.1.	Dicke der Haut und ihrer Schichten.....	82
5.1.1.2.	Volumendichten der einzelnen Hautschichten in der Haut.....	83
5.1.1.3.	Numerische Flächendichte eosinophiler Granulozyten und Mastzellen in den einzelnen Hautschichten	84
5.1.2.	Widerrist (infizierte Lokalisation)	86
5.1.2.1.	Dicke der Haut und ihrer Schichten.....	86
5.1.2.2.	Volumendichten der einzelnen Hautschichten in der Haut.....	87
5.1.2.3.	Numerische Flächendichte eosinophiler Granulozyten und Mastzellen in den einzelnen Hautschichten	88
5.2.	Buglymphknoten	91
5.2.1.	Volumendichten der Lymphknotenkompartimente im Buglymphknoten	91
5.2.2.	Volumina der Lymphknotenkompartimente.....	92
5.3.	Nebenniere	93
5.3.1.	Volumendichten der Nebennierenkompartimente in der rechten Nebenniere	93

5.3.2.	Gesamtvolumina der Nebennierenkompartimente in beiden Nebennieren	95
5.3.3.	Numerische Volumendichte der Zona fasciculata-Zellen in der Zona fasciculata der rechten Nebennierenrinde	95
5.3.4.	Mittleres Volumen der Zona-fasciculata-Zellen der rechten Nebenniere	96
5.3.5.	Absolute Anzahl der Zona-fasciculata-Zellen in beiden Nebennieren.....	97
6.	Kortisolkonzentration im Serum.....	98
V.	Diskussion.....	99
1.	Allgemeine Aspekte.....	99
2.	Diskussion der Ergebnisse.....	100
2.1.	Experimentelles Design	100
2.2.	Methodische Aspekte.....	101
2.2.1.	Haut	101
2.2.2.	Lymphknoten	103
2.2.3.	Nebennieren	103
2.3.	Diskussion der Ergebnisse.....	105
2.3.1.	Milbenzahlen.....	105
2.4.	Körpergewichtsentwicklung.....	107
2.5.	Haut	109
2.6.	Buglymphknoten	112
2.7.	Nebennieren	114
3.	Schlussfolgerung und Ausblick.....	118
VI.	Zusammenfassung.....	119
VII.	Summary.....	122
VIII.	Literaturverzeichnis.....	124

IX.	Anhang.....	156
1.	Verwendete Materialien	156
1.1.	Paraffin-Histologie.....	156
1.1.1.	1%ige Eosin-Lösung	156
1.2.	GMA/MMA-Histologie.....	156
1.2.1.	Spüllösung	156
1.2.2.	0,1 M Cacodylatpuffer	156
1.2.3.	Lösung A.....	157
1.2.4.	1%iges HCl-Ethanol.....	157
1.2.5.	Eosin-Phloxin-Gebrauchslösung.....	157
1.2.5.1.	Stammlösung Eosin	158
1.2.5.2.	Stammlösung Phloxin	158
1.2.5.3.	96%ige Essigsäure	158
1.2.6.	7%ige Giemsa-Gebrauchslösung.....	158
1.2.6.1.	Phosphat-Puffer	158
1.2.7.	0,5%ige Essigsäure	159
1.3.	Epon-Histologie.....	159
1.3.1.	Glutaraldehyd 6,25%ig.....	159
1.3.2.	Sörensen Phosphat-Puffer 0,067 M, pH 4,7	159
1.3.2.1.	Lösung I	159
1.3.2.2.	Lösung II	159
1.3.3.	Osmiumtetroxid 1%ig.....	160
1.3.3.1.	Veronal-Acetat-Puffer, pH 10,3.....	160
1.3.4.	Epon-Einbettlösung.....	160
1.3.4.1.	Lösung A.....	160
1.3.4.2.	Lösung B.....	160
1.3.5.	Uranylacetat 2%ig.....	161
1.3.6.	Bleicitrat-Kontrastierung.....	161
1.3.6.1.	Natriumcitrat.....	161
1.3.6.2.	Bleinitrat	161
1.3.6.3.	NaOH	161
X.	Lebenslauf	162
XI.	Danksagung	163

Abkürzungsverzeichnis

eos. Gran.	eosinophile Granulozyten
GMA/MMA	Glycolmethacrylat/Methylmethacrylat
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
Mastz.	Mastzellen
mcal	Millikalorie
ME	Metabolisierbare Energie
NN	Nebenniere
NNM	Nebennierenmark
NNR	Nebennierenrinde
<i>P.</i>	<i>Psoroptes</i>
SD	Standardabweichung
spp.	species pluralis
Str.	Stratum
Z. glom.	Zona glomerulosa
Z. fasc.	Zona fasciculata

I. Einleitung

Als Räude werden bei Tieren Erkrankungen der Haut bezeichnet, die durch verschiedene parasitisch lebende Milben hervorgerufen werden. Eine Form der Räude, ausgelöst durch *Psoroptes ovis*, ist eine hochkontagiöse Parasitose zahlreicher Säugetiere, die mit schweren exsudativen Dermatitiden und/oder Otitiden einhergehen kann.

Von besonderer Bedeutung ist der Befall mit *P. ovis* bei Rindern und Schafen. Hier führt die Infektion neben den Hautveränderungen, die mit Schäden an Wolle und Leder einhergehen, zu empfindlichen Einbußen in der Mastleistung. Somit besteht ein großes Interesse an effizienten Behandlungsstrategien.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Gewebeproben untersucht, die in zwei Studien zur Prüfung der Wirksamkeit eines Akarizids gegenüber einer experimentellen *Psoroptes*-Infektion bei Rindern in Zusammenarbeit mit dem Kathrinenhof Research Center der Firma Merial und dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie gewonnen wurden.

Ziel dieser Arbeit war einerseits, die Auswirkungen einer experimentellen *P. ovis*-Infektion auf Haut, regionäre Lymphknoten und Nebennieren zu beurteilen, zum anderen sollte der Effekt der Behandlung mit einem Akarizid aus der Gruppe der makrozyklischen Lactone auf milbeninduzierte Alterationen dieser Organe evaluiert werden. Dabei sollten neben der üblichen deskriptiven histopathologischen Untersuchung quantitativ-morphologische Untersuchungen zur Objektivierung der Befunde durchgeführt werden.

Zu diesem Zweck wurden Proben der Haut, der Buglymphknoten und der Nebennieren experimentell infizierter behandelter und unbehandelter Rinder sowie nichtinfizierter Rinder (Kontrolle) nach Schlachtung entnommen und morphometrischen sowie quantitativ-stereologischen Analysen unterzogen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellen die Grundlage für weiterführende, der Pathologie und Pathophysiologie von *P. ovis* - Infektionen gewidmeten Untersuchungen dar.

II. Literaturübersicht

1. *Psoroptes ovis*

1.1. Einleitung

Die *Psoroptes*-Milbe ist ein weltweit vorkommender, obligater Ektoparasit verschiedener Säugetiere (unter anderem Equiden, Cameliden, heimische und exotische domestizierte und wildlebende Wiederkäuer sowie Lagomorpha). Die Infektion mit dieser hoch kontagiösen Milbe kann beim Wirt zu schweren Dermatitiden führen. Bei Befall von Nutztieren mit *Psoroptes*-Milben drohen gravierendere wirtschaftliche Verluste (Rehbein et al., 2000a, 2002).

1.2. Geschichte

Bereits seit der Antike sind als Räude bezeichnete Hautveränderungen bei Tieren und Menschen bekannt und von zeitgenössischen Schriftstellern beschrieben worden (Kirkwood, 1986). Mit der Erfindung des Mikroskopes begann die Erforschung von Morphologie und Vermehrung der mittlerweile als Auslöser für die Erkrankung identifizierten Milben. Im 18. und 19. Jahrhundert wurden verschiedene Grundlagenwerke, die der Anatomie, Physiologie und Behandlung verschiedener Milben gewidmet waren, veröffentlicht (Roncalli, 1987). Diese Werke stellen die Basis für die bis heute unternommenen Schritte dar, die Natur einer bedeutenden Hauterkrankung zahlreicher Säugetiere zu verstehen und ihre Diagnostik und Therapie zu optimieren.

1.3. Taxonomie

Psoroptes ovis wird auf Grundlage morphologischer, molekularbiologischer und phylogenetischer Studien (Zahler et al., 1998; Ramey et al., 2000; Pegler et al., 2005) nach der aktuell gültigen Taxonomie (Uniprot, 2010) innerhalb der Gattung der *Psoroptes*-Milben als valide Spezies eingeordnet (Abbildung 1).

Stamm (Phylum)	Arthropoda
Unterstamm	Chelicerata
Klasse	Arachnida
Unterklasse	Acari
Überordnung	Acariformes
	Sarcoptiformes
Ordnung	Astigmata
	Psoroptidia
Überfamilie	Sarcoptoidea
Familie	Psoroptidae
Gattung	Psoroptes
Art	Psoroptes ovis

Abbildung 1: Dendrographische Darstellung der aktuellen Taxonomie von *Psoroptes ovis* (Uniprot, 2010).

1.4. Morphologie von *Psoroptes ovis*

Der in Abbildung 2 schematisch dargestellte Körper von *Psoroptes ovis* gliedert sich grob in Kopf (Gnathosoma) und Rumpf (Idiosoma).

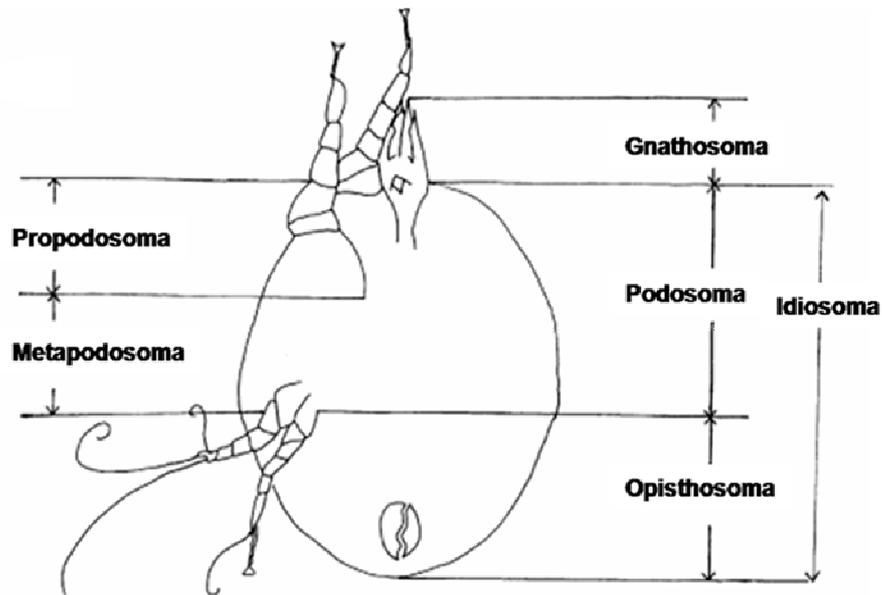


Abbildung 2: Schematische Seitenansicht einer *Psoroptes*-Milbe, Graphik entnommen aus „Life-cycle stage morphology of *Psoroptes* mange mites“ (Sanders et al., 2000).

Das längliche und spitz zulaufende Gnathosoma (Abbildung 3) besteht aus einem funktionell an die Art der Nahrungsaufnahme angepassten Komplex aus Mundwerkzeugen und Adnexen (Mapstone et al., 2002).

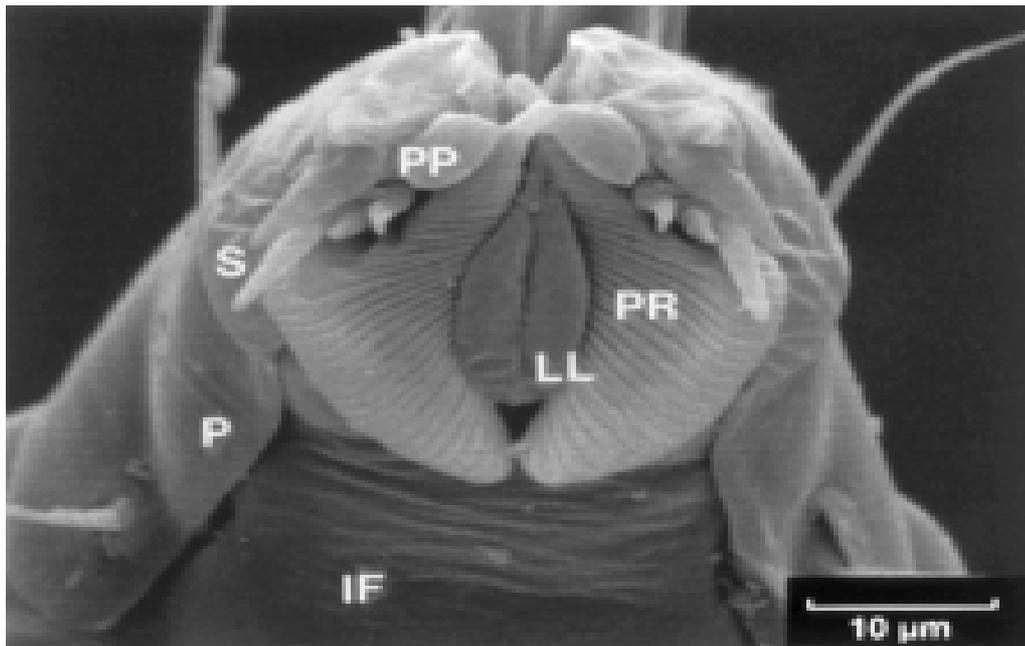


Abbildung 3: Rasterelektronenmikroskopische ventrale Detailansicht des distalen Gnathosomas einer adulten weiblichen *Psoroptes ovis*-Milbe: IF: Infracapitulum (Hypostom); LL: laterale Lippen; P: Palpen; PR: Pseudorutellae; PP: Palpenfortsatz; S: Sensillae; dorsal gelegene, von den Palpen flankierte Chelizeren hier nicht einsehbar. Grafik entnommen aus "Structure and function of the gnathosoma of the mange mite, *Psoroptes ovis*" (Mapstone et al., 2002).

Das Idiosoma, unterteilt in das Beine tragende Podosoma und das kaudal gelegene Opisthosoma, wird dorsal und ventral von schildartig sklerosierter Cuticula bedeckt. Auf dieser Cuticula und den Beinen finden sich, in Abhängigkeit von Geschlecht und Entwicklungsstadium, eine unterschiedliche Anzahl von Borsten, die sogenannten Setae (Sanders et al., 2000). Die Beinpaare der Nymphen und Adulti (octapod) sowie der hexapoden Larven bestehen aus sechs Beingliedern. Von proximal nach distal unterscheidet man Coxa, Trochanter, Genu, Femur, Tibia und Tarsus. Zum Halt auf Oberflächen ist der im Gegensatz zu anderen Räudemilben lange und gegliederte Prätarsus mit einem kleinen, trompetenförmigen Haftorgan (Pulvillus) ausgestattet (Abbildung 4).

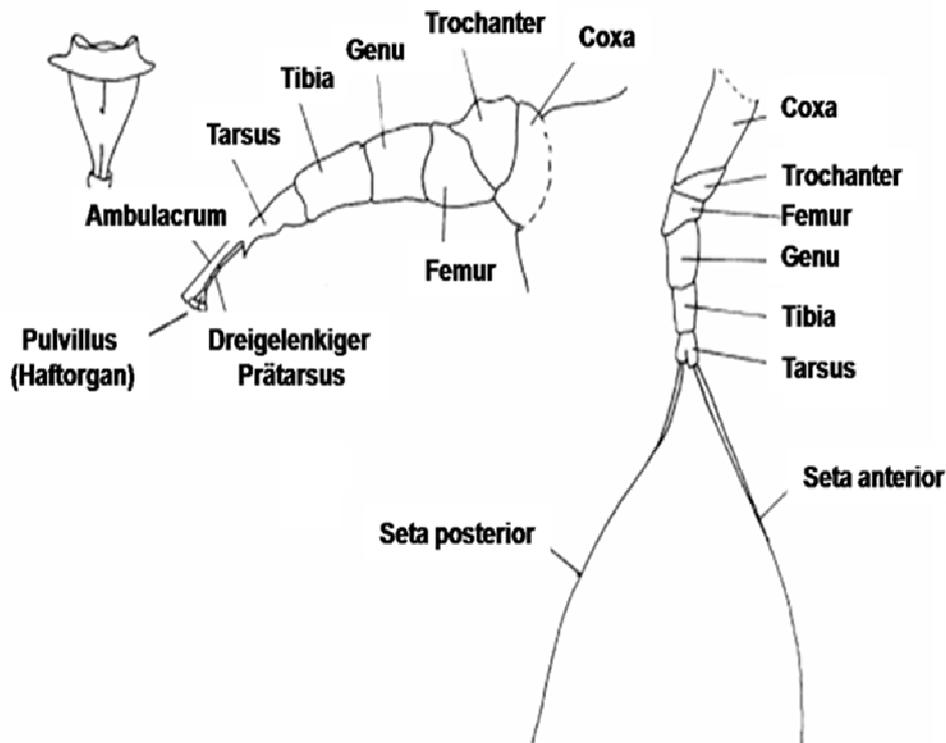


Abbildung 4: Schematische Darstellung morphologischer Merkmale der Beine I (links) und III (rechts). Grafik entnommen aus "Life-cycle stage morphology of *Psoroptes manges mites*" (Sanders et al., 2000).

1.5. Entwicklungszyklus von *Psoroptes ovis*

Der vollständig auf dem Wirtstier ablaufende Entwicklungszyklus dauert, von Ei zu Ei, mindestens 11, bei Rindern bis zu 17 Tage (Clymer et al., 1997) und wird durch extrinsische Faktoren wie Temperatur und relative Feuchtigkeit (Sweatman, 1958) sowie den immunologischen Status des Wirtes beeinflusst (Guillot und Stromberg, 1987).

Die in Abbildung 5 dargestellte Entwicklung zur adulten Milbe erfolgt, nach Schlupf der durchschnittlich 250 µm großen Larve aus dem Ei, über zwei Nymphenstadien, der sogenannten Proto- und Tritonymphe.

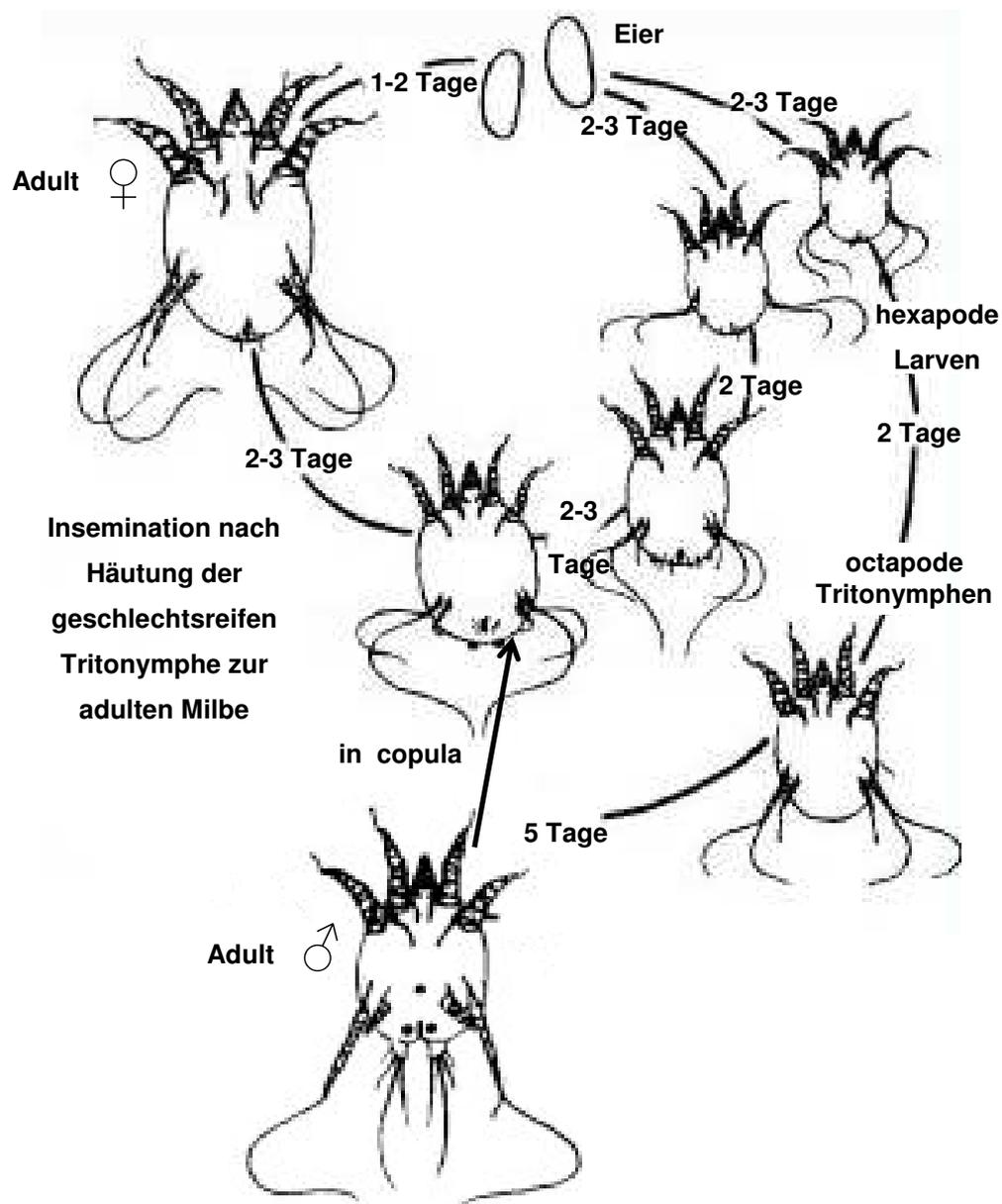


Abbildung 5: Entwicklungszyklus von *P. ovis*. Grafik entnommen aus "History, Biology and Control of Sheep Scab" (Kirkwood, 1986).

Die entsprechenden männlichen und weiblichen Nymphenstadien sind annähernd gleich groß (Protonympe ca. 300 µm, Tritonympe ca. 400 µm), hingegen weisen die adulten Männchen eine durchschnittliche Größe von ca. 400 µm gegenüber den adulten Weibchen mit durchschnittlich ca. 500 µm auf (Sanders et al., 2000). Während Ei und Larve keinen sexuellen Dimorphismus zeigen, lassen sich männliche und weibliche Nymphenstadien und Adulti anhand diverser morphologischer Charakteristika (siehe 1.4.) sicher voneinander unterscheiden (Sanders et al., 2000). Männliche Adulti umklammern die weiblichen Tritonnympfen und verbleiben mit diesen in copula. Nach der Häutung der Tritonnympfen zu Adulti erfolgt die Insemination (Guillot und Wright, 1983). Weibliche Milben legen, bei einer Lebensdauer von 40 bis 60 Tagen, 40 bis 100 Eier.

2. Epidemiologie

2.1. Übertragung

Die Übertragung der Milben zwischen den Wirten erfolgt über Körperkontakt (Guillot und Cole, 1984; Berriatua et al., 1999) und möglicherweise über die kontaminierte Umwelt (Guillot und Cole, 1984; Berriatua et al., 2001; Minihan et al., 2002). Über eine Übertragung zwischen unterschiedlichen Spezies liegen konträre Berichte vor. Mehrere experimentelle Übertragungsversuche zwischen unterschiedlichen Spezies scheiterten, während in anderen Versuchen die Übertragung der Milben gelang (Kirkwood, 1985). Ebenso sind auch natürlich vorkommende Übertragungen von *Psoroptes ovis* zwischen verschiedenen Wirtstierspezies gleichen Genus beschrieben worden (Foreyt, 1997).

Bezüglich der Zeitspanne zwischen einer Infektion mit *Psoroptes ovis* und dem Auftreten erster makroskopisch erfassbarer Läsionen liegen nur wenige Informationen vor. Nach experimenteller Infektion von Schafen wurden die ersten Läsionen nach einer bis zehn Wochen beobachtet (Stockman, 1910; Berriatua et al., 1999; Van Den Broek et al., 2000).

2.2. Prädisposition

Faktoren, die eine Infektion bei unterschiedlichen Spezies begünstigen, werden in der Literatur kontrovers diskutiert.

Große Herdengrößen (Lusat et al., 2009; El-Khodery et al., 2010), Massentiertransporte (Kirkwood, 1986; Colebrook und Wall, 2004), Importe aus bestimmten Regionen (Lusat et al., 2009), gemeinsames Weiden (O' Brien, 1992; French et al., 1999) und Einstellen unterschiedlicher Spezies (El-Khodery et al., 2010) werden allgemein als valide Risikofaktoren gewertet. Ebenfalls gesichert ist eine jahreszeitlich unabhängige pathogene Wirkung der Milbe (Guillot, 1981; Kirkwood, 1985), obwohl Faktoren wie Wetter beziehungsweise Jahreszeit (Guillot und Cole, 1984; Kirkwood, 1986; Samuel et al., 1991; French et al., 1999) und damit verbundene Stressoren wie Nahrungsmangel oder Brunft (Samuel et al., 1991) ein Einfluss auf die Wirtstierempfindlichkeit für *Psoroptes ovis* Infektionen zugemessen wird. Die Relevanz von wirt-assoziierten Faktoren wie Alter und Geschlecht, Rasse und Beschaffenheit des Haarkleides ist nicht vollständig geklärt (Losson et al., 1999; Fourie et al., 2002; Meintjes et al., 2002; Tasawar et al., 2007; El-Khodery et al., 2010).

2.3. Prävalenz

Aufgrund der in der Vergangenheit eingeschränkten diagnostischen Möglichkeiten sind nur vereinzelt Daten über regionale *Psoroptes ovis*-Prävalenzen verfügbar (Falconi et al., 2002).

Umfangreichere Untersuchungsergebnisse liegen lediglich für die Schweiz, Großbritannien und Nordirland vor (Pfister, 1978; Bates, 1996a, 1996b; Corke und Broom, 2000; Falconi et al., 2002; Bisdorff et al., 2006; Rose et al., 2009). In diesen Gebieten lag in den vergangenen 30 Jahren die Prävalenz von *Psoroptes ovis* bei Schafen bei bis zu 10%. Ebenso hoch wurde die Prävalenz von *Psoroptes ovis*-Infektionen bei Rindern in Flandern angegeben (Lonneux et al., 2000).

In den Ohren domestizierter Ziegen in Florida fand sich in 57% der Fälle ein Befall mit *Psoroptes*-Milben. In gesammelten Sera frei lebender Dickhornschafe in Kalifornien wurde über einen Zeitraum von 10 Jahren eine Seropositivität von 10,8% bis 20,8% ermittelt (Friel und Greiner, 1988; Mazet et al., 1992). Im brasilianischen Bundesstaat Rio de Janeiro waren bei 4% der Ziegen *Psoroptes*-Milben nachweisbar (Faccini und Ribeiro, 2008), und in der Nilregion Ägyptens zeigten 16,4% der Büffelzuchtpopulation einen Befall mit *P. ovis* (El-Khodery et al., 2010). In Pakistan lag die durch Milbennachweis ermittelte Prävalenz bei Schafen bei 14%, während im Irak diese, ebenso parasitologisch ermittelt, je nach Schafrasse bei 37,3% beziehungsweise 71,4% lag (Tasawar et al., 2007; Alnaaimi und Al-Badrani, 2010).

2.4. Schäden im Wirt

Der Befall mit *Psoroptes ovis* kann schwere exsudative, mitunter ulzerative, von starkem Pruritus begleitete Dermatitiden auslösen (Stromberg und Fisher, 1986; Losson et al., 1999). Durch Benagen und/oder Scheuern der befallenen Areale sind bakterielle Sekundärinfektionen möglich. Läsionsassoziierte Alopezie kann in Verbindung mit gesteigertem Erhaltungsbedarf zu Hypothermie (Cole und Guillot, 1987) und unter entsprechenden klimatischen Bedingungen und/oder bei Sekundärinfektionen zum Tod der betroffenen Tiere führen (Stromberg und Guillot, 1987; Samuel et al., 1991). Lämmer infizierter Schafe können reduzierte Geburtsgewichte aufweisen (Sargison et al., 1995). Pruritus bedingt bei Schafen wie auch bei Rindern eine Störung des Wohlbefindens und der Rumination (Berriatua et al., 2001; De Bonte et al., 2009). Durch anhaltende Irritation und Beunruhigung durch den Befall mit *P. ovis* sind beim Schaf vereinzelt epileptiforme Anfälle beschrieben (Bygrave et al., 1993). Der Befall des Gehörgangs kann zu einer Minderung des Hörvermögens und im Fall wild lebender Herbivoren zu einer essenziellen Gefährdung durch nicht rechtzeitig wahrgenommene Raubtiere beitragen (Norrix et al., 1995).

3. Entzündungsreaktion und Immunantwort

Histologische Studien milbenalterierter Haut von Schafen und Rindern zeigen, dass *P. ovis*, abhängig von der Wirtsspezies, innerhalb von 24 Stunden bis maximal 7 Tagen eine hochgradige, gemischtzellige entzündliche Infiltration, dominiert von eosinophilen Granulozyten mit geringerer Beteiligung von neutrophilen Granulozyten und Mastzellen, verursacht (Rovere und Nunez, 1977; Stromberg und Fisher, 1986; Rosa und Moschini, 1988; Van Den Broek et al., 2000). Dabei ist auch eine dezente lymphozytäre Komponente in der Haut sowohl von Schafen als auch Rindern zu beobachten (Stromberg und Fisher, 1986; Rosa und Moschini, 1988). Neuere Studien zeigen, dass in Abhängigkeit von der befallenen Wirtsspezies unterschiedliche Subpopulationen von T-Lymphozyten und ihre Cytokine an den Entzündungsreaktionen in der Haut beteiligt sind (Van Den Broek et al., 2005; Hoek et al., 2009; McNeilly et al., 2010).

Die Infektion mit *P. ovis* führt im Wirtstier zu Bildung von Antikörpern (IgG und IgE), welche im Serum durchschnittlich 2 Wochen post infectionem nachgewiesen werden können (Fisher et al., 1986; Matthes et al., 1996; Losson et al., 1999; Van Den Broek et al., 2000).

4. Pathogenese

Durch Kontakt mit infizierten Individuen oder mit kontaminierten Materialien gelangt *P. ovis* auf die Hautoberfläche der Wirtstiere. Im Gegensatz zu *Sarcoptes*-Milben gräbt *P. ovis* keine Gänge in die Haut, sondern parasitiert auf der Hautoberfläche. Durch Abrasion der Epidermis und Ausscheidung entzündungsfördernder Substanzen durch die Milben entwickelt sich, je nach Lokalisation des Milbenbefalles, eine chronische Otitis media beziehungsweise eine chronische exsudative, von Alopezie und Hyperkeratose begleitete Dermatitis mit einem gemischtzelligen, von eosinophilen Granulozyten dominierten entzündlichen Infiltrat.

Bei der bei allen motilen Entwicklungsstadien nachgewiesenen Nahrungsaufnahme (Thind und Ford, 2007) dringen die Mundwerkzeuge von *P. ovis* bis an das innere Stratum corneum (Sinclair und Filan, 1989), nicht aber in vaskularisierte Bereiche der Haut vor. Wie durch ultrastrukturelle Untersuchungen gezeigt werden konnte, ernährt sich *P. ovis* in erster Linie von den zellreichen entzündlichen Exsudaten der befallenen Wirtstiere (Mathieson und Lehane, 2002). Dabei scheinen die Milben durch eigene, noch nicht vollständig identifizierte, chemotaktisch aktive Substanzen den Influx von eosinophilen Granulozyten zu stimulieren (Wildblood und Jones, 2007). Ein die Entzündung begleitendes Ödem resultiert aus der Freisetzung von unter anderem Histamin aus residenten und eingewanderten Mastzellen. Durch Substanzen, die von der Milbe mit dem Kot ausgeschieden werden und zum Teil ausgeprägte Homologie mit Allergenen von einigen Hausstaubmilben aufweisen (z. B. Tropomyosin, Paramyosin und Apolipoprotein/Vitellogenin), werden im Verlauf der Infektion mit *P. ovis* sowohl Antikörper vom IgG als auch vom IgE Typ gebildet (Huntley et al., 2004). Dabei werden die von der Milbe mit dem Kot ausgeschieden Stoffe in der Haut von dendritischen Zellen aufgenommen und gelangen mit der Lymphflüssigkeit in die regionären Lymphknoten (Steinman, 1991; Banchereau und Steinman, 1998; Fukunaga et al., 2008). Alternativ und deutlich schneller können Antigene mit Molekülmassen bis 70 kDa zellunabhängig in die Lymphknoten geschwemmt und dort von residenten Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen werden (Sixt et al., 2005). Im Lymphknoten kommt es in Folge der Proliferation von B-Zellen zur reaktiven Hyperplasie, die in Abhängigkeit ihres Ausmaßes zu einer deutlichen Volumenzunahme des Lymphknotens führen kann (Sobotta und Welsch, 2006). Im Bereich der entzündeten Haut führt ein Zweitkontakt der Milbenantigene mit auf der Oberfläche von Mastzellen exprimierten spezifischen IgE-Antikörper im Rahmen einer allergischen Reaktion (vom Typ I) zu deren Degranulation (Van Den Broek et al., 2003).

Einen weiteren Stimulus für die den Entzündungsprozess fördernde Mastzelldegranulation stellt möglicherweise der unter anderem auch von eosinophilen Granulozyten sezernierte Plättchen aktivierende Faktor (PAF) dar (Jolly et al., 2001).

Inwieweit aus der Milbe isolierte freie Radikale neutralisierende Enzyme wie Peroxiredoxin Po-TPx (McNair et al., 2009), Superoxiddismutase, Thioredoxin, Glutathion-S-Transferase und diverse andere Proteasen in der Pathogenese der Hautschädigung eine Rolle spielen, ist noch nicht hinreichend geklärt. Diskutiert wird eine mögliche Beteiligung bei der Degradierung von Gewebe beziehungsweise eine protektive Funktion gegenüber der Immunantwort des Wirtes (Kenyon und Knox, 2002; Kenyon et al., 2003).

Zusätzlich scheint *P. ovis* möglicherweise auch als Vektor für pathogene Mikroorganismen zu fungieren. Beispielsweise wurden aus *Psoroptes*-Milben pathogene Mykoplasmen kultiviert und eine Reihe von Bakterien (unter anderem *Serratia* spp., *Staphylococcus* spp., *Alloiococcus otitidis*) isoliert (Cottew und Yeats, 1982; Damassa und Brooks, 1991; Mathieson und Lehane, 1996; Hogg und Lehane, 1999, 2001; Bates, 2003).

5. Diagnose und Differentialdiagnosen

Die klassische Diagnose einer *Psoroptes*-Infektion basiert auf der klinischen Untersuchung in Verbindung mit der mikroskopischen Untersuchung von Hautgeschabseln (Ochs et al., 2001). Da jedoch die klinische Symptomatik nicht pathognomonisch ist und die Untersuchung der Hautgeschabsel lediglich eine geringe bis mittlere Sensitivität aufweist, waren die Ergebnisse dieser Diagnostik teilweise unbefriedigend (Meleney, 1978; Ochs et al., 2001; Alnaaimi und Al-Badrani, 2010). Zum Nachweis spezifischer Serum-Antikörper gegen *P. ovis*-Antigene bei Schafen, Rindern und Kaninchen wurden für experimentelle Zwecke mehrere ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)-basierte Assays entwickelt.

Die Sensitivität dieser Tests beträgt bei Schafen je nach Rasse, Geschlecht und Alter 52 bis 100% bei einer Spezifität von 75 bis 100% (Fisher, 1983a, 1983b; Wassall et al., 1987; Boyce und Brown, 1991; Boyce et al., 1991; Lonneux et al., 1996; Ochs et al., 2001).

Als Differentialdiagnosen kommen neben Infektionen mit anderen Räudemilben, die morphologisch unter anderem anhand ihrer Prätarsen unterschieden werden können (siehe Abbildung 4), Irritationen durch diverse Insekten und Zecken, aber auch Vergiftungen und Mangelerscheinungen in Betracht (Dirksen et al., 2006).

6. Therapie

Die Räude wurde bereits in der Antike behandelt. Zum Einsatz kamen dabei Zubereitungen mit teils harmlosen Bestandteilen wie Öl und Wein, aber auch giftigen Stoffen wie Quecksilber, Nikotin und Arsenik. Bis 1800 wurden betroffene Tiere manuell mit diesen Mitteln gewaschen. Danach erfolgten erste, beschwerliche Versuche mit Tauchbädern, bei denen die Tiere in Wannen auf ebenem Grund getaucht wurden. Später setzte sich ein alternatives Dipverfahren unterhalb des Bodenniveaus durch. Das erste kommerzielle Dippräparat wurde 1843 von William Cooper entwickelt (Kirkwood, 1986; O' Brien, 1999).

Seit den frühen 40er Jahren des 20. Jahrhunderts erfolgen der Einsatz und die Entwicklung unterschiedlicher Substanzgruppen. Anfänglich eingesetzte Verbindungen aus der Gruppe der Organochloride sind aufgrund ihrer nachgewiesenen Anreicherung in der Nahrungskette und ihrer Persistenz in der Umwelt sehr kritisch zu beurteilen und wurden durch die deutlich besser abbaubaren Organophosphate verdrängt.

In den 70er Jahren wurden mehrere Gruppen von Ektoparasitika eingeführt. Neben den sogenannten Insektenwachstumsregulatoren, die jedoch keine Anwendung in der Kontrolle der *Psoroptes*-Räude finden, wurden die Triazapentadiene und chemische Derivate von Pyrethrinen entwickelt.

Avermectine und die strukturell verwandten Milbemycine, makrozyklische Fermentationsprodukte von *Streptomyces avermilitis* beziehungsweise *Streptomyces hygroscopicus aureolacrimosus*, wurden 1975 entdeckt und aufgrund ihrer breiten antiparasitären Wirkung (Läuse, Räude Milben, meisten larvalen Stadien und Adulte relevanter Magen-Darm-Nematoden, Lungenwürmer und Dassel) und therapeutischen Breite in die veterinärmedizinische Therapie eingeführt. Dabei zeigt in der Regel eine einmalige subkutane Applikation gängiger Wirkstoffe eine gute Wirkung auf das Einzeltier (O' Brien et al., 1994; Bates et al., 1995). In größeren Beständen wird jedoch im Hinblick auf den Entwicklungszyklus von *P. ovis* und um gegebenenfalls bei erster Behandlung übersehene Tiere erfassen zu können, eine zweimalige Applikation im Abstand von 7 bis 10 Tagen empfohlen. Bestände, in denen regelmäßig zugekaufte Tiere eingestallt werden, sollten geschützt werden durch Behandlung des Zukaufs mit lang wirksamen Formulierungen (Rehbein et al., 2002).

Aufgrund der Entwicklung von Medikament-Resistenzen, der Erkenntnis der mit dem Gebrauch von Chemotherapeutika verbundenen Gefahren für die Umwelt und auch aus ökonomischen Gründen wird nach alternativen Behandlungsstrategien gesucht (Halley et al., 1993; Clark et al., 1996; O' Brien, 1999; Bates, 2004).

Ein interessanter Ansatz ist der Einsatz von pathogenen Pilzen. Sowohl in vitro als auch in vivo konnten letal verlaufende Infektionen der Milbe mit *Metarhizium anisopliae* und *Beauveria bassiana* induziert werden (Brooks und Wall, 2001; 2005; Lekimme et al., 2006; Abolins et al., 2007).

7. Prognose

Unter günstigen Haltungs- und Fütterungsbedingungen besteht die Möglichkeit der Selbstbegrenzung und Spontanheilung einer Infektion mit *P. ovis*. Hingegen ist bei ungünstigen Umweltbedingungen mit schweren, protrahierten Verläufen, einschließlich Todesfällen zu rechnen. Einzeltierbehandlungen sind in der Regel erfolgreich, während die Tilgung der Räude auf Bestandesebene ungleich schwieriger ist. Bei regelmäßigem Zukauf von Tieren besteht zudem immer die Gefahr der Neuinfektion des Bestandes (Dirksen et al., 2006).

8. Ökonomische Schäden durch *Psoroptes ovis*-Infektionen

Bezüglich der von *Psoroptes ovis*-Infektionen verursachten wirtschaftlichen Schäden liegen nur wenige Daten vor (Lonneux et al., 1998; Rehbein et al., 2000b). Die Kosten eines Ausbruchs der *Psoroptes*-Räude in Rinderbeständen der USA von 1972/73 wurden auf 40 Millionen Dollar geschätzt (Jensen, 1979), 1975 betrug der geschätzte Verlust durch Prophylaxe, Behandlung und Wertminderung infizierter Rinder 65 Millionen Dollar. Drummond (1981) bezifferte den durch Milben allgemein verursachten, geschätzten Verlust in den USA mit 29,7 Millionen Dollar. Einer Schätzung von Pouplard (1990) zufolge mussten in Belgien 400,000 Rinder behandelt werden. Bei mit *Psoroptes ovis* infizierten Rindern wurde eine um bis 21% reduzierte Futteraufnahme festgestellt (Tobin, 1962). Da der Erhaltungsbedarf der Tiere linear mit der Fläche der milbenalterierten Hautareale ansteigt (Cole und Guillot, 1987), sinken die täglichen Gewichtszunahmen (Tobin, 1962; Meleney und Fisher, 1979; Guillot und Cole, 1984; Cole und Guillot, 1987; Lonneux et al., 1997, 1998; Rehbein et al., 2002) bis hin zum Verlust von Körpergewicht (Lonneux et al., 1997; Rehbein et al., 1997).

Auch bei Schafen ist durch den Befall mit *Psoroptes ovis* eine schwere Beeinträchtigung der Körpergewichtsentwicklung (Kirkwood, 1980; Rehbein et al., 2000a), beziehungsweise Körpergewichtsverlust (Meintjes et al., 2002) beschrieben worden.

Kirkwood (1980) bezifferte den in einer Herde mit 100 infizierten Schafen durch verminderte Gewichtszunahmen entstehenden Verlust mit 1000 £.

Ferner kann sowohl die entzündliche Alteration als auch die Automutilation der Haut kann zu Woll- beziehungsweise Lederschäden führen (Von Rotz et al., 1983; Buechler, 1984; Rehbein et al., 2000b). Allein im Vereinigten Königreich wird der Verlust durch minderwertige Schafshäute jährlich auf 15 Millionen £ geschätzt (Coles, 1998). Daneben fallen weitere Kosten, unter anderem für Behandlung und Diagnostik an (Jensen, 1979; Lonneux et al., 1998), welche sich z. B. im Falle der Schafräude in Großbritannien aktuell auf etwa 8 Millionen £ jährlich belaufen (Nieuwhof und Bishop, 2005).

9. Untersuchte Organe

Grundlegende Aspekte der Anatomie, Funktion und Physiologie der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Organe werden im Folgenden kurz erläutert.

9.1. Haut

Die Haut (Cutis) im eigentlichen Sinne ist als Bestandteil des Integumentum commune die äußere Bedeckung des Körpers einschließlich der als Adnexe zusammengefassten Haarfollikel, Talg-, Schweiß- und Spezialdrüsen. Beim Rind nimmt sie, je nach Alter des Tieres, eine Fläche von 1 bis 6 m² ein (Curtis, 1983). Sie funktioniert als Schutz vor Austrocknung, physikalischen, chemischen und infektiösen Noxen und spielt eine entscheidende Rolle in der Wärmeregulation und als immunologische Grenzschicht.

Neben ihrer Aufgabe als Sinnes- und Kommunikationsorgan ist sie ein wichtiges Stoffwechsel- und Speicherorgan mit Fähigkeit zur Synthese, Absonderung und Ausscheidung von Stoffen (König und Liebich, 1999; Weiss und Teifke, 2007).

Anatomisch-histologisch ist das Integumentum commune geschichtet aufgebaut und besteht aus Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Dermis, Korium) und Unterhaut (Subkutis, Hypodermis) (König und Liebich, 1999).

Diese grobe Schichtung kann feiner differenziert werden, so daß von apikal nach basal das Stratum corneum, ein variabel auftretendes Stratum lucidum sowie die Strata granulosum, spinosum und basale der Epidermis und nachfolgend die Strata papillare und reticulare der Dermis unterschieden werden können. Die Schichtung der Epidermis spiegelt den Ablauf der zellulären Differenzierung wieder. Durch mitotische Teilung der über Hemidesmosomen fest mit einer Basalmembran und untereinander über Desmosomen verbundenen Keratinozyten des Stratum basale erfolgt die ständige Regeneration der Epidermis (Fritsch, 1988).

In der Lederhaut dienen die abhängig von der mechanischen Belastung mehr oder weniger stark ausgeprägten zapfenförmigen Vorstülpungen des vaskularisierten Stratum papillare neben der Verankerung der Epidermis auch ihrer Ernährung. Aus den Gefäßen gelangen Nährstoffe durch Diffusion in die gefäßfreie Epidermis. Vorzugsweise im Stratum papillare finden sich als Abkömmlinge der Epidermis Haare, Talg- und Schweißdrüsen, die sogenannte Epidermistrias, eingebettet in einem Netzwerk aus kollagenen und elastischen Fasern. Das darunter liegende, deutlich zellärmere Stratum reticulare stellt die stärkste Schicht des Koriums und die bindegewebige Verbindung zur Unterhaut dar. Scherengitterartig angeordnete Kollagenfasern in Kombination mit elastischen Fasern sind die Hauptträger der mechanischen Eigenschaften der Haut.

Die als Verschiebe- und Isolierungsschicht in den meisten Körperregionen ausgebildete, vaskularisierte und innervierte Unterhaut besteht aus lockerem, unregelmäßig angeordnetem Bindegewebe mit mehr oder weniger reichlich eingelagertem Fettgewebe.

9.2. Lymphknoten

Lymphknoten sind ein wesentlicher Bestandteil des lymphatischen Gewebes. Neben ihrer Funktion in der Immunantwort sind sie an der Hämatopoese (Bildung von Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen) beteiligt.

Die in das Lymphdrainagesystem durch afferente und efferente Gefäße eingebundenen Organe sind von einer Bindegewebskapsel umgeben, von der bindegewebige Trabekel ins Innere ziehen und dieses unvollständig in kammerartige Kompartimente unterteilen. Die Kompartimente sind ausgefüllt mit retikulärem Bindegewebe, dem morphologischen Äquivalent der Filterfunktion des Lymphknotens (Sixt et al., 2005), in das Makrophagen und dendritische Zellen sowie unterschiedliche Formationen von Lymphozyten und deren Differenzierungsstufen eingelagert sind. Diese sind in der Peripherie dichter als im Zentrum gepackt, was eine mikroskopische Differenzierung von Mark und Rinde erlaubt. In der Rinde finden sich zum einen primäre Lymphfollikel, in denen naive B-Lymphozyten (ohne bisherigen Antigenkontakt) angesiedelt sind, zum anderen T-Lymphozyten die parafollikulär liegen. In der parakortikalen Zone verlaufen hochendotheliale Venolen, aus denen zirkulierende naive CD4⁺-T-Zellen sowie B-Zellen via Diapedese austreten (Abbildung 6).

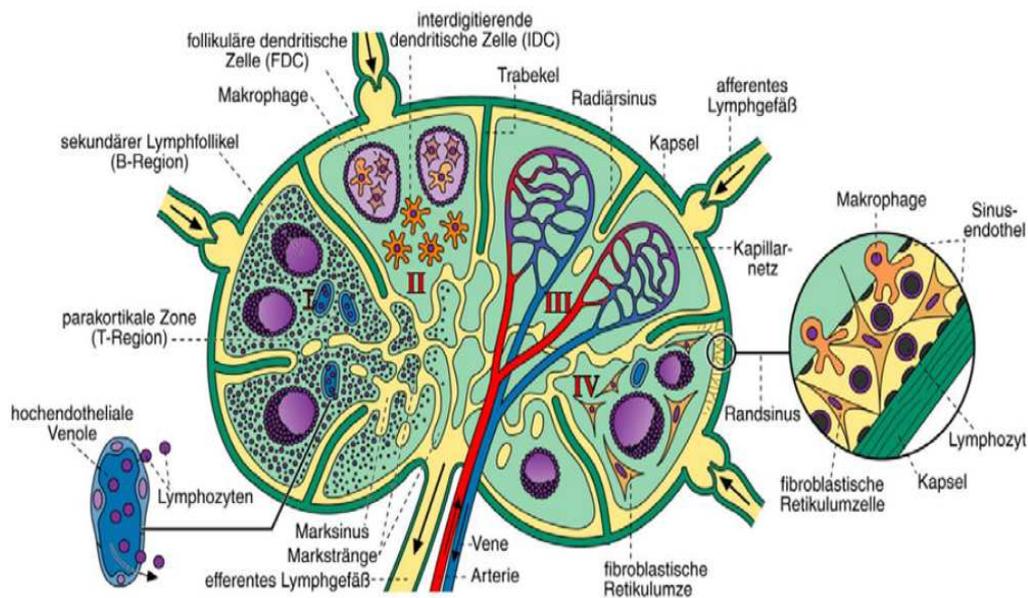


Abbildung 6: Lymphknoten, schematisch dargestellt und in vier Sektoren (I-IV) gegliedert, deren Komponenten aber im ganzen Lymphknoten in gleicher Weise verteilt sind. Die in dieser Darstellung gezeigten Verhältnisse sind bei Mensch (vorliegende Abbildung) und Rind prinzipiell vergleichbar. **I:** Mit B- und T-Lymphozyten assoziierte Strukturen. **II:** Makrophagen und antigenpräsentierende Zellen. **III:** Mikrozirkulation. **IV:** Follikel und retikuläres Bindegewebe. Abbildung entnommen aus Lehrbuch der Histologie (Sobotta und Welsch, 2006).

9.3. Nebennieren

9.3.1. Morphologie

Umgebenen von einer bindegewebigen Kapsel, liegen die beim Rind kommaförmige linke und in Form eines stilisierten Herzens ausgebildete rechte Nebenniere retroperitoneal. Die Nebennieren bestehen aus zwei funktionell verschiedenen Anteilen, der Steroidhormon-produzierenden, zonal aufgebauten Nebennierenrinde (NNR) und dem Katecholamin-produzierenden Nebennierenmark (NNM) (Abbildung 7).

Subkapsulär findet sich beim Rind die Zona glomerulosa, knäueförmig angeordnete Zellen, die bei anderen Spezies auch arkadenförmig formiert sein können. Die Zellen der sich angrenzenden Zona fasciculata liegen in radiärer, strangartiger Orientierung vor.

Mehr oder weniger deutlich abgrenzbar schließt an diese die perimedulläre Zona reticularis an (König und Liebich, 1999).

Im NNM liegen unter anderem die durch Chromsalze anfärbbaren (= chromaffinen) katecholaminproduzierenden Endokrinozyten.

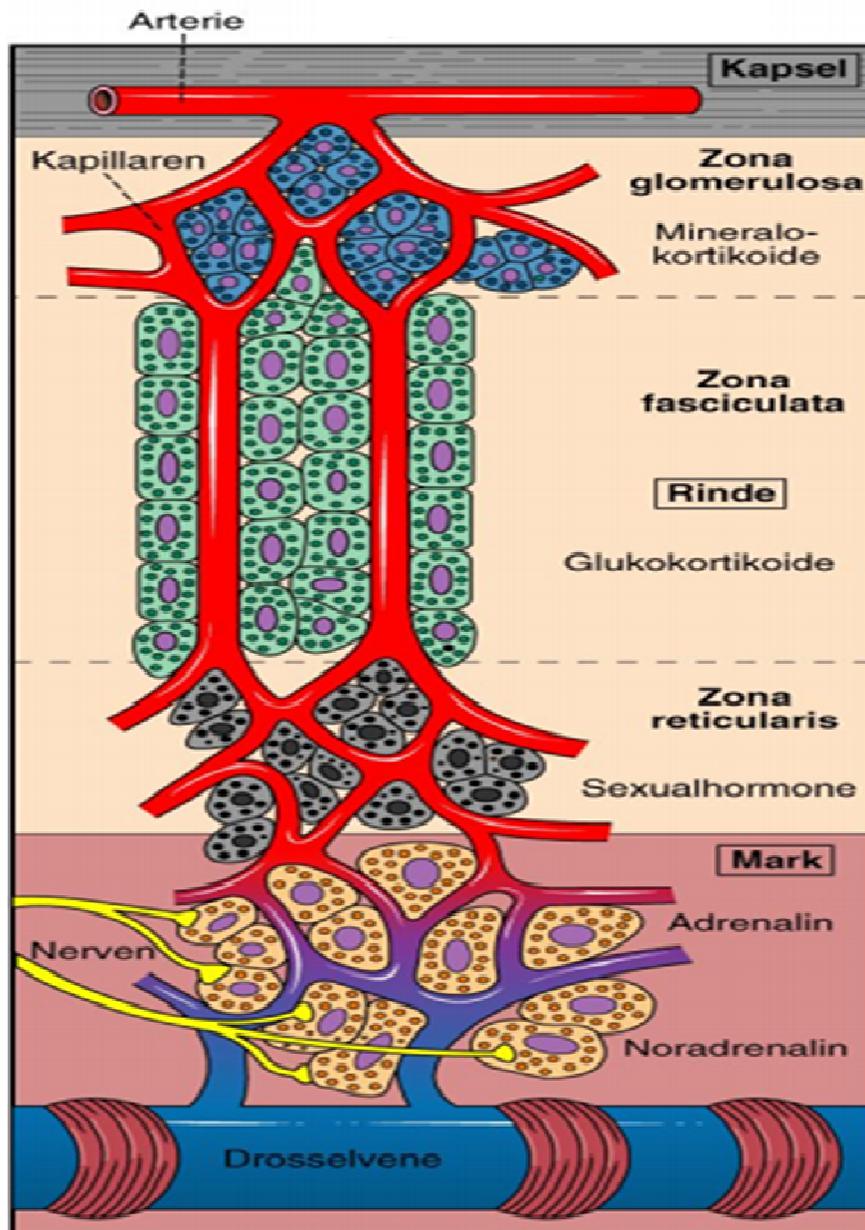


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Nebennierenkompartimente und der in den einzelnen Nebennierenzonen produzierten Hormone. Die in dieser Darstellung gezeigten Verhältnisse sind bei Mensch (vorliegende Abbildung) und Rind prinzipiell vergleichbar. Abbildung entnommen aus „Lehrbuch der Histologie“ (Sobotta und Welsch, 2006).

9.3.2. Physiologie der Nebenniere

Die Blutversorgung der Nebenniere erfolgt zum einen über multiple kleine, aus größeren benachbarten Gefäßen entspringende Arterien, die über die Kapsel eintreten und sich in radiär gerichtete Rindenkapillaren verästeln, diese Angioarchitektur ist für die Synthese der Katecholamine von großer Bedeutung. Daneben wird das Mark durch Arteriolen versorgt, die unverzweigt durch die Rinde ziehen. Der Abfluss über die in die Vena renalis und/oder kaudale Hohlvene mündende Zentralvene des Markes erfolgt über Venen, die über Längsmuskelpolster in ihrer Adventitia verfügen. Diese modifizierten Venen sind befähigt, den Fluss des mit Hormonen angereicherten Blutes zu drosseln. Somit kommt ihnen eine Regulationsfunktion zu, die in Stresssituationen eine wichtige Rolle spielt (Bassett und West, 1997; Rohen und Lütjen-Drecoll, 2000).

Die Innervation der Nebenniere erfolgt zum größten Teil über sympathische, im geringeren Maße auch über parasymphatische Anteile des vegetativen Nervensystems. Daneben werden sowohl NNR als auch NNM durch diverse Neuropeptide beeinflusst (Edwards und Jones, 1994; Nussdorfer und Malendowicz, 1998; Cavadas et al., 2003).

9.3.2.1. Nebennierenrindenhormone

Jede Zone der Nebennierenrinde (NNR) synthetisiert in komplexen Kaskaden von Umwandlungsschritten aus Cholesterol eine spezielle Gruppe von Kortikosteroiden (Keegan und Hammer, 2002). In der Zona glomerulosa werden Mineralokortikoide mit den beiden wichtigsten Vertretern Aldosteron und Desoxykortikosteron synthetisiert.

Die in der Zona fasciculata gebildeten Glukokortikoide beeinflussen den Kohlenhydrat-, Aminosäuren- und bedingt auch den Fettstoffwechsel, wirken permissiv auf das Herz-Kreislaufsystem und spielen eine wichtige Rolle bei entzündlichen und allergischen Prozessen (Löscher et al., 2002).

Ihre im Regelfall circadiane Freisetzung (Thun, 1981; Lefcourt et al., 1993) steht primär unter der Kontrolle des Hypothalamus/Hypophysenvorderlappen-Systems und wird durch dessen Hormone, Corticotropin Releasing Hormon (CRH) und Adrenokortikotropes Hormon (ACTH) und negative Rückkopplungsmechanismen reguliert. Beim Rind, wie auch beim Schwein und Schaf wirkt das aus dem Hypophysenhinterlappen stammende Antidiuretische Hormon (ADH) ebenfalls ACTH-freisetzend (Minton, 1994). Die biologische Rhythmik der Glukokortikoidfreisetzung kann jedoch durch Stress durchbrochen werden. So stimulieren beispielsweise verschiedene im Rahmen von Entzündungsprozessen oder Infektionen gebildete Cytokine (unter anderem IL-1, IL-6, Tumor Nekrose Faktor α) über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse die Glukokortikoidproduktion in der Nebennierenrinde (Marx et al., 1998; Turnbull und Rivier, 1999).

Aus der Zona reticularis, beim weiblichen Rind auch im geringeren Maße aus dem Ovar, stammen die Sexualhormonvorstufen Dehydroepiandrostenon (DHEA) und Dehydroepiandrostenon-Sulfat (DHEA-S) (Wise et al., 1982; Baulieu, 1998; Gabai et al., 2004). In der Trächtigkeit ist die Plazenta die wichtigste DHEA-Quelle (Geisert und Conley, 1998). DHEA und DHEA-S werden in den Gonaden zu Östrogen und Testosteron umgewandelt (Labrie, 1991). Beim weiblichen, nicht trächtigen Rind scheint die Ausschüttung von DHEA und DHEA-S von ACTH unabhängig zu sein (Marinelli et al., 2007). Neben der Bedeutung als Vorstufe der Sexualhormone übt DHEA eine hemmende Wirkung auf die Katecholaminproduktion aus (Hu et al., 2000; Liu und Wang, 2004).

9.3.2.2. Nebennierenmarkhormone

In den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarkes werden die Katecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin synthetisiert. Diese werden in Granula gespeichert und bei Bedarf durch Exozytose freigesetzt (Hinojosa-Laborde und Lange, 1999; Flatmark, 2000). Über medulläre, die chromaffinen Zellen umgebenden Kapillaren gelangen die Hormone in das venöse Blut. Katecholamine fungieren als Neurotransmitter im peripheren und zentralen Nervensystem.

Zu einer gesteigerten Ausschüttung kommt es in körperlichen und/oder psychischen Stresssituationen unter Einfluss einer kompensatorisch erhöhten Sympathikusaktivität (Carmichael und Winkler, 1985; Döcke, 1994). Zielstrukturen der Katecholamine sind die G-Protein-gekoppelten α - und β - Adrenozeptoren des vegetativen und zentralen Nervensystems. Neben multiplen Effekten auf diverse Körperfunktionen wirken sie positiv dromo-, iono-, chrono- und bathmotrop auf das Herz. Die Synthese der Katecholamine unterliegt auf Ebene der Transkription dem Einfluss der Glukokortikoide (Seidl und Unsicker, 1989). So führt Glukokortikoidmangel zur adrenomedullären Dysfunktion und konsekutiv zu inadäquater Stressantwort (Zuckerman-Levin et al., 2001).

9.3.3. Wachstumsprozesse der Nebenniere

Wie jedes Organ wachsen die Nebennieren in der Embryonal- und Fetalentwicklung, als auch postnatal bis zu ihrer physiologischen Größe in Relation zu dem sie beherbergenden Körper heran. Die im Rahmen der natürlichen Entwicklung ablaufenden Wachstumsprozesse scheinen dabei abhängig von Alter und Geschlecht zu sein (Bielohuby et al., 2007).

Abgesehen von embryonalen und kongenitalen Entwicklungsstörungen sind Tumore sowohl der Rinde als auch des Markes als pathologische Proliferation beschrieben (Schmidt und Dahme, 2007).

Die Größe der Nebennieren ist abhängig von der Zellzahl und Größe der Zellen (Hoeflich et al., 2002). Ein Wachstum der Nebennieren kann somit bedingt sein durch eine Vermehrung (Hyperplasie) und/oder Vergrößerung der Zellen (Hypertrophie).

Diese Wachstumsprozesse können reaktiv oder adaptiv bedingt sein. Kompensatorisches Wachstum als adaptive Reaktion stellt sich bei Ausfall oder Insuffizienz der kontralateralen Nebenniere ein, wie an hemiadrenalektomierten Ratten gezeigt werden konnte (Engeland et al., 2005). Reaktives Wachstum der Nebennierenrinde wird ausgelöst durch permanent erhöhte Konzentration von ACTH und anderer wachstumsstimulierender Faktoren wie Wachstumshormon (GH) und Insulin-like Growth Factor 1. Der qualitative und quantitative Einfluss diverser wachstumsstimulierender und hemmender Faktoren auf unterschiedliche Zonen der Nebennierenrinde wurde zum größten Teil an Mäusen und Ratten erhoben (Rebuffat et al., 1979; Conran und Nickerson, 1982; Mazzocchi et al., 1983, 1986; Nussdorfer et al., 1986; Andreis et al., 1990; Milosevic et al., 1996; Hoeflich et al., 2002; Trifunovic et al., 2008). So konnte an GH-transgenen Mäusen beispielsweise gezeigt werden, dass einzelne Faktoren, beispielsweise GH, dissoziierte wachstumsstimulatorische Effekte in der Nebennierenrinde zeigen. Ebenso ist eine spezifische Inhibition des hypertrophen Nebennierenrindenwachstums durch Insulin-like Growth Factor-Bindeprotein 2 belegt (Hoeflich et al., 2002).

10. Stress

In der Literatur und im Sprachgebrauch werden häufig die beiden Termini Stress und Disstress synonym für eine wie auch immer geartete Störung des Wohlbefindens und der physiologischen Homöostase genutzt. Homöostase ist die Gesamtheit aller physiologischen Prozesse, die Verhältnisse und Funktionen im Körper konstant beziehungsweise aufrechterhalten (Cannon, 1928). Ereignisse, die den Grundzustand des Wohlbefindens und der Homöostase stören oder bedrohen (Chrousos, 1998), werden als Stressoren bezeichnet. Die Antwort eines Organismus auf diese Stressoren ist prinzipiell nützlich und auch erwünscht. Paradebeispiel ist die sogenannte fight-or-flight- Reaktion, die auch in der Geschichte der Evolution eine wichtige Rolle spielt. Der Begriff „Eustress“ (Selye, 1975) unterstreicht die möglich positive Wirkung mancher Stressoren. In der Antwort auf Stressoren gibt es individuelle wie auch speziesspezifische Unterschiede. Als komplexes Zusammenspiel vieler regulativer und adaptiver Mechanismen ist Stress ein konklusiver innerer Zustand, der nicht über einen alleinigen biologischen Parameter erfasst und gemessen werden kann (NRC, 2008).

Disstress ist ein mit signifikanter Alteration von Körperfunktionen einhergehender, aversionsbehafteter Zustand, dem ein Organismus sich nicht entziehen, oder nur unzureichend adaptiv begegnen kann (Moberg, 1987; Carstens und Moberg, 2000). Dieser Zustand kann durch akut oder chronisch einwirkende, solitäre, besonders schwere Stressoren und/oder synergistische Effekte multipler schwächerer Stressoren bedingt sein.

Die Nebenniere, als das Effektororgan der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren- als auch der Sympathikus-Adrenomedullären-Achse spielt in der Stressreaktion eine wichtige Rolle. In der Literatur, die Stressgeschehen bei Wiederkäuern gewidmet ist, wird häufig die zwischen einzelnen Individuen stark schwankende Serum-Kortisolkonzentration als Kriterium für Stress angegeben (Minka und Ayo, 2009).

Als weitere biochemische Parameter zur Beurteilung von Stress ist die Erhöhung der Konzentration der Tyrosinhydroxylase, ein in Nebennierenmark lokalisiertes Enzym in der Biosynthese der Katecholamine (Mounier et al., 2005) sowie die Bestimmung von Antioxidantien in Blut und Organen beschrieben (Dimri et al., 2010).

Ein methodisch anderer Ansatz ist die Beurteilung von verändertem Verhalten (Corke und Broom, 1999; Berriatua et al., 2001; Mounier et al., 2005; De Bonte et al., 2009; Walker et al., 2010). So werden Einflüsse, welche Verhaltensmuster stören, die mit Wohlbefinden assoziiert werden können, wie z. B. Rumination, Liegen oder Ruhen bei Wiederkäuern, per Definition als Stressoren bewertet.

Das relative Gewicht der Nebennieren und der sogenannte Adrenalindex (Breite der Zona fasciculata-reticularis im histologischen Schnitt dividiert durch die Breite der Zona glomerulosa) wurden von mehreren Autoren als geeignete Parameter für eine gesteigerte Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse beschrieben (Matthias, 1968; Appleby und Sohrabi, 1978; Van Rijswijk und Vorster, 1995). Veränderungen dieser Parameter konnten bei Rindern als Antwort auf diverse Stressoren beobachtet werden (Hartmann, 1974; Makumyaviri et al., 1985; Wilson, 2002).

Quantitativ-stereologische Analysen der Nebennieren, die morphologische Veränderungen als das Äquivalent einer Anpassung dieser an Langzeitstress detektieren, sind bei Wiederkäuern bislang nicht beschrieben worden.

III. Material und Methoden

1. Versuchsaufbau

Im Rahmen einer geblindeten Studie zur Evaluation eines Akarizids wurden von der Firma Merial GmbH (Kathrinenhof Research Center, Rohrdorf) im Abstand von drei Monaten zwei experimentelle Infektionsversuche mit *Psoroptes ovis*-Milben durchgeführt (Abschnitt 1.1 bis 1.5). Im Rahmen der entsprechend etablierter Richtlinien durchgeführten Versuche wurden gesunde männliche Deutsch-Fleckvieh Rinder mit *Psoroptes ovis*-Milben infiziert. Die Organe von nicht mit Milben infizierten Tieren dienten als Kontrolle. Zur Beurteilung der Effekte einer akariziden Therapie wurde die Hälfte der mit Milben infizierten Tiere acht Wochen nach Milben-Infektion mit einem Akarizid aus der Gruppe der makrozyklischen Lactone behandelt, infizierte, nicht akarizid therapierte Tiere wurden mit physiologischer Kochsalzlösung scheinbehandelt.

Im Folgenden werden die

nicht infizierten, nicht behandelten Tiere als Kontrolltiere/-gruppe;

infizierte, akarizid therapierte Tiere als behandelte Tiere/Gruppe und

infizierte, scheinbehandelte Tiere als unbehandelte Tiere/Gruppe

bezeichnet.

Zum Versuchsende nach weiteren acht Wochen wurden die Tiere geschlachtet und Proben der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Organe (Haut, Buglymphknoten und Nebennieren) gewonnen. Abbildung 8 zeigt den schematisierten zeitlichen Versuchsablauf.

1.2. Experimentelle *Psoroptes ovis* Infektion

Zu Versuchsbeginn (Tag - 56 und - 49) wurden alle Tiere des Infektionsversuches (n = 32) mit jeweils ca. 2000, von einem Donortier gewonnenen *Psoroptes ovis*-Milben gemäß international anerkannten Richtlinien im Bereich des Widerristes infiziert (Vercruysse et al., 2006).

1.3. Einteilung der Tiere in die behandelte und unbehandelte Gruppe

Zur Einteilung der Tiere der Infektionsversuche (n = 32) in die behandelte und unbehandelte Gruppe wurden sämtliche Tiere am Tag 0 des Versuches gewogen und nach Gewicht jeweils paarweise einer Rangliste zugeordnet. Zufällig wurde dann ein Tier jedes Paares der behandelten und das jeweilige Partnertier der unbehandelten Gruppe zugeteilt (Vercruysse et al., 2006). Das durchschnittliche Gewicht der Tiere der ersten Versuchsgruppe betrug $228,4 \pm 15,3$ kg, das der zweiten durchschnittlich $234,8 \pm 14,9$ kg. Tiere der ersten Gruppe wogen dabei zwischen 204 und 256 kg und Tiere der zweiten Versuchsgruppe zwischen 210 und 267 kg.

Die an den Tieren der behandelten beziehungsweise der unbehandelten Gruppe beider Infektionsversuche erhobenen Befunde wurden gemeinsam ausgewertet, da das Alter und das Gewicht der Tiere sowie die applizierte Infektionsdosis nicht signifikant verschieden war.

1.4. Behandlung bzw. Scheinbehandlung

Gemäß international anerkannten Richtlinien (Vercruysse et al., 2006) erhielten von den 32 infizierten Tieren jeweils die Hälfte eine einmalige subkutane Gabe eines Akarizids (n = 16, behandelte Gruppe), die andere Hälfte wurde mit subkutan applizierter physiologischer Kochsalzlösung scheinbehandelt (n = 16, unbehandelte Gruppe).

1.5. Bestimmung der Milbenzahlen

Zur Bestimmung der Milbenzahlen wurden pro Tier jeweils sechs Hautgeschabsel aus unterschiedlichen Lokalisationen des Widerristes an den Tagen 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 und 56 entnommen und innerhalb von 8 Stunden analysiert. Die Entnahme der Hautgeschabsel erfolgte im Bereich der Rudelasionen (die sich vorrangig im Widerristbereich befanden, beziehungsweise von dort ausgingen) beziehungsweise in Bereichen, in denen sich ursprünglich Läsionen befunden hatten (die in Abheilung begriffen beziehungsweise abgeheilt waren). Zur Milbenzahlung wurde jedes Geschabsel mit ca. 100 ml Leitungswasser, versetzt mit etwas Detergens (Pril), für etwa 5 Minuten auf einem Rüttler geschüttelt; danach wurde diese Suspension über ein Filtersystem mittels Unterdruck "ausgewaschen", wobei die Milben (und ähnliche große Partikel) auf schwarzem Filterpapier aufgefangen wurden und nach kurzer Trocknung der Filterpapiere auf einer Wärmeplatte mithilfe einer Stereolupe als lebende (motile) Milben gezählt wurden (Barth und Visser, 1985; Rehbein et al., 2002). Lagen in einem Hautgeschabsel mehr als 100 Milben vor, wurde das Ergebnis als „> 100“ dokumentiert (Lonneux et al., 1997; Rehbein et al., 2002).

1.6. Schlachtung und Bestimmung der Buglymphknoten- und Nebennierengewichte

Zum Versuchsende am Tag 56 wurden den Tieren eine Blutprobe zur Bestimmung der Serumkortisolkonzentration und die letzten Hautgeschabsel entnommen. Nach Ermittlung des aktuellen Körpergewichts (Vercruysse et al., 2006) wurden die Tiere durch Bolzenschuss betäubt und auf der Versuchsanlage des Merial Research Centers in Rohrdorf geschlachtet. Unmittelbar nach der Schlachtung wurden die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Organe (Buglymphknoten und Nebennieren) in toto entnommen und nach Abpraparation des umgebenden Binde- und Fettgewebes auf 0,1 g genau gewogen.

1.7. Bestimmung der Serumkortisolkonzentration

Eine unmittelbar vor der Schlachtung entnommene Blutprobe zur Bestimmung der Serumkortisolkonzentration wurde zur Analyse an ein externes Labor (VetMed Labor GmbH, Ludwigsburg) verschickt. Die Bestimmung der Kortisolkonzentration erfolgte dabei mittels eines elektrochemischen Lumineszenzimmunoassays (ECLIA).

1.8. Übersicht zu Probenumfang, Probenprozessierung und untersuchten Parametern

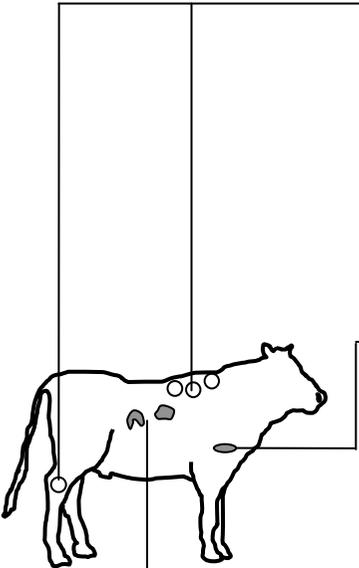
Von sämtlichen Tieren der Kontroll-, der Behandelten- sowie der unbehandelten Gruppe wurden Proben der Haut aus dem milbenalterierten Widerrist und dem makroskopisch unveränderten Bereich des Tarsus, der Buglymphknoten und der Nebennieren für histologische, morphometrische und quantitativ-stereologische Untersuchungen gewonnen.

Die Dicke der Haut und ihrer einzelnen Schichten, deren Volumendichten in der Haut sowie die numerische Flächendichte eosinophiler Granulozyten und Mastzellen in den einzelnen Hautschichten wurde an Hämatoxylin-Eosin (HE) - beziehungsweise Giemsa-gefärbten Kunststoffschnitten bestimmt. In HE-gefärbten Paraffinschnitten der Buglymphknoten wurden die Volumendichten von Keimzentren, sonstigen lymphatischen und nichtlymphatischen Geweben (= Kompartimente) im Lymphknoten und die Volumina dieser Kompartimente ermittelt. Die Bestimmung der Volumendichten der Zonen der Nebennierenrinde und des Nebennierenmarkes in der rechten Nebenniere erfolgte an HE-gefärbten Paraffinschnitten. Das mittlere Zellvolumen und die Anzahl der Zellen der Zona fasciculata-reticularis wurde in Toluidinblau-Safranin-gefärbten Epon-Semidünnschnitten von Stanzproben der rechten Nebennierenrinde bestimmt.

Abbildung 9 zeigt eine Übersicht zum Probenumfang, Lokalisation der entnommenen Proben, angewandten Einbett- und Färbetechniken sowie der Zielparameter der an den entsprechenden Präparaten durchgeführten morphometrischen und stereologischen Untersuchungen.

Abbildung 9 (folgende Seite): Übersicht zu Probenumfang, Probenprozessierung und untersuchten morphometrischen und stereologischen Parametern. Die in Klammern angegebenen Zahlen verweisen auf die Kapitelnummern der entsprechenden Beschreibungen in den Abschnitten "Material und Methoden" und "Ergebnisse".

Proben, Probenprozessierung und untersuchte Parameter

Tiere	Untersuchte(s) Organ(e)	Probennahme & -prozessierung	Parameter
	<p>Haut</p> <p>-3 Lokalisationen Widerrist (Sitz der Milben)</p> <p>-1 Lokalisation Tarsus (Vergleich zur infizierten Lokalisation am Widerrist)</p>	<p>Probennahme via Schlagstanzen [III.2.1.]; Fixierung [III.3.1.]; Lamellierung [III.3.4.]; senkrechte Einbettung in GMA/MMA [III.3.4.]; HE- & Giemsa Färbung [III.3.4.1. & III. 3.4.2.]</p>	<p>Histologische Befunderhebung [IV.4.1.1. & IV.4.1.2.]; Ermittlung der Dicke der Haut/Hautschichten [III.4.1.1., IV.5.1.1.1. & IV.5.1.2.1.]; Ermittlung des Volumenanteils einzelner Hautschichten in der Haut [III.4.1.2., IV.5.1.1.2. & IV.5.1.2.2.]; Ermittlung der numerische Flächendichte eosinophiler Granulozyten und Mastzellen in den einzelnen Hautschichten [III.4.1.3., IV.5.1.1.3. & IV.5.1.2.3.]</p>
	<p>Buglymphknoten</p>	<p>Entnahme der Buglymphknoten; Organgewichtsbestimmung [II.2.2.]; Bestimmung der Organvolumina [III.2.2.1.]; Lamellierung & Entnahme von 10 Proben aus systematisch zufällig gewählten Lokalisationen des lamellierten Buglymphknotens [III.2.2.]; Fixierung [III.3.1.]; Einbettung in Paraffin [III.3.3.]; HE-Färbung [III.3.3.2.]</p>	<p>Histologische Befunderhebung [IV.4.2.]</p> <p>Ermittlung der Volumenanteile diverser Kompartimente am Lymphknoten [III.4.2.1. & IV.5.2.1]</p> <p>Ermittlung der Volumina diverser Lymphknotenkompartimente [III.4.2.2. & IV.5.2.2.]</p>
	<p>Nebennieren</p>	<p>Entnahme beider Nebennieren in toto, Organgewichtsbestimmung [III.2.3.]; Bestimmung der Organvolumina [III.2.3.]; Fixierung [III.3.1. & III.3.2.1.]; Lamellierung [III.3.2.1.]</p> <p>Entnahme von je 4 Proben in systematisch zufällig gewählten Lokalisationen der rechten Nebennierenrinde [III.3.2.1.]; Einbettung in Epon [III.3.5.], Herstellung von seriellen Semidünnschnitten [III.3.5.1.], Toluidinblau-Färbung [3.5.2.]</p>	<p>Bestimmung des mittleren Zellvolumens [III.4.3.7. & IV.5.3.4.] und der Gesamtzahl der Zona fasciculata Zellen [III.4.3.8. & IV.5.3.5.] in beiden Nebennieren</p> <p>Histologische Befunderhebung [IV.4.3.]; Ermittlung der Volumenanteile [III.4.3.1. & IV.5.3.1.] und Volumina [III.4.3.2. & IV.5.3.2.] der Nebennierenrindenzonen und des Nebennierenmarkes an den Nebennieren</p>
<p>Kontrolle (n = 4): nicht infiziert, nicht behandelt</p> <p>Behandelt (n = 16): infiziert, behandelt</p> <p>Unbehandelt (n = 16): infiziert, nicht behandelt (scheinbehandelt)</p>			

2. Probennahme

2.1. Haut

Nach Abziehen der Häute von den Tierkörpern wurden in der Widerristgegend (bei Tieren der behandelten / unbehandelten Gruppe aus dem Randbereich der Läsionen) in zufälliger Orientierung (Piérard und Lapière, 1987; Hünemörder, 1995; Wanke et al., 1999) drei jeweils ca. 5 cm² große, runde Hautstücke mittels einer Schlagstanze entnommen. Eine weitere Probe gleicher Größe wurde aus der makroskopisch nicht von Milben alterierten Haut am Tarsus gewonnen. Die Proben wurden bis zur weiteren Prozessierung in 4%iger neutral gepufferter Formaldehydlösung (Nr. FN 10 000-4-1, SAV, Flintsbach a. Inn) fixiert.

2.2. Buglymphknoten

Die gewogenen Buglymphknoten wurden in planparallele, ca. 5 mm dicke Scheiben lamelliert. Zur systematisch zufälligen Auswahl (Gundersen und Jensen, 1987) der Entnahmelokalisation von jeweils 10 Gewebeproben (je ca. 1,5 cm³) für histologische und quantitativ-morphologische Untersuchungen wurden die, auf ihre rechte Schnittfläche abgelegten Scheiben mit einer durchsichtigen Testpunktrasterfolie (726 Testpunkte im Abstand von je 0,5 cm) bedeckt (Abbildung 10). Anhand der Gleichung 1 (Lewis-Beck et al., 2004) wurde für jeden Buglymphknoten ein individuelles Beprobungsintervall ermittelt. Die erste der 10 zu entnehmenden Proben wurde zufällig ausgewählt. Hierzu wurde eine Zufallszahl zwischen 1 und k einer Zufallszahlentabelle (Stattek, 2009) entnommen, und die Probe unter dem, durch die Zufallszahl definierten Trefferpunkt exzidiert. Danach wurde systematisch jeder weiterer k-te Trefferpunkt beprobt (Abbildung 10). Die exzidierten zehn Gewebeproben wurden mit der rechten Schnittfläche nach unten in Einbettungskassetten (Unilink, Engelbrecht, Edermünde) verbracht und in 4%iger neutral gepufferter Formaldehydlösung (Nr. FN 10 000-4-1, SAV, Flintsbach a. Inn) fixiert.

$$k = \frac{N}{n} \quad \text{(Gleichung 1)}$$

k Beprobungsintervall
N Anzahl der Trefferpunkte auf den Lamellen
n Anzahl auszuwertender Proben (10)

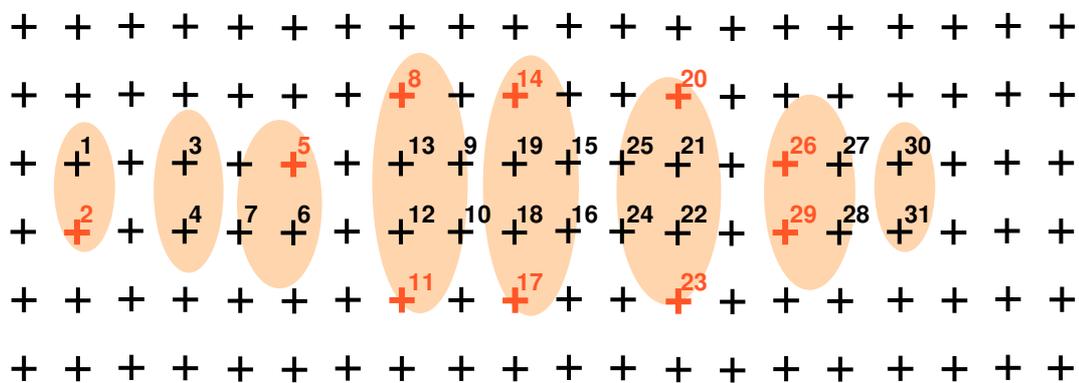


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Bestimmung von systematisch-zufällig gewählten Probenlokalisationen anhand eines durchsichtigen Testpunkttrasters. Bei $N = 31$ Trefferpunkten und 10 auszuwertenden Probenlokalisationen (n) ergibt sich nach $k = N/n$ (Gleichung 1) ein Beprobungsintervall $k = 3$. Eine einer Zufallszahlenreihe entnommene Zufallszahl (im gezeigten Beispiel 2) zwischen 1 und k definiert die erste (zufällige) Probenlokalisation (Trefferpunkt 2). Systematisch wird dann jeder weitere k -te (hier: dritte) Trefferpunkt beprobt (rot und fett markierte Trefferpunkte).

2.2.1. Bestimmung der Volumina der Lymphknoten

Das spezifische Gewicht der Lymphknoten wurde mittels der auf dem Prinzip von Archimedes basierenden Submersionsmethode nach Scherle (Weibel, 1979) durch Verdrängung von isotoner Kochsalzlösung bestimmt. Die Volumina der Lymphknoten wurden als Quotient ihrer Masse und ihres spezifischen Gewichtes berechnet.

2.3. Nebennieren

Nach Bestimmung der Volumina der präparierten Nebennieren (siehe Material und Methoden 2.2.1.) wurden diese bis zur weiteren Prozessierung in toto in 4%iger neutral gepufferter Formaldehydlösung (Nr. FN 10 000-4-1, SAV, Flintsbach a. Inn) bei 8°C fixiert.

3. Prozessierung der Gewebeproben für histologische, morphometrische und quantitativ-stereologische Analysen

3.1. Fixation

Bis zur weiteren Prozessierung wurde das Probenmaterial für mindestens 24 Stunden bei 8°C in 4%iger neutral gepufferter Formaldehydlösung (Nr. FN 10 000-4-1, SAV, Flintsbach a. Inn) auf einem Taumler (Modell 4010, Köttermann, Häningsen) fixiert.

3.2. Prozessierung der Nebennieren

3.2.1. Entnahme von Stanzproben der Nebennierenrinde für quantitativ-stereologische Analysen

Für morphometrische und quantitativ-stereologische Analysen wurde jeweils die rechte Nebenniere planparallel lamelliert (Scheibendicke ca. 3 mm) (Abbildung 11 A). Die Auswahl der Entnahmelokalisationen von je vier systematisch zufällig gewählten Proben der Nebennierenrinde pro Tier für quantitativ-stereologische Analysen erfolgte (siehe Material und Methoden Kapitel 2.2.) unter Verwendung einer Testpunktrasterfolie mit 1518 Testpunkten (Abstand: 0,3 cm). Mit einer im Institut für Tierpathologie hergestellten Stanze wurden senkrecht zur Oberfläche der Lamellen kreisrunde Gewebeproben mit 1 mm Durchmesser aus der Nebennierenrinde herausgestanzt (Abbildung 11 B).

Diese wurden einzeln in mit 6,25%ige Glutaraldehydlösung und Sörensen-Phosphat-Puffer (siehe Anhang 1.3.1. und 1.3.2.) beschickte Reaktionsgefäße (Eppendorf safe lock tube, Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf) verbracht (Abbildung 6 C). Nach Entnahme der Stanzproben wurden die Nebennierenlamellen auf ihre rechte Schnittfläche in Einbettungskassetten (Unilink, Engelbrecht, Edermünde) überführt und wieder in 4%ige gebrauchsfertige Formaldehydlösung (Nr. FN 10 000-4-1, SAV, Flintsbach a. Inn) verbracht.

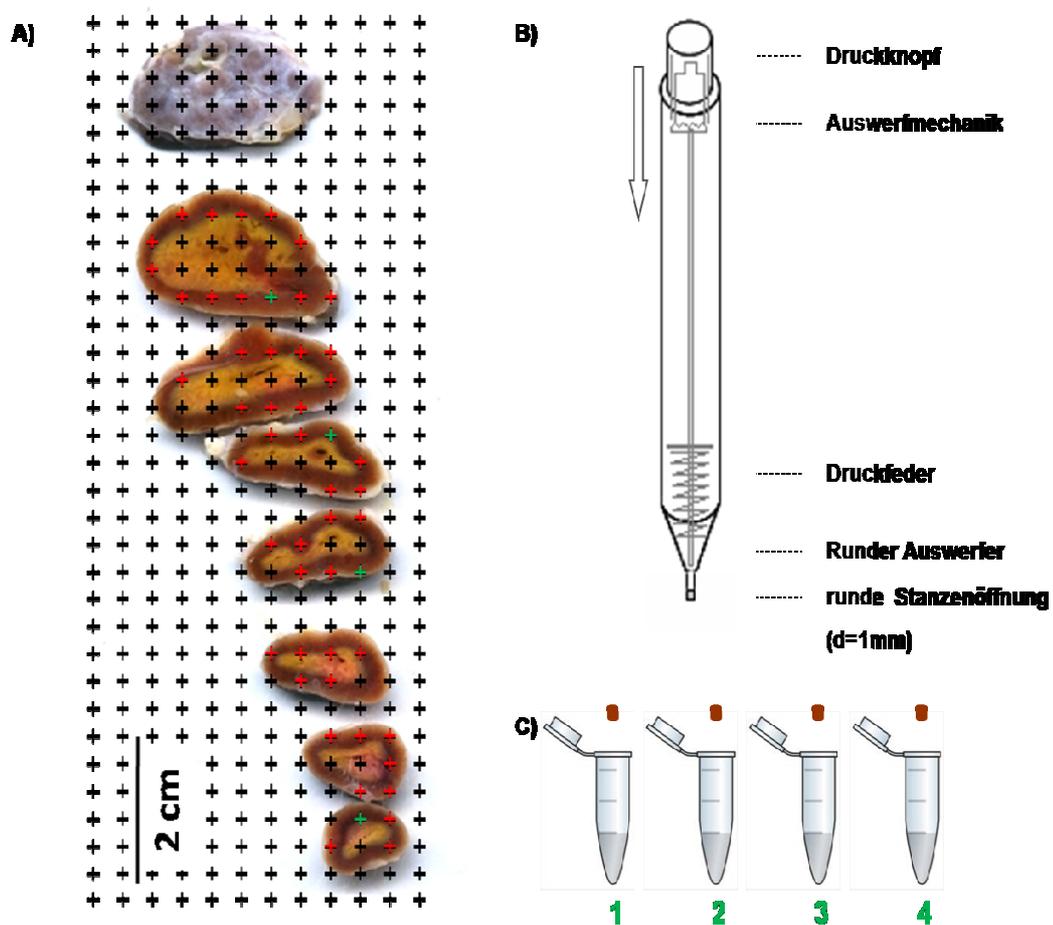


Abbildung 11: Entnahme von Stanzproben aus der Nebennierenrinde

A) Repräsentative lamellierte, rechte Nebenniere mit Testpunktraster zur Entnahme von vier systematisch-zufällig gewählten Proben aus der Nebennierenrinde für quantitativ-stereologische Analysen.

B) Schematische Darstellung der im Institut für Tierpathologie hergestellten Stanze.

C) Schematische Darstellung der aus den vier Lokalisationen gestanzten Gewebeproben vor Transfer in mit 6,25% Glutaraldehyd beschickte Reaktionsgefäße

3.3. Paraffineinbettung und Schnittherstellung

Zur Paraffineinbettung wurden die Lymphknotengewebeprobe und Nebennierenlamellen routinemäßig in einem Einbettungsautomaten (Autotechnik, Histomaster 2050/DI, Bavimed, Birkenau) wie folgt prozessiert:

Spülen mit destilliertem Wasser	30	Min.
Ethanol 70%ig (Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Offenbach a. Main)	2 x 1,5	Std.
Ethanol 96%ig	2 x 1,5	Std.
Ethanol 100%ig	2 x 1,5	Std.
Xylol (SAV LP, Flintsbach a. Inn)	2 x 30	Min.
Xylol	1,5	Std.
Paraffin (SAV LP, Flintsbach a. Inn) bei 60 °C	2	Std.
Paraffin bei 60 °C	3	Std.

Anschließend wurden an einer Ausgießstation (TBS 88 Paraffin Embedding System, Medite GmbH, Burgdorf) Paraffinblöcke der Proben hergestellt. Mit einem Rotationsmikrotom (HM 315, Microm, Walldorf) wurden Schnitte mit einer nominellen Schnittdicke von 3 µm angefertigt. Diese wurden auf einem 40 °C warmen Wasserbad (Daglef Platz, Wankendorf) gestreckt und auf geschliffene Objektträger (76 x 26 mm, Starfrost, Engelbrecht, Edermünde, Nr. 11250) aufgezogen. Zur Trocknung lagerten die Schnitte für mindestens 24 Stunden bei 40 °C in einem Wärmeschrank (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach).

3.3.1. Paraffinextraktion und Rehydrierung

Zur Extraktion des Paraffins wurden die Schnitte für 20 Minuten in Xylol (SAV LP, Flintsbach a. Inn) verbracht. Anschließend erfolgte die Rehydrierung durch kurzes Eintauchen der Schnitte in einer absteigenden Ethanolreihe: 2 x 100%ig, 2 x 96%ig, 1 x 70%ig (Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Offenbach a. Main) und in destilliertem Wasser.

3.3.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) der Paraffinschnitte

Für die histologische Untersuchung und morphometrischen Analysen wurden die Lymphknoten- und Nebennierenschnitte mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt:

Mayers Hämalaun (A0884, Applichem, Darmstadt)	5	Min.
Wässern in fließendem Leitungswasser	5	Min.
Eintauchen in 1%ige Eosin-Lösung (siehe Anhang 1.1.1.)	3-5	mal
Spülen mit destilliertem Wasser		
Dehydrierung:		
Destilliertes Wasser	2	Sek.
Ethanol 70%ig		
(Bundesmonopolverwaltung für Branntwein,		
Offenbach a. Main)	2	Sek.
Ethanol 96%ig	2	Sek.
Ethanol 100%ig	2	Sek.
Xylol (SAV LP, Flintsbach a. Inn), fraktioniert	1	Min.

Anschließend wurden die Schnitte mit Deckgläschen (Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig) und Histokitt (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim/Rhön) eingedeckt.

3.4. Kunststoffeinbettung und Schnittherstellung

Für histologische und morphometrische Analysen wurde je eine in zufälliger Orientierung aus den formalinfixierten Hautstanzen entnommene Lamelle (ca. 1 x 1 x 0,3 cm) orthogonal zur Hautoberfläche in Glycolmethacrylat und Methylmethacrylat (GMA/MMA) eingebettet (Hermanns et al., 1981; Colbatzky und Hermanns, 1987).

Die Hautproben wurden hierzu zunächst für 3 Stunden in Spüllösung (siehe Anhang 1.2.1.) verbracht.

In einem Gewebereinbettautomaten (Citadel 1000, Shandom GmbH, Frankfurt) erfolgte die weitere Prozessierung wie folgt:

Ethanol 30%ig

(Bundesmonopolverwaltung für Branntwein,

Offenbach a. Main)	2 x 1	Std.
Ethanol 56%ig	2 x 1	Std.
Ethanol 70%ig	2 x 1	Std.
Ethanol 96%ig	2	Std.
Ethanol 96%ig	2 x 3	Std.

Die Einbettung in Glycolmethacrylat und Methylmethacrylat (GMA/MMA) erfolgte unter Verwendung der nachfolgend aufgeführten Materialien:

Kunststoffmonomeregemisch (1:1) aus

2-Hydroxyethyl-Methacrylat und

Methylmethacrylat bei 4 °C auf einem Taumler

(Modell 4010, Köttermann, Hänigsen) 24 Std.

Lösung A (siehe Anhang 1.2.3.)

bei 4 °C auf einem Taumler 4 Std.

Die Polymerisation erfolgte über 24 Stunden in einem 4 °C kalten Wasserbad in mit 40 ml Lösung A und 60 µl N-N-Dimethylanilin (Nr. 803060, Merck, Darmstadt) beschickten Polyethylenausgussformen (LDPE mit Schnappdeckel, Diagonal, Münster).

Von den Kunststoffblöcken wurden mit einem Hartschnittmikrotom (Microm HM 360, Walldorf) ca. 1,5 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf einer Heizplatte (HPL-2, Kunz Instruments, Vallentuna, Schweden) getrocknet und über Nacht bei 64 °C in einem Wärmeschrank (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach) gelagert.

3.4.1. Hämatoxylin-Eosin-Phloxin Färbung der Kunststoffschritte

Die HE-Färbung der Kunststoffschritte erfolgte unter Verwendung der nachfolgend aufgeführten Materialien:

Mayers Hämalaun (Nr. 1.09249, Merck, Darmstadt)	5	Min.
Wässern in fließendem Leitungswasser	10	Min.
1%iges HCl-Ethanol (siehe Anhang 1.2.4.)	2	Sek.
Wässern in fließendem Leitungswasser	10	Min.
Heizplatte, 60°C (HPL-2, Kunz Instruments, Vallentuna, Schweden)	5	Min.
Eosin-Phloxin-Gebrauchslösung (siehe Anhang 1.2.5.)	20	Min.
Destilliertes Wasser	2 x 2	Sek.
Heizplatte (60°C)	2	Min.
Xylol (SAV LP, Flintsbach a. Inn)	2	Sek.

Anschließend wurden die Schnitte mit Deckgläschen (Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig) und Histokitt (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim/Rhön) eingedeckt.

3.4.2. Giemsa-Färbung der Kunststoffschnitte

Pro Tier und Lokalisation wurde je ein Kunststoffschnitt unter Verwendung der nachfolgend aufgeführten Materialien nach Giemsa gefärbt:

7%ige Giemsa Gebrauchslösung (siehe Anhang 1.2.6.)

bei 65 °C im Wasserbad	1,5	Std.
Phosphatpuffer (siehe Anhang 1.2.6.1.)	2	Sek.
0,5%ige Essigsäure (siehe Anhang 1.2.7.)	2 x 2	Sek.
Destilliertes Wasser	2	Sek.
Heizplatte, 60 °C (HPL-2, Kunz Instruments, Vallentuna, Schweden)	2	Min.
Xylol (SAV LP, Flintsbach a. Inn)	2	Sek.

Anschließend wurden die Schnitte mit Deckgläschen (Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig) und Histokitt (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim/Rhön) eingedeckt.

3.5. Eponieinbettung der Nebennierenrindenstanzproben

Für quantitativ-stereologische Analysen wurden die Nebennierenrindenstanzproben nach 48 Stunden Fixation in Glutaraldehyd (siehe Material und Methoden 3.2.1.) bei 8 °C mit Osmiumtetroxid (siehe Anhang 1.3.3.) nachfixiert (Caulfield, 1957), entwässert und in Epon (Glycidäther 100, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) unter Verwendung der im Anhang aufgeführten Materialien nach folgendem Schema eingebettet:

Waschen der Proben bei Raumtemperatur

in Sörensen Phosphat Puffer (siehe Anhang 1.3.2.) 3 Std.

Nachfixierung in 1%igem Osmiumtetroxid bei 4°C 2 Std.

Waschen der Proben bei Raumtemperatur

in Sörensen Phosphat Puffer (siehe Anhang 1.3.2.) 3 x 2 Min.

Entwässern bei 4°C in Aceton

(neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg)

50%ig, 2 x 70%ig, 2 x 90%ig je 10 Min.

3 x 100%ig je 10 Min.

Mischung (Verhältnis 1:1) aus 100%igem Aceton und

Epon-Einbettlösung (siehe Anhang 1.3.4) 1 Std.

Epon-Einbettlösung unverdünnt 2 x 30 Min.

Anschließend wurden die Proben zusammen mit der Einbettlösung in Gelatinekapseln (Plano GmbH, Wetzlar) überführt. Bei 60°C vollzog sich dann in diesen Kapseln innerhalb von 48 Stunden die Polymerisation.

3.5.1. Herstellung von seriellen Semidünnschnitten

Die Eponblöcke wurden mit einer Fräse (TM60, Reichert-Jung, Heidelberg) getrimmt. Von den Blöcken wurden danach mit einem Ultramikrotom (Ultracut, Reichert-Jung, Heidelberg) jeweils neun serielle Semidünnschnitte mit einer Schnittdicke von 0,5 µm angefertigt und in geordneter Folge auf je drei nummerierte Objektträger aufgezogen (Abbildung 12).

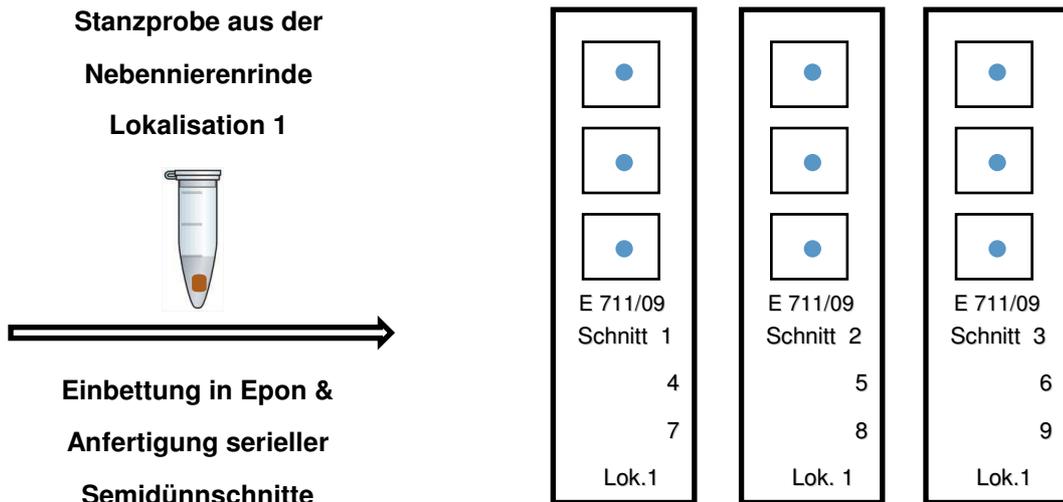


Abbildung 12: Schematische Darstellung von aus einer Probenlokalisation angefertigten 9 seriellen Semidünnschnitten in geordneter Folge auf nummerierten Objektträgern.

3.5.2. Toluidinblau-Safraninfärbung der Semidünnschnitte

Die Schnitte wurden unter der Verwendung der nachfolgend aufgeführten Materialien nach folgendem Schema gefärbt:

Auflösen des di-Natriumtetraborates in destilliertem Wasser, Hinzufügen von Toluidinblau. Nach 2 stündigem Schwenken der Lösung Hinzufügen des Formaldehyds. Vor Gebrauch Lösung filtrieren. Auflösen des di-Natriumtetraborates in destilliertem Wasser, Hinzufügen von Safranin O und Saccharose. Nach zweistündigem Schwenken der Lösung Hinzufügen des Formaldehyds. Lösung filtrieren.

Toluidinblau-Lösung

di-Natriumtetraborat (Nr. 106306, Merck, Darmstadt)	1,0	g
Destilliertes Wasser	100	ml
Toluidinblau (Nr. 36693, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)	1,0	g
37%iges Formaldehyd (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)	250	µl

Safranin O Lösung

di-Natriumtetraborat	1,0	g
Destilliertes Wasser	100	ml
Safranin O (1B-463, Waldeck GmbH & Co KG Division Chroma, Münster)	1,0	g
Saccharose (Nr. 107653, Merck, Darmstadt)	40,0	g
37%ig Formaldehyd (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)	250	µl

Die Schnitte wurden für 15-20 Sekunden in der auf einer 85°C warmen Heizplatte (HK 120, Reichert-Jung, Heidelberg) deponierten Toluidinblau-Lösung gefärbt und danach in destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden diese für 15 Sekunden bei 55°C mit Safranin O gegengefärbt, getrocknet und mit Deckgläschen (Menzel GmbH & Co. KG) und Histofluid® (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen) eingedeckelt.

4. Morphometrische und quantitativ-stereologische Analysen

4.1. Haut

4.1.1. Bestimmung der Dicke der Haut und ihrer Schichten

Die Bestimmung der Hautdicke und der Strata papillare und reticulare erfolgte an Ausdrucken von Fotografien der HE-gefärbten GMA/MMA-Schnitte jeder Probenlokalisierung. Die Fotos wurden in 16facher Vergrößerung (Photomakroskop (M 400, Wild, Heerbrugg, Schweiz) mit einer gekoppelten Kamera (Leica FireCam DFC 320, Leica Camera AG, Solms) aufgenommen. Die Auswertung der angefertigten Ausdrücke erfolgte an einem halbautomatischen Bildanalysesystem (Videoplan[®], Zeiss-Kontron, Eching).

Die Grenzen zwischen den einzelnen Hautschichten wurden für morphometrische Analysen wie folgt definiert (Abbildung 13):

Haut (a):	Stratum corneum der Epidermis bis Unterhautfettgewebe (Wanke et al., 1999)
Epidermis (b):	Stratum corneum der Epidermis bis Basalmembran der Epidermis (Schaaf, 1959; Heite und Ritter, 1962)
Stratum papillare (c):	Basalmembran der Epidermis bis tiefster Ansnchnittpunkt der Schweißdrüsen, die vorzugsweise in dieser Schicht auftreten (Holbrook und Wolff, 1987; König und Liebich, 1999; Weiss und Teifke, 2007)
Stratum reticulare (d):	Tiefster Punkt der Schweißdrüsenanschnitte bis Unterhautfettgewebe

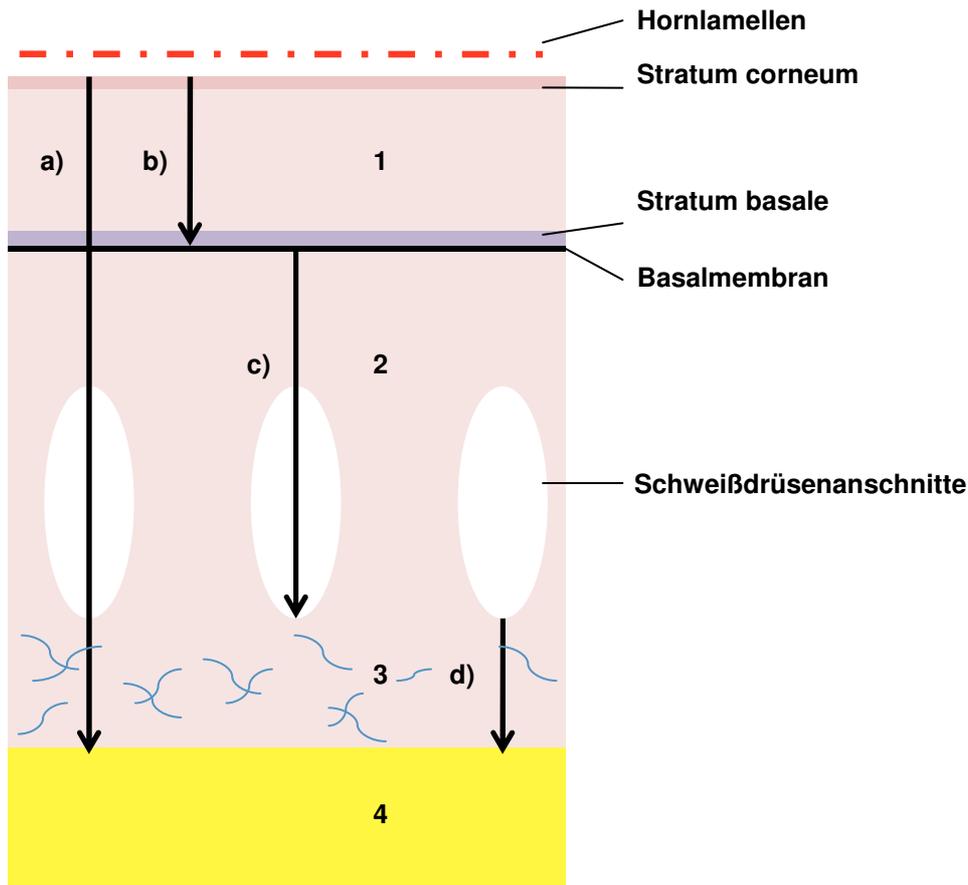


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Haut und ihrer Schichten (1 Epidermis, 2 Stratum papillare, 3 Stratum reticulare, 4 Unterhautfettgewebe) sowie der für die Dickenmessung der Schichten definierten Grenzen (a bis d, siehe Text).

Das Bildanalyse-System wurde anhand eines in gleicher Vergrößerung fotografierten und ausgedruckten Maßstabes kalibriert. Es wurden jeweils 4 Messungen der Dicke der Haut und der Strata papillare und reticulare vorgenommen. Die erste Messung erfolgte an einem zufällig gewählten Startpunkt der auf dem Digitalisierungstablett platzierten Fotokopie des GMA/MMA-Schnittes. Hierzu wurde eine Folie mit äquidistanten senkrechten Linien über die Fotokopie gelegt und die erste Messlokalisierung wie unter Material und Methoden Kapitel 2.2. beschrieben bestimmt. Die weiteren Messungen wurden in äquidistanten Abständen (im histologischen Schnitt 2500 µm entsprechend) vorgenommen.

Die Dickenmessung der Epidermis erfolgte an HE gefärbten GMA/MMA Schnitten sämtlicher Probenlokalisationen am Mikroskop des Bildanalysesystems. Nach Kalibrierung des Systems mit einem Objektmikrometer (Zeiss, Oberkochen) wurde das mikroskopische Bild des jeweiligen Gesichtsfeldes in 40facher Vergrößerung auf den Bildschirm übertragen. Die Messungen erfolgten interfollikulär, in äquidistanten Abständen (500 µm). Pro Schnitt wurden jeweils 11 ± 5 Messungen vorgenommen.

4.1.2. Bestimmung der Volumendichten der Hautschichten in der Haut

Die Bestimmung der Volumendichten der einzelnen Hautschichten in der Haut erfolgte an den ausgedruckten Fotografien der HE-gefärbten GMA/MMA-Schnitte der Hautproben (siehe Material und Methoden 4.1.1.). Mittels eines durchsichtigen Testpunkterasters (726 Punkte, Abstand: 0,5 cm) wurden die Volumendichten der einzelnen Hautschichten durch Punktzählung nach dem Prinzip von Delesse (Weibel, 1979) ermittelt:

$$V_V = A_A = P_P \quad \text{(Gleichung 2)}$$

V_V Volumendichte einer Struktur

A_A Flächendichte einer Struktur

P_P Punktdichte einer Struktur

$$V_{V(\text{Hautschicht X} / \text{Fläche Hautquerschnitt})} = \frac{\sum P_{(\text{Hautschicht X})}}{\sum P_{(\text{Hautquerschnitt})}}$$

X	Epidermis bzw. Stratum papillare bzw. Stratum reticulare
$V_{V(\text{Hautschicht X/Haut})}$	Volumendichte der Hautschicht X in der Haut
$\sum P_{\text{Hautschicht x}}$	Summe der auf die Hautschicht X fallenden Trefferpunkte
$\sum P_{\text{Haut}}$	Summe der auf die Hautprobe fallenden Trefferpunkte

Pro Hautprobe wurden durchschnittlich 110 ± 6 Trefferpunkte ausgewertet.

4.1.3. Bestimmung der numerischen Flächendichte eosinophiler Granulozyten und Mastzellen in den einzelnen Hautschichten

Die numerische Flächendichte eosinophiler Granulozyten beziehungsweise Mastzellen in den einzelnen Hautschichten (Epidermis, Stratum papillare und Stratum reticulare) wurde an Giemsa-gefärbten GMA/MMA-Schnitten der untersuchten Lokalisationen (Widerrist und Tarsus) bestimmt. Pro Tier wurden von jedem Schnitt (drei Proben aus dem Bereich des Widerristes, eine Probe aus dem Tarsusbereich) pro Hautschicht jeweils fünf mikroskopische Aufnahmen in 250facher Vergrößerung (Mikroskop: Orthoplan, Leitz; Kamera: Leica FireCam DFC 320, Leica Camera AG, Solms) in systematisch zufällig ausgewählten Lokalisationen angefertigt.

In den untersuchten Schnitten trafen bei dieser Vergrößerung durchschnittlich 50 Gesichtsfelder auf die Epidermis, 450 auf das Stratum papillare und 450 auf das Stratum reticulare. Bei fünf auszuwertenden Lokalisationen pro Hautschicht wurde, nach Auswahl des ersten auszuwertenden Gesichtsfeldes der betreffenden Hautschicht mittels einer Zufallszahlentabelle (Stattek, 2009) entnommenen Zufallszahl zwischen 1 und 10 beziehungsweise 90, systematisch jedes weitere zehnte die Epidermis beziehungsweise jedes neunzigste das Stratum papillare beziehungsweise reticulare treffende Gesichtsfeld fotografiert. Bei fünf Gesichtsfeldern pro Hautschicht pro Lokalisation pro Tier wurden insgesamt (5 Gesichtsfelder x 3 Hautschichten x 4 Lokalisationen x 36 Tiere) 2160 Aufnahmen angefertigt und ausgewertet. In den Aufnahmen wurden die innerhalb eines erwartungstreuen Testfeldes (Fläche von 59635 μm^2) mit erlaubten und verbotenen Linien (Gundersen, 1977) liegenden Kernanschnitte eosinophiler Granulozyten beziehungsweise Mastzellen gezählt (Abbildung 14 A & B). Intravasal gelegene Entzündungszellkerne wurden dabei nicht gezählt. Die innerhalb des Testfeldes liegende Anschnittsfläche der entsprechenden Hautschicht (Referenzkompartimente: Epidermis, Stratum papillare beziehungsweise Stratum reticulare) wurde durch Punktzählung unter Verwendung eines Testpunktrasters mit 192 Testpunkten (310 μm^2 pro Punkt) (Abbildung 14 A) über Gleichung 3 ermittelt.

$$A_{(\text{Referenzkompartiment})} = \sum P_{(\text{Referenzkompartiment})} \times A_P \quad (\text{Gleichung 3})$$

$A_{(\text{Referenzkompartiment})}$	Fläche des Referenzkompartiments im Testfeld
$\sum P_{(\text{Referenzkompartiment})}$	Summe der im Referenzkompartiment liegenden Trefferpunkte
A_P	einem Punkt des Punktrasters entsprechende Fläche (310 μm^2)

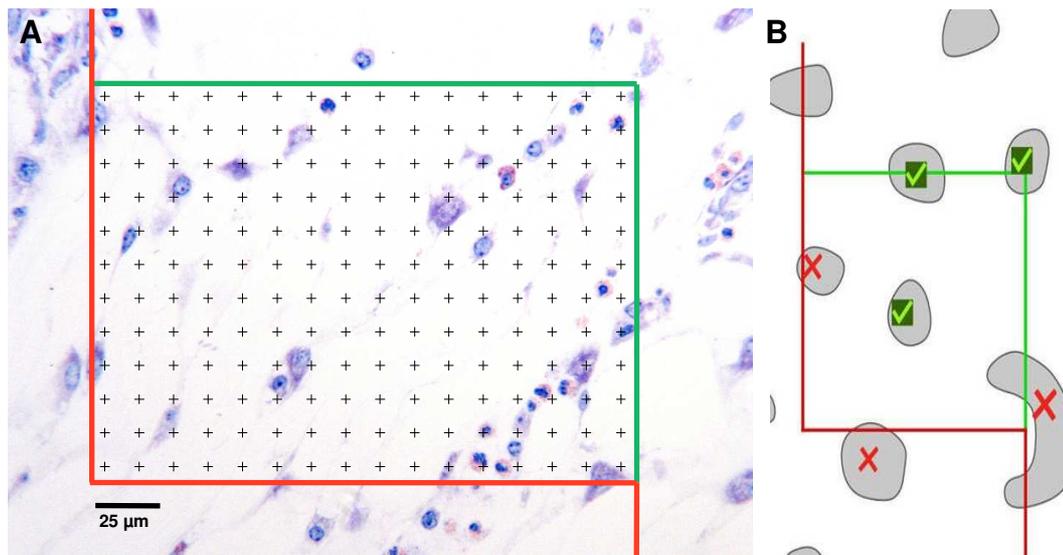


Abbildung 14: Bestimmung der numerischen Flächendichte eosinophiler Granulozyten bzw. Mastzellen in einzelnen Hautschichten.

A) Aufnahme aus dem Stratum reticulare der Haut am Widerrist eines Tieres der unbehandelten Gruppe mit erwartungstreuem Testfeld mit verbotenen (roten) und erlaubten (grünen) Linien und 192 Punkten. GMA/MMA-Schnitt, Giemsa-Färbung.

B) Innerhalb des Testfeldes liegende, bzw. lediglich eine der erlaubten (grünen) Linien berührende Kernanschnitte eosinophiler Granulozyten bzw. Mastzellen werden gezählt. Kernanschnitte eosinophiler Granulozyten bzw. Mastzellen, welche eine der verbotenen (roten) Linien berühren, werden nicht gezählt.

Die numerische Flächendichte (Weibel und Gomez, 1962; Weibel et al., 1966; Gundersen, 1977, 1978) eosinophiler Granulozyten beziehungsweise Mastzellen pro Hautschicht wurde wie in Gleichung 4 dargestellt berechnet.

$$N_{A \text{ eos. Gran. bzw. Mastz. / Hautschicht}} = \frac{\sum_{i=1}^n Q(Z)_i}{\sum_{i=1}^n A_i} \quad (\text{Gleichung 4})$$

$N_{A \text{ eos. Gran. bzw. Mastz. / Hautschicht}}$ Numerische Flächendichte eosinophiler Granulozyten (eos. Gran.) bzw. Mastzellen (Mastz.) in der entsprechenden Hautschicht

n Anzahl der pro Tier untersuchten Testfelder

$Q(Z)_i$ Summe der in sämtlichen Testfeldern eines Tieres gezählten Kernanschnittsprofile eosinophiler Granulozyten bzw. Mastzellen

A_i Summe der in sämtlichen Testfeldern eines Tieres ermittelten Flächen der jeweiligen Hautschichten (Epidermis, Stratum papillare bzw. Stratum reticulare)

4.2. Lymphknoten

4.2.1. Bestimmung der Volumendichten von Keimzentren, sonstigen lymphatischen und nichtlymphatischen Geweben im Lymphknoten

Die Bestimmung der Volumenanteile von Keimzentren sowie lymphatischen (Follikel, parafollikuläre Areale, Markstränge) und nichtlymphatischen Kompartimenten (Trabekel, Gefäße, retikuläres Bindegewebe) am Lymphknoten erfolgte durch Punktzählung an HE-gefärbten Paraffinschnitten (siehe Material und Methoden 4.1.2.). Im Rahmen einer Voruntersuchung wurde zur Ermittlung der unter Berücksichtigung des zu erwartenden relativen Standardfehlers von 5 % bei der Punktzählung auszuwertenden Trefferpunkte (Weibel, 1979), die Volumendichte der Keimzentren (als Kompartiment mit dem geringsten Volumenanteil) im Lymphknoten mittels Punktzählung geschätzt. Die Anzahl der bei der Punktzählung auszuwertenden Trefferpunkte (~3000) wurde, unter Berücksichtigung der in einem Vorversuch ermittelten Volumendichte der Keimzentren im Lymphknoten (ca. 0,03), einem Nomogramm (Weibel, 1979) entnommen.

Sämtliche Lymphknotenschnitte wurden mit einer an einem Photomakroskop (M 400, Wild, Heerbrugg, Schweiz) angeschlossenen Kamera (Leica FireCam DFC 320, Leica Camera AG, Solms) in 32facher Vergrößerung fotografiert und digital gespeichert. Für die Punktzählung wurde ein Raster mit 3600 Testpunkten (Abstand 4 mm) verwendet. Pro Lymphknoten wurden durchschnittlich 2681 ± 534 Trefferpunkte ausgewertet.

Die Berechnung der Volumenanteile der lymphatischen und nichtlymphatischen Gewebe sowie der Keimzentren am Buglymphknoten erfolgte wie unter Material und Methoden Kapitel 4.1.2. beschrieben in einem konventionellen Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft® Excel® 2007).

4.2.2. Bestimmung der Volumina der Keimzentren sowie sonstiger lymphatischer und nichtlymphatischer Lymphknotenkompartimente

Die Volumina der Keimzentren, sonstiger lymphatischer und nichtlymphatischer Lymphknotenkompartimente wurden als Produkt der Volumendichte des jeweiligen Kompartimentes im Lymphknoten und dem Volumen (siehe Material und Methoden 2.1.1. und 2.1.2.) des Lymphknotens berechnet (Gleichung 5).

$$V_{(y, \text{Lymphknoten})} = V_{V(y/ \text{Lymphknoten})} \times V_{(\text{Lymphknoten})} \quad (\text{Gleichung 5})$$

y	Lymphknotenkompartiment (Keimzentren, sonstige lymphatische bzw. nichtlymphatische Gewebe)
$V_{(y, \text{Lymphknoten})}$	Volumen des Kompartimentes y im Lymphknoten
$V_{V(y/ \text{Lymphknoten})}$	Volumendichte des Kompartimentes y im Lymphknoten
$V_{(\text{Lymphknoten})}$	Volumen des Lymphknotens

4.3. Nebenniere

4.3.1. Bestimmung der Volumendichten der Nebennierenrindenzonen und des Nebennierenmarkes

Die Volumendichten der Zona glomerulosa sowie der Zona fasciculata und Zona reticularis und des Nebennierenmarkes in der rechten Nebenniere erfolgte wie in Material und Methoden Kapitel 4.1.2. beschrieben an HE-gefärbten Paraffinschnitten durch Punktzählung unter Verwendung eines Testpunktrasters mit 900 Testpunkten (Abstand 6 mm). Pro Nebenniere wurden durchschnittlich 797 ± 302 Trefferpunkte ausgewertet.

Dazu wurde ein Schnitt jeder zweiten Scheibe der lamellierten rechten Nebenniere mit der an dem Photomakroskop (M 400, Wild, Heerbrugg, Schweiz) angeschlossenen Kamera (Leica FireCam DFC 320, Leica Camera AG, Solms) in 7facher Vergrößerung digital fotografiert.

Aufgrund der indistinkten Grenze zwischen der Zona fasciculata und der Zona reticularis wurden diese zusammen ausgewertet und werden im Folgenden als Zona fasciculata bezeichnet (Hoeflich et al., 2002).

In gleicher Weise wurden die entsprechenden Volumendichten der Zona glomerulosa, der Zona fasciculata und des Markes in der Nebenniere zusätzlich an Schnittpräparaten von je drei systematisch zufällig ausgewählten Lamellen der linken Nebenniere von allen vier Kontrolltieren sowie von jeweils vier zufällig ausgewählten Tieren der behandelten Gruppe und der unbehandelten Gruppe ermittelt. Zwischen den Werten der für die rechten und linken Nebennieren ermittelten Volumendichten der Zona glomerulosa, der Zona fasciculata und des Markes in den Nebennieren bestanden innerhalb der jeweiligen Untersuchungsgruppen keine signifikanten Unterschiede.

4.3.2. Bestimmung der Volumina der Nebennierenzonen und des Nebennierenmarkes in der Nebenniere

Die Volumina der Zona glomerulosa, der Zona fasciculata sowie des Nebennierenmarkes der Nebenniere wurden als das Produkt der jeweiligen Volumendichte des betreffenden Nebennierenkompartimentes (siehe Material und Methoden 4.1.2.) und dem Volumen der Nebennieren (siehe Material und Methoden 2.3.) berechnet (Hoeflich et al., 2002) (Gleichung 6).

$$V_{(y, \text{Nebennieren})} = V_V(y/\text{Nebenniere}) \times V_{(\text{Nebennieren})} \quad (\text{Gleichung 6})$$

y	Nebennierenkompartiment (Zona glomerulosa, Zona fasciculata bzw. Nebennierenmark)
V_(y, Nebennieren)	Volumen des Kompartimentes y in den Nebennieren
V_{V(y/Nebenniere)}	Volumendichte des Kompartimentes y in der (rechten) Nebenniere
V_(Nebennieren)	Volumen der Nebennieren

4.3.3. Bestimmung des mittleren Zellvolumens und der Anzahl der Zona fasciculata-Zellen in der Nebennierenrinde

Das mittlere Zellvolumen (siehe Material und Methoden 4.3.7.) und die Anzahl der Zona fasciculata-Zellen (siehe Material und Methoden 4.3.8.) in der rechten Nebenniere wurden mit der Disektormethode, im Fall der Zellvolumenbestimmung in Kombination mit dem Punktzählverfahren, modellfrei bestimmt (Hoeflich et al., 2002).

Die numerische Volumendichte der Zona fasciculata-Zellen in der Zona fasciculata der rechten Nebennierenrinde wurde stereologisch mithilfe der Methode des physikalischen Disektors ermittelt.

4.3.4. Prinzip des physikalischen Disektors

Der Disektor, bestehend aus einem Testfeld mit bekannter Fläche auf einer Ausgangsebene und einer parallel dazu angeordneten Vergleichsebene, stellt ein dreidimensionales Testsystem mit bekanntem Volumen dar. Das Disektorvolumen errechnet sich als das Produkt der Testfeldfläche und der Disektorhöhe (= Distanz zwischen Ausgangs- und Vergleichsebene) (Sterio, 1984; Gundersen, 1986).

Gezählt werden, unabhängig von Größe oder Gestalt, Partikel (Zellkernanschnitte), deren Profile durch das Testfeld auf der Ausgangsebene erfasst und die von der Vergleichsebene nicht geschnitten werden. Die so gezählten Partikel werden gemäß der standardisierten Nomenklatur (Weibel, 1979; Oberholzer, 1983; Gundersen, 1986; Mattfeldt, 1990) mit dem stereologischen Symbol Q^- bezeichnet, wobei das hochgestellte Minuszeichen das Verschwinden der Partikelprofile zum Ausdruck bringt. Die numerische Volumendichte der entsprechenden Partikel errechnet sich aus der Anzahl der gezählten Profile dividiert durch das Disektorvolumen.

4.3.5. Bestimmung der orthogonalen Linearprojektion der Zona fasciculata-Zellkerne

Die Bestimmung der orthogonalen Linearprojektion der Zona fasciculata-Zellen diente der Ermittlung der notwendigen Disektorhöhe. Bedingung für die Anwendbarkeit der physikalischen Disektor-Methode ist, dass der Abstand zwischen den Auswertungsebenen (=Disektorhöhe) nicht größer als die minimale orthogonale Linearprojektion („Höhe“) der zu erfassenden Zellkerne ist (Sterio, 1984; Gundersen et al., 1988b; Mattfeldt, 1990).

Zur Bestimmung der Disektorhöhe wurden von den seriellen, Toluidinblau-Safranin-gefärbten Semidünnschnitten der Nebennierenstanzproben je ein Schnitt eines behandelten und eines unbehandelten Tieres zufällig ausgewählt. Die Messung der, für die Disektorhöhe relevanten orthogonalen Linearprojektion der Zona fasciculata-Zellkerne erfolgte an einem halbautomatischen Bildanalyzesystem (Videoplan[®], Zeiss-Kontron, Eching). Nach Kalibrierung des Systems mittels eines Objektmikrometers (Zeiss, Oberkochen) wurde der minimale Kerndurchmesser von durchschnittlich 75 Zona fasciculata-Zellkernen pro Tier bei 1000facher Vergrößerung (Ölimmersion) gemessen. Der Mittelwert betrug bei dem behandelten Tier $5,1 \pm 1,0 \mu\text{m}$ beziehungsweise $5,2 \pm 1,1 \mu\text{m}$ bei dem unbehandelten Tier.

4.3.6. Bestimmung der numerischen Volumendichte der Zona fasciculata-Zellen der Nebennierenrinde

Die Bestimmung der numerischen Volumendichte der Zona fasciculata-Zellen in der Zona fasciculata der rechten Nebenniere erfolgte mittels des Disektor-Prinzips an seriellen toluidinblau-gefärbten Semidünnschnitten. Die Auswertung der Disektoren erfolgte an einem computerassistierten, automatisierten Stereologiesystem (bestehend aus einem Systemmikroskop (Olympus BX 41, Tokio, Japan) mit gekoppelter, automatisch fokussierender (Motorized Focus Drive, MFD, Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG, Wetzlar) Videokamera (Olympus DP 72, Tokio, Japan), einer Tischsteuerung (M-SC-DT-3-Tischsteuerung, Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG, Wetzlar), sowie einem Rechner (K & R Computersysteme, München) mit zwei Flachbildmonitoren (HP LP 2065 20“-LCD-Monitor, Palo Alto, USA) und der installierten Software newCAST™ (Computer Assisted Stereological Toolbox, Visiopharm, Hoersholm, Dänemark).

Aus den neun seriellen Semidünnschnitten pro Tier und Lokalisation wurde anhand einer, einer Zufallszahlentabelle (Stattek, 2009) entnommenen Zufallszahl je ein Schnitt X als Ausgangsschnitt ausgewählt, wobei der erste Schnitt jeder Schnittserie dabei grundsätzlich nicht genutzt wurde (Walker et al., 1992). Der jeweilige Schnitt X+3 der Schnittserie diente als Vergleichsschnitt (Hoeflich et al., 2002). Die Höhe des physikalischen Disektors betrug somit 1,5 µm, entsprechend der Gesamtdicke von 3 Semidünnschnitten einer Schnittdicke von 0,5 µm.

Durch das Stereologiesystem wurden im Ausgangsschnitt systematisch zufällig Testfelder ausgewählt und ihre korrespondierenden Lokalisationen im Vergleichsschnitt aufgesucht. Ausgewählte (Ausgangsebene) und korrespondierende (Vergleichsebene) Lokalisationen wurden dann in 400facher Vergrößerung digital fotografiert (Abbildung 15).

In jedem Bildpaar wurden alle Q^- (Zellkerne der Zona fasciculata-Zellen, die in Schnitt X, jedoch nicht mehr in Schnitt X+3 präsent waren), gezählt. In einem zweiten Durchgang wurden die Rollen der Vergleichsebene und der Ausgangsebene vertauscht (Abbildung 15). Da ein Zellkern nicht gleichzeitig an – und abwesend sein kann, wurden daher jeweils unterschiedliche Kerne erfasst und somit die Effizienz des Verfahrens verdoppelt (Gundersen, 1986; Wanke, 1996). Pro Tier wurden in jeweils 16 Disektoren (8 Bildpaare) durchschnittlich $80 \pm 35 Q^-$ (Kerne) gezählt.

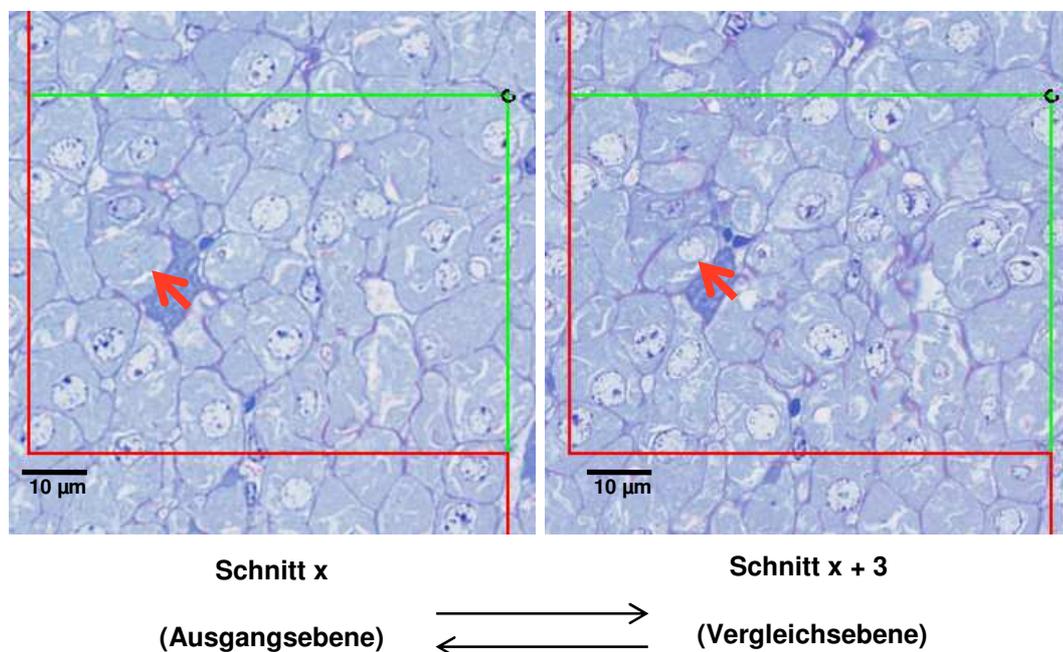


Abbildung 15: Zona fasciculata der rechten Nebenniere (unbehandeltes Tier), Bildpaar eines repräsentativen Disektors, Abstand zwischen Schnitt x und x + 3 (= Disektorhöhe): 1,5 µm. (Bi)direktionales Zählen von Q^- , hier angedeutet für jeweils einen Kern, der in der Ausgangsebene präsent und in der Vergleichsebene abwesend ist (Pfeile). Epon, Toluidinblau-Safraninfärbung.

Der stereologische Schätzwert für die Anzahl der Zona fasciculata-Zellen pro Volumeneinheit Zona fasciculata der rechten Nebenniere wurde anhand der Anzahl gezählter Q^- und des kumulativen Volumens der pro Tier analysierten Disektoren (Hoeflich et al., 2002) über die folgende Gleichung 7 (Sterio, 1984) ermittelt:

$$\hat{N}_{V(Z. fasc.-Zellen/Z. fasc.)} = \frac{\sum_{i=1}^n Q^-(Z)_i}{h \times \sum_{i=1}^n A(Z. fasc.)_i} \quad (\text{Gleichung 7})$$

$\hat{N}_{V(Z. fasc.-Zellen/Z. fasc.)}$	Stereologischer Schätzwert für die numerische Volumendichte der Zona fasciculata-Zellen in der Zona fasciculata der rechten Nebenniere vor Einbettung
$Q^-(Z)_i$	Anzahl der gezählten Q^- im Disektor i
h	Distanz zwischen der Ausgangs- und Vergleichsebene (Disektorhöhe)
n	Anzahl der pro Tier ausgewerteten Disektoren
$A(Z. fasc.)_i$	Durch das Testfeld definierte Fläche der Zona fasciculata im Disektor i

Dem Phänomen der Einbettungsschrumpfung (Haug, 1980; Oberholzer, 1983; Wanke et al., 1994; Wanke, 1996) Rechnung tragend, wurde eine Korrektur stereologischer Daten anhand des linearen Schrumpfungsfaktors f_s (Weibel, 1979; Wanke, 1996) angestrebt. Dieser Parameter wurde anhand der Flächeninhalte von je drei Stanzproben aus der Nebennierenrinde der rechten Nebenniere von je 3 zufällig ausgewählten Tieren jeder Gruppe (siehe Material und Methoden 3.2.1.) vor Einbettung (A) und der Flächeninhalte der korrespondierenden histologischen Präparate (A_s) über die folgende Gleichung bestimmt (Mattfeldt, 1990).

$$f_s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n A_{i(s)}}{\sum_{i=1}^n A_i}} \quad (\text{Gleichung 8})$$

f_s	linearer Schrumpfungsfaktor
$A_{i(s)}$	Flächeninhalt des histologischen Schnittes der i-ten Stanzprobe
A_i	Flächeninhalt der i-ten Stanzprobe im fixierten Zustand vor der Einbettung
n	Anzahl der Stanzproben pro Tier

Dazu wurden die runden Grundflächen der zylinderförmigen Proben mit einer an einem Photomakroskop (M 400, Wild, Heerbrugg, Schweiz) angeschlossenen Kamera (Leica FireCam) unter 32facher Vergrößerung digital fotografiert.

In gleicher Vergrößerung erfolgte die Aufnahme eines Objektmikrometers (Zeiss, Oberkochen). Um die aufgenommenen Grundflächen später identifizieren zu können, wurden die jeweils nicht fotografierten, gegenüberliegenden Grundflächen keilförmig zugeschnitten und die Proben danach in mit 6,25%ige Glutaraldehydlösung und Sörensen Phosphatpuffer (siehe Anhang 1.3.1. und 1.3.2.) beschickte Reaktionsgefäße verbracht. Nach Einbettung in Epon wurde von jeder Probe das erste vollständige histologische Schnittpräparat unter den oben beschriebenen Konditionen fotografiert. Die Flächeninhalte vor und nach Einbettung wurden an Ausdrucken der jeweiligen Probenfotos mittels eines Bildanalyse-Systems (Videoplan[®], Zeiss-Kontron, Eching) planimetrisch bestimmt.

Für den linearen Schrumpfungsfaktor bei Epon-Einbettung ergab sich ein Gesamtmittelwert von $f_s = 0,81 \pm 0,06$. Dieser Wert impliziert eine lineare Schrumpfung von 19% beziehungsweise einen Volumenschwund von 47%.

Da zwischen den Gruppen keine Unterschiede bezüglich der Einbettungsschrumpfung feststellbar waren, wurde der Durchschnittswert $f_s = 0,81$ einheitlich zur Korrektur der an den seriellen Semidünnschnitten erhobenen stereologischen Daten verwendet.

Die für die Einbettungsschrumpfung korrigierte numerische Volumendichte der Zona fasciculata-Zellen in der Zona fasciculata wurde anhand Gleichung 9 berechnet:

$$\hat{N}_V(Z.\text{fasc.}-\text{Zellen}/Z.\text{fasc.}) = \hat{N}_V(Z.\text{fasc.}-\text{Zellen}/Z.\text{fasc.})(s) \times fs^3 \quad (\text{Gleichung 9})$$

$\hat{N}_V(Z.\text{fasc.}-\text{Zellen}/Z.\text{fasc.})$ Stereologisch geschätzte numerische Volumendichte der Zona fasciculata-Zellen in der Zona fasciculata der rechten Nebenniere vor Einbettung

$\hat{N}_V(Z.\text{fasc.}-\text{Zellen}/Z.\text{fasc.})(s)$ Stereologisch geschätzte numerische Volumendichte der Zona fasciculata-Zellen in der Zona fasciculata der rechten Nebenniere bezogen auf eingebettetes Gewebe

fs linearer Schrumpfungsfaktor

4.3.7. Bestimmung des mittleren Zellvolumens der Zona fasciculata-Zellen

Die Bestimmung des mittleren Zellvolumens der Zona fasciculata-Zellen der rechten Nebenniere erfolgte an Fotografien der Toluidinblau-gefärbten Semidünnschnitte der Stanzproben aus der Rinde der rechten Nebenniere. Anhand eines durch das Stereologiesystem automatisch über den Fotografien projizierten erwartungstreuen Testfeldes (Gundersen, 1977) mit 24 ± 8 zufällig verteilten Testpunkten (Abbildung 16) wurde die Volumendichte der Zona fasciculata-Zellen in der Zona fasciculata der rechten Nebennierenrinde durch Punktzählung (Hoeflich et al., 2002) über Gleichung 10 bestimmt.

$$V_{V(\text{Z. fasc.-Zellen/Z. fasc.})} = \frac{\sum P(\text{Z. fasc.-Zellen})}{\sum P(\text{Z. fasc.})} \quad (\text{Gleichung 10})$$

$V_{V(\text{Z. fasc.-Zellen/Z. fasc.})}$ Stereologisch geschätzte mittlere Volumendichte der Zona fasciculata-Zellen in der Zona fasciculata der rechten Nebenniere

$\sum P(\text{Z. fasc.-Zellen})$ Summe der Trefferpunkte auf Zona fasciculata-Zellen

$\sum P(\text{Z. fasc.})$ Summe der Trefferpunkte auf Zona fasciculata

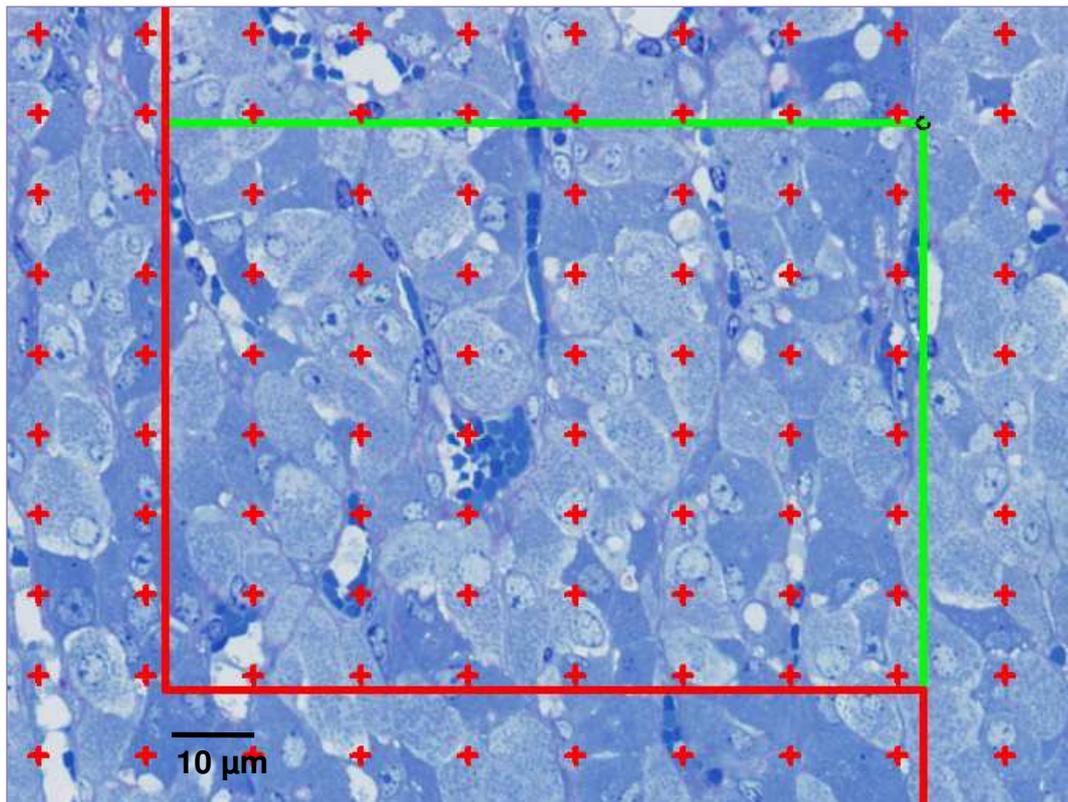


Abbildung 16: Repräsentative Aufnahme der Zona fasciculata der rechten Nebenniere (unbehandeltes Tier) mit erwartungstremem Testfeld und Testpunkttraster zur Bestimmung der Volumendichte der Zona fasciculata-Zellen in der Zona fasciculata der rechten Nebenniere. Semidünnschnitt, Epon, Toluidinblau-Safraninfärbung.

Das mittlere Volumen der Zona fasciculata-Zellen wurde für jedes Tier anhand Gleichung 11 berechnet:

$$V_{(Z. fasc.-Zellen)} = \frac{V_{V(Z. fasc.-Zellen/Z. fasc.)}}{\hat{N}_{V(Z. fasc.-Zellen / Z. fasc.)}} \quad (\text{Gleichung 11})$$

$V_{(Z. fasc.-Zellen)}$	Stereologisch geschätztes mittleres Volumen der Zona fasciculata-Zellen
$V_{V(Z. fasc.-Zellen/Z. fasc.)}$	Stereologisch geschätzter Volumenanteil der Zona fasciculata-Zellen an der Zona fasciculata der rechten Nebenniere
$\hat{N}_{V(Z. fasc. - Zellen / Z. fasc.)}$	Stereologisch geschätzte numerische Volumendichte der Zona fasciculata-Zellen in der Zona fasciculata der rechten Nebenniere vor Einbettung

4.3.8. Bestimmung der Anzahl der Zona fasciculata-Zellen in der Nebennierenrinde

Die Gesamtzahl der Zona-fasciculata-Zellen in beiden Nebennieren wurde als das Produkt der in der rechten Nebennierenrinde ermittelten numerischen Volumendichte der Zona fasciculata-Zellen in der Zona fasciculata und dem Gesamtvolumen der Zona fasciculata beider Nebennieren berechnet (Gleichung 12). Da sich innerhalb der jeweiligen Untersuchungsgruppen die Volumendichten der Zona fasciculata in der Nebenniere in der rechten und linken Nebenniere nicht signifikant voneinander unterscheiden (siehe Material und Methoden, Kapitel 4.3.1.), wurden die für die rechten Nebennieren ermittelten Volumendichten der Zona fasciculata in der Nebenniere zur Berechnung des Gesamtvolumens der Zona fasciculata in beiden Nebennieren verwendet.

$$\hat{N}_{(Z. \text{ fasc.-Zellen, Z. fasc.})} = \hat{N}_{V(Z. \text{ fasc.-Zellen/Z. fasc.})} \times V_{(Z. \text{ fasc., NN})} \quad (\text{Gleichung 12})$$

$\hat{N}_{(Z. \text{ fasc.-Zellen, Z. fasc.})}$ Stereologisch geschätzte Anzahl der Zona fasciculata-Zellen in der Zona fasciculata beider Nebennieren vor Einbettung

$\hat{N}_{V(Z. \text{ fasc.-Zellen/Z. fasc.})}$ Stereologisch geschätzte numerische Volumendichte der Zona fasciculata-Zellen in der Zona fasciculata der rechten Nebenniere vor Einbettung

$V_{(Z. \text{ fasc., NN})}$ Gesamtvolumen der Zona fasciculata beider Nebennieren

4.3.9. Überprüfung der nominellen Schnittdicke der Semidünnschnitte

Zur Überprüfung der nominellen Schnittdicke (Gundersen, 1986; Wanke, 1996) der Semidünnschnitte wurden vier den Schnittserien entnommene Präparate erneut in Epon eingebettet und nach Zielpräparation orthogonal ultradünn (ca. 70 nm) an einem Ultramikrotom (Ultracut E, ehemals Reichert-Jung, Heidelberg) geschnitten. Die auf Formvar-beschichteten Kupfer-Ringen (Grids, Storck Veco BV, Eerbeek, Niederlande) aufgezogenen Schnitte wurden danach wie folgt kontrastiert:

Uranylacetat 2% (siehe Anhang 1.3.5.) 30 Min.

Spülung mit destilliertem Wasser

Trocknung

Bleicitratkontrastierung (siehe Anhang 1.3.6.)

nach Reynolds (1963) 10 Min.

Spülung mit destilliertem Wasser

Trocknung

An einem Elektronenmikroskop (Zeiss EM 10, Oberkochen) wurden die Ultradünnschnitte betrachtet und Aufnahmen senkrecht getroffener Abschnitte (Oberholzer, 1983; Wanke, 1996) angefertigt. Die Schnittdickenmessung der wieder eingebetteten Semidünnschnitte erfolgte bei 10000facher Endvergrößerung. Bilder eines Eichkreuzgitters (2160 Striche pro mm, Plano, Marburg) dienten als Maßstab. Insgesamt wurden 48 Messungen an 24 wieder eingebetteten Schnitten durchgeführt. Die mittlere Schnittdicke betrug $0,5 \pm 0,03 \mu\text{m}$. Zur Berechnung von Anzahl und mittlerem Volumen der Zona fasciculata-Zellen mittels des physikalischen Disektors wurde einheitlich ein Wert der Schnittdicke von $0,5 \mu\text{m}$ verwendet.

5. Statistische Berechnungen

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Graphpad Prism 5, Version 5.02 (Graphpad Software, San Diego, USA). Körpergewichtsparameter wurden mit einem zweiseitigen Student-t-Test, die erhobenen morphometrischen und stereologischen Daten mittels eines One-way Analysis of Variance (ANOVA)- und eines Tukey's Multiple Comparison Tests verglichen. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde dabei als signifikant gewertet. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Graphen (Graphpad Prism 5) zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen.

IV. Ergebnisse

1. Milbenzahlen

Die akarizide Behandlung bewirkte eine vollständige Tilgung der Milbenlast. Bei einem behandelten Tier der ersten Versuchsgruppe wurde am Tag 21 (nach Behandlung) noch eine lebende Milbe gefunden; in der zweiten Versuchsgruppe waren Milben bei den behandelten Tieren ab der zweiten Woche nach der Behandlung nicht mehr nachweisbar. Abbildung 9 zeigt die an den indizierten Versuchstagen in Hautgeschabseln ermittelten Milbenzahlen der beiden Therapiestudien.

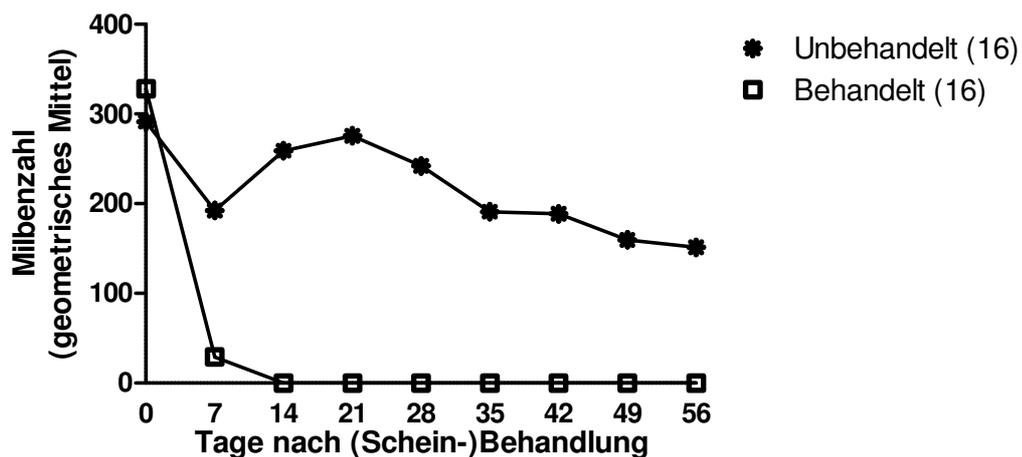


Abbildung 9: Milbenzahl (geometrisches Mittel) in Hautgeschabseln an indizierten Versuchstagen; Tag 0 = Tag der Behandlung, Tag 56 = Tag der Schlachtung.

2. Körpergewichtsentwicklung zwischen Tag 0 und 56

Zum Zeitpunkt der Behandlung (Tag 0) waren die infizierten Tiere nahezu gleich schwer (behandelt: 232 ± 16 kg; unbehandelt: 232 ± 15 kg).

Bis zur Schlachtung (Tag 56) zeigten die Tiere der behandelten Gruppe signifikant ($p=0,0003$), durchschnittlich 55% höhere Gewichtszunahmen gegenüber den unbehandelten Tieren (behandelt: 43 ± 8 kg; unbehandelt: 28 ± 12 kg). Zum Versuchsende betrug das signifikant ($p=0,03$) höhere Gewicht der behandelten Tiere 275 ± 19 kg gegenüber 259 ± 20 kg der unbehandelten Tiere (Abbildung 10).

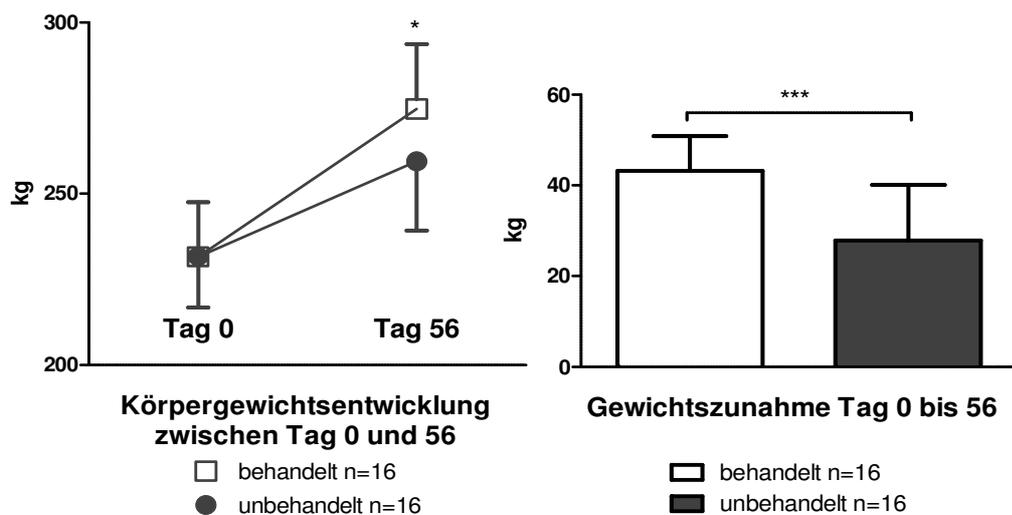


Abbildung 10: Körpergewichtsentwicklung und absolute Gewichtszunahme der behandelten beziehungsweise unbehandelten Gruppe im Beobachtungszeitraum (Tag 0 bis Tag 56), Mittelwerte \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Student-t-Test

3. Physikalische Messgrößen

3.1. Gewichte, spezifisches Gewicht und Volumina der Buglymphknoten

Die Buglymphknoten der unbehandelten Tiere waren makroskopisch deutlich größer als die der behandelten Tiere und die der Kontrolltiere (Abbildung 11 und 12).



Abbildung 11: Repräsentative Buglymphknoten der Kontrollgruppe sowie be- und unbehaltener Tiere.



Abbildung 12 (vorherige Seite): Größenvergleich der Buglymphknoten infizierter behandelter und unbehandelter Tiere eines Infektionsversuches

Durch Verdrängung von isotonischer Kochsalzlösung wurde das spezifische Gewicht der Buglymphknoten mit $1,11 \text{ g/cm}^3$ bestimmt.

Die Gewichte wie auch die Volumina der Buglymphknoten unbehandelter Tiere waren signifikant ($p < 0,0001$) schwerer beziehungsweise größer als die der behandelten Tiere und die der Kontrolltiere. Zwischen den Buglymphknoten der behandelten und der Kontrolltiere bestand kein signifikanter Gewichts- und Volumenunterschied (Abbildung 13).

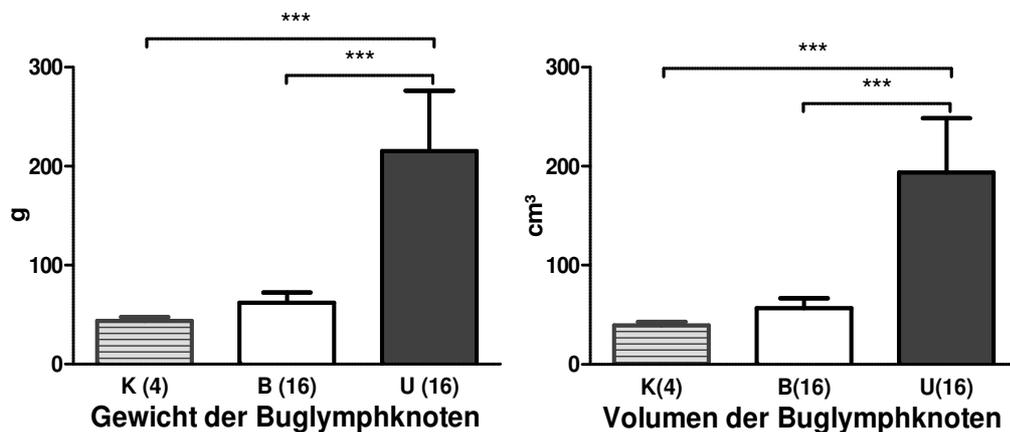


Abbildung 13: Gewichte und Volumen der Buglymphknoten der Kontrolltiere sowie der be- und unbehandelten Tiere (K = Kontrolle, B = Behandelt, U = Unbehandelt, Gruppengröße in Klammern), Mittelwerte \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, 1way-ANOVA, Post-Test: Tukey's Multiple Comparison Test.

3.2. Gewichte, spezifisches Gewicht und Volumina der Nebennieren

Die Nebennieren der Kontroll-, sowie der be- und unbehandelten Gruppe zeigten makroskopisch keinen deutlichen Größenunterschied (Abbildung 14 und 15). Durch Verdrängung von isotonischer Kochsalzlösung wurde das spezifische Gewicht der Nebennieren mit $1,10 \text{ g/cm}^3$ bestimmt.

Die Gewichte wie auch die Volumina der Nebennieren unbehandelter Tiere waren signifikant ($p < 0,05$) schwerer beziehungsweise größer als die der behandelten Tiere und die der Kontrolltiere. Zwischen den Nebennieren der behandelten und der Kontrolltiere bestand kein signifikanter Gewichts- und Volumenunterschied (Abbildung 16).

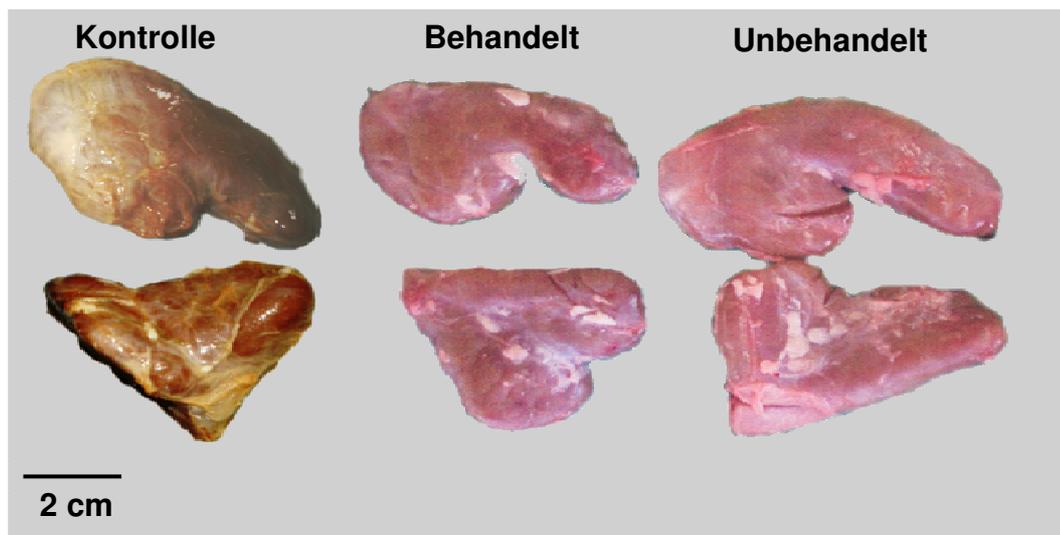


Abbildung 14: Repräsentative Nebennieren der Kontrollgruppe (fixationsbedingte Farbabweichung) sowie be- und unbehandelter Tiere.



Abbildung 15: Größenvergleich der Nebennieren infizierter behandelter und unbehandelter Tiere eines Infektionsversuches.

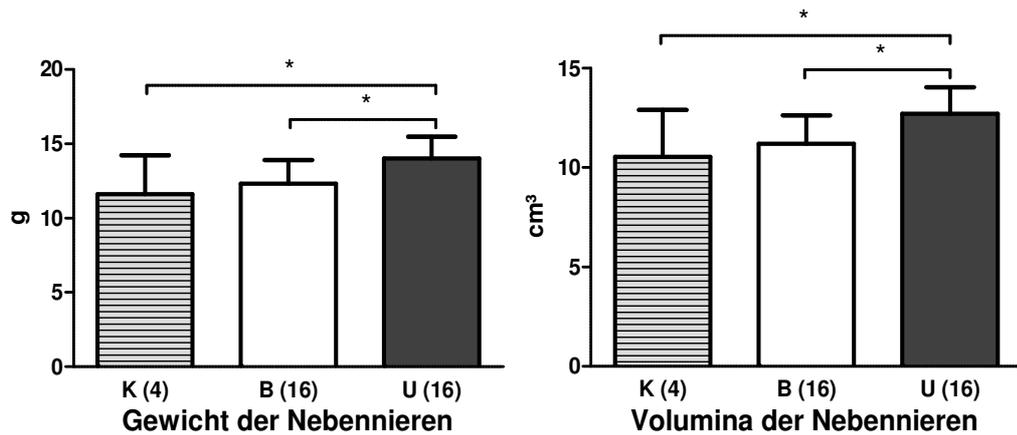


Abbildung 16: Gewichte und Volumina der Nebennieren der Kontroll- sowie der be- und unbehandelten Tiere (K = Kontrolle, B = Behandelt, U = Unbehandelt, Gruppengröße in Klammern), Mittelwerte \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, 1way-ANOVA, Post-Test: Tukey's Multiple Comparison Test.

4. Histologische Befunde

4.1. Haut

4.1.1. Tarsusbereich (nicht infizierte Lokalisation)

Die Hautproben aus dem Tarsusbereich zeigten bei Tieren aller drei Gruppen eine regelrechte Schichtung der Haut ohne Ulzerationen und Hyperkeratose mit Nachweis einzelner, vorzugsweise im Stratum papillare lokalisierter eosinophiler Granulozyten und Mastzellen.

4.1.2. Widerrist (infizierte Lokalisation)

In der histologischen Lupenübersicht war ein auffälliger Dickenunterschied der Haut der unbehandelten Tiere gegenüber jener der behandelten und der Kontrolltiere erkennbar (Abbildung 17).

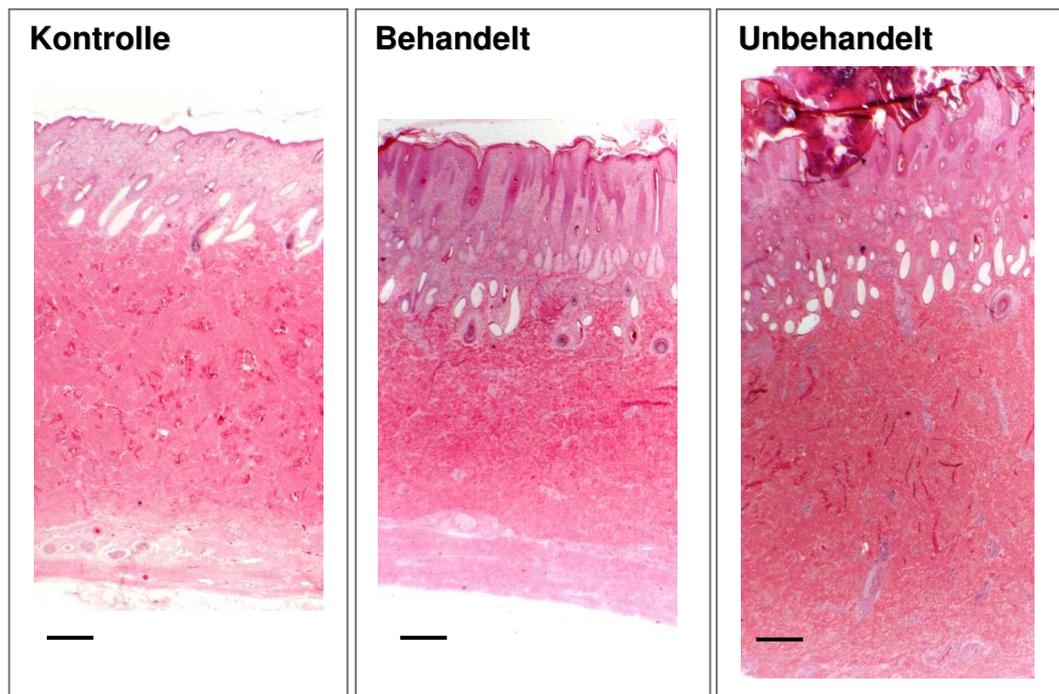


Abbildung 17: Haut, Widerrist, Balken = 1 mm, GMA/MMA, HE.

Sämtliche Hautproben der infizierten, unbehandelten Tiere zeigten ausgeprägte serozelluläre Krustenbildung (Abbildung 18 A). In der Epidermis fand sich eine mittel- bis hochgradige, überwiegend orthokeratotische, teils kompakte, teils korbgeflechtartige Hyperkeratose (Abbildung 18 B). Sowohl die Krusten als auch die Hornlamellen zeigten eine starke Durchsetzung mit kokken- und stäbchenförmigen Bakterien (Abbildung 18 D). In einzelnen Proben infizierter unbehandelter Tiere ließen sich im Krustenmaterial wenige Parasitenanschnitte nachweisen (Abbildung 18 D). In sämtlichen Proben der behandelten Tiere waren keine Parasitenanschnitte nachweisbar.

Die in mehreren Fällen abschnittsweise ulzerierte Epidermis der Proben unbehandelter Tiere wies, neben einer geringgradigen Spongiose und einem gering- bis mittelgradigen entzündlichem Infiltrat aus vornehmlich eosinophilen Granulozyten (Abbildung 18 B und D), eine diffuse und irreguläre mittel- bis hochgradige Hyperplasie auf (Abbildung 18 A und B). Im Stratum basale waren zahlreiche Mitosen erkennbar.

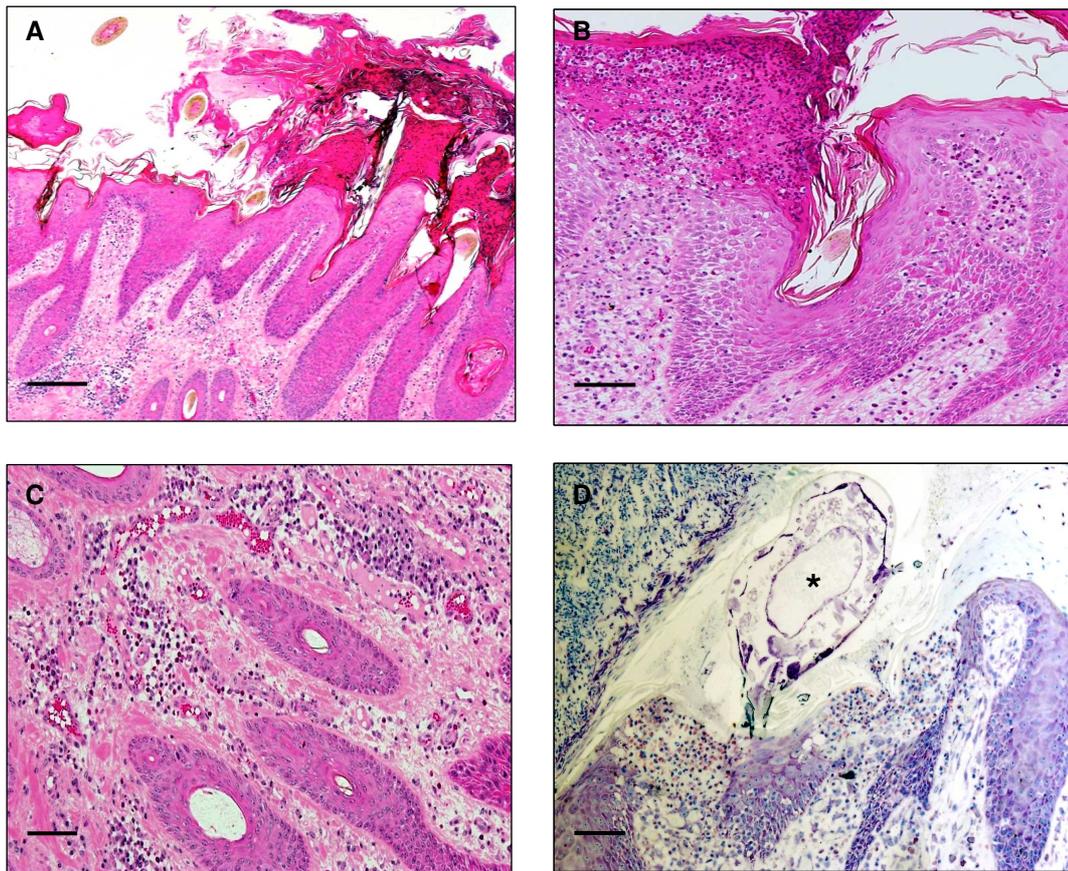


Abbildung 18: Haut (Widerrist), unbehandeltes Tier, GMA/MMA, HE (A-C) bzw. Giemsa (D), Balken in A und B = 200 μm , Balken in C und D = 100 μm . Bakteriendurchsetzte serozelluläre Kruste, Hyperkeratose, multifokale Ulzeration, Hyperplasie der Epidermis, dezente epidermale Spongiose, Hyperämie, Ödem und Entzündungszellinfiltration, Parasitenanschnitt (*).

Das Stratum papillare zeigte, neben einer Hyperämie, ein mittel- bis hochgradiges Ödem und eine diffuse hochgradige entzündliche Infiltration mit überwiegend eosinophilen Granulozyten und zahlreichen reifen Mastzellen (Abbildung 18 C). Die Epidermis der behandelten Rinder wies qualitativ gleichartige, jedoch weniger stark ausgeprägte Alterationen auf. Während sich bei den behandelten Tieren wenige intraepidermale eosinophile Granulozyten nachweisen ließen, war die regelrecht geschichtete und von zarten, desquamierten Hornlammellen bedeckte Epidermis der Kontrolltiere nahezu frei von eosinophilen Granulozyten.

Die Dermis der behandelten Tiere zeigte gegenüber der unbehandelten Gruppe eine deutlich geringere Entzündungszellinfiltration.

Einzelne, z.T. in Gruppen vorliegende eosinophile Granulozyten fanden sich auch in der Dermis der Kontrolltiere. Abbildung 19 zeigt je eine repräsentative Lupenübersicht eines Hautquerschnittes der drei Gruppen.

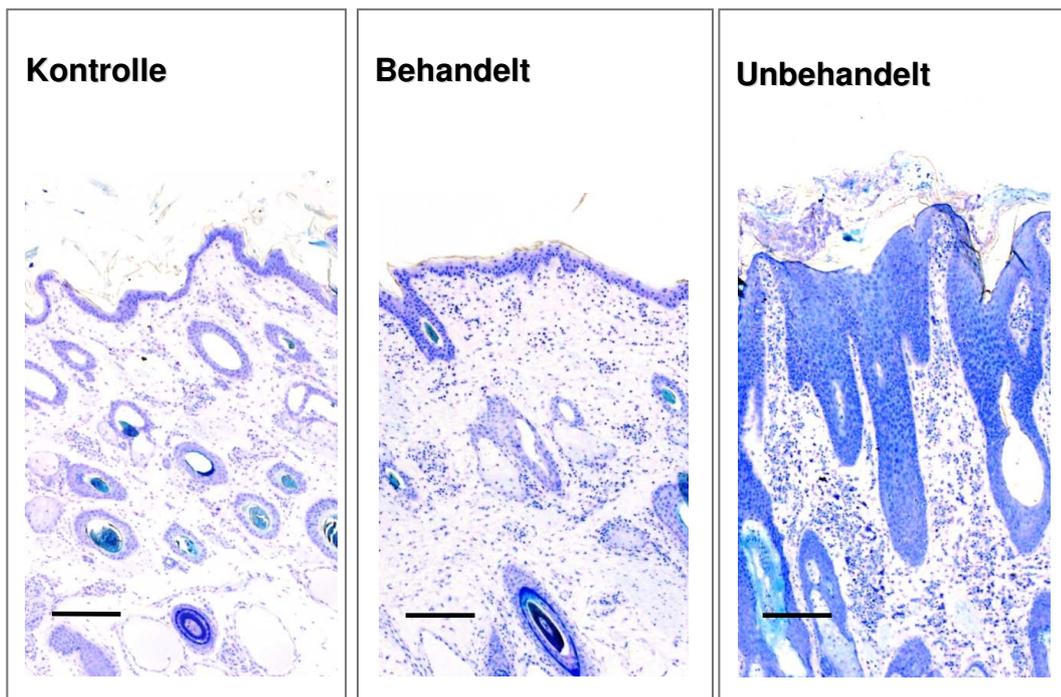


Abbildung 19: Haut, Widerrist, Entzündungszellinfiltration der Dermis, Balken = 200 μm , GMA/MMA, Giemsa.

4.2. Lymphknoten

Alle untersuchten Buglymphknotenproben wiesen eine organotypische Architektur auf. Die Proben der unbehandelten Tiere zeigten lichtmikroskopisch gegenüber jenen der behandelten Tiere und denen der Kontrollgruppe eine hochgradige reaktive Hyperplasie mit deutlich ausgeprägter Follikelformation und Keimzentrumsreaktion (Abbildung 20).

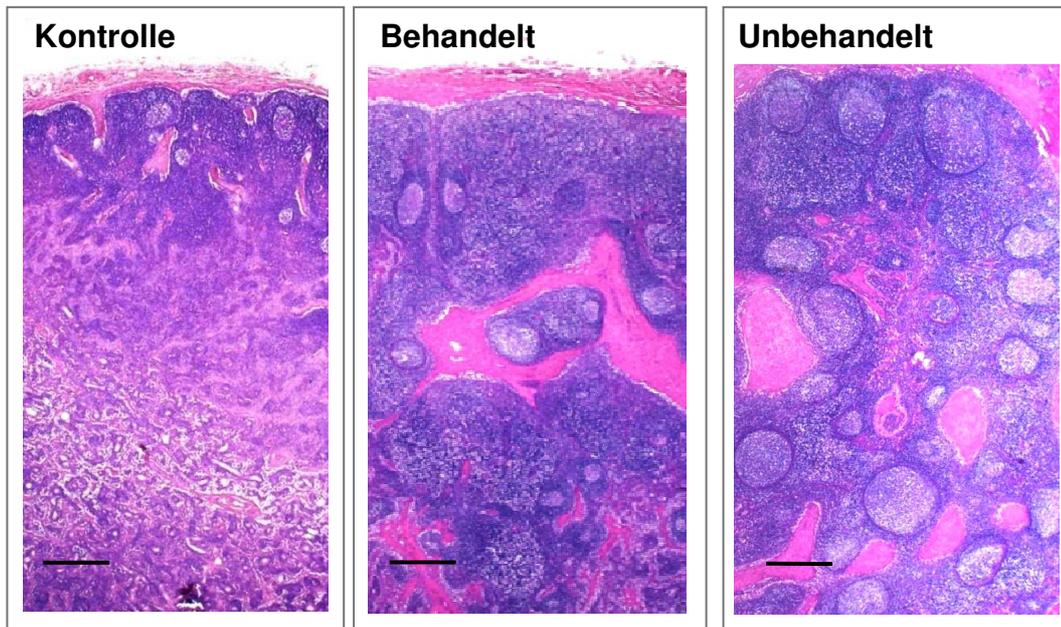


Abbildung 20: Buglymphknoten der Kontroll- sowie der be- und unbehandelten Tiere, Balken = 1mm, Paraffin, HE.

4.3. Nebenniere

Die Nebennieren aller drei Gruppen zeigten einen typischen zonalen Aufbau mit Schichtung der Rinde in die Zonae glomerulosa und fasciculata-reticularis (Abbildung 21).

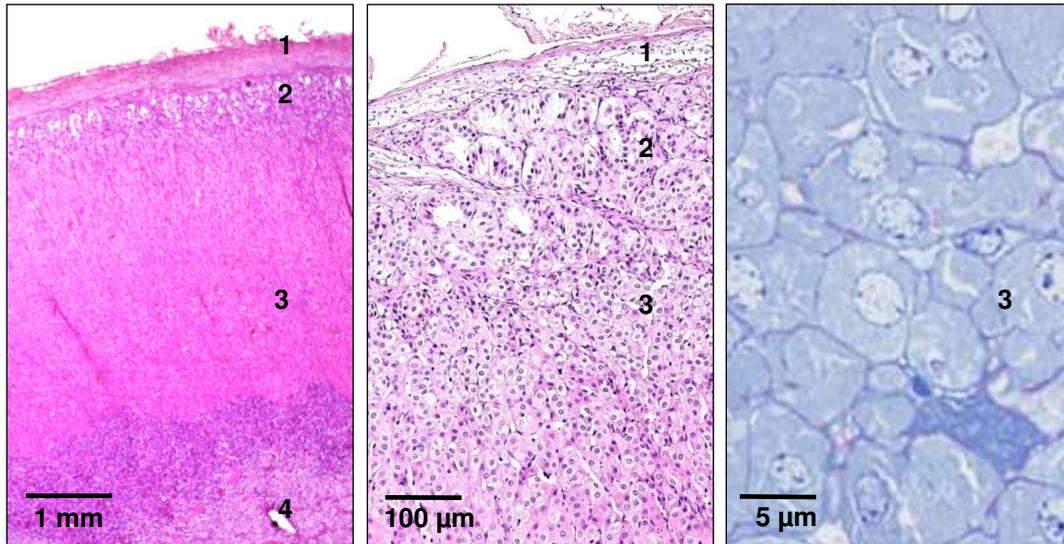


Abbildung 21: Nebenniere, 1= Kapsel, 2= Zona glomerulosa, 3= Zona fasciculata, 4= Mark. Paraffinschnitt (HE) bzw. Semidünnschnitt (Azurblau II-Safraninfärbung).

5. Quantitativ-morphologische Befunde

5.1. Haut

5.1.1. Tarsusbereich (nicht infizierte Lokalisation)

5.1.1.1. Dicke der Haut und ihrer Schichten

Die Dicke der Haut und ihrer einzelnen Schichten zeigte zwischen den drei Gruppen keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 22).

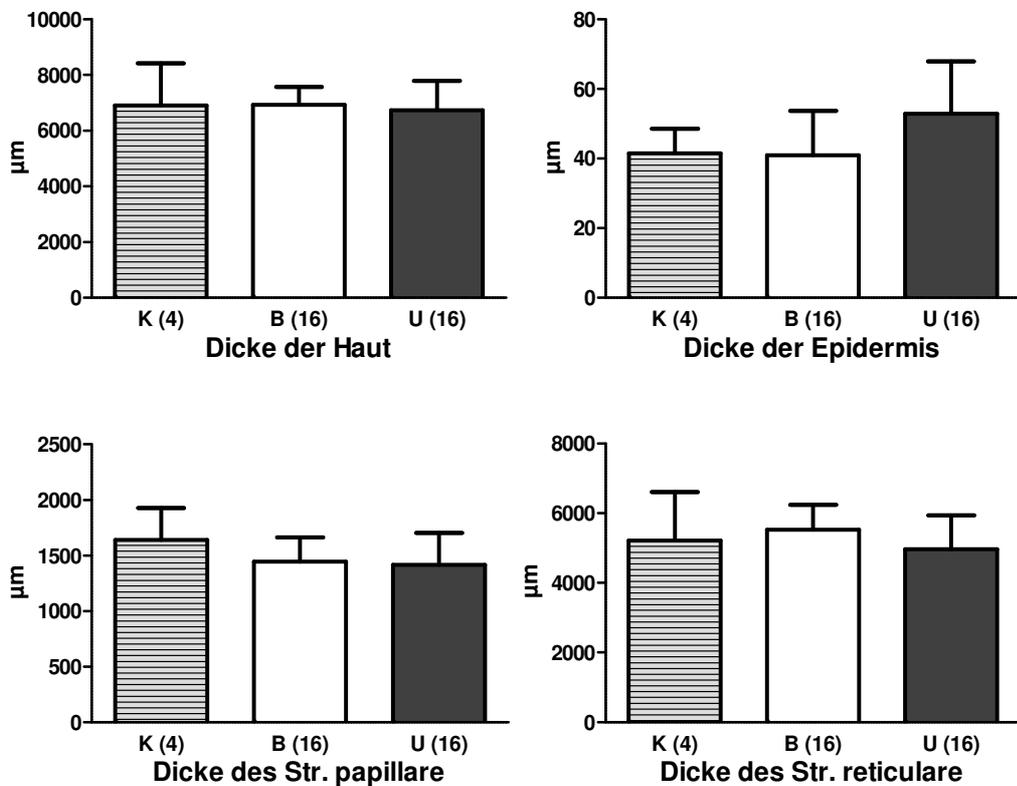


Abbildung 22: Dicke der Haut bzw. einzelnen Hautschichten (Tarsus), (K = Kontrolle, B = Behandelt, U = Unbehandelt, Gruppengröße in Klammern), Mittelwerte \pm SD, 1way ANOVA.

5.1.1.2. Volumendichten der einzelnen Hautschichten in der Haut

Die Volumendichte der Epidermis in der Haut des Tarsalbereiches war bei den behandelten Tieren signifikant niedriger als bei den unbehandelten und Kontrolltieren. Zwischen den Kontroll- und den unbehandelten Tieren bestand hier kein signifikanter Unterschied (Abbildung 23). Die unbehandelte Gruppe wies eine signifikant größere Volumendichte des Stratum papillare in der Haut des Tarsalbereiches gegenüber den behandelten Tieren auf (Abbildung 23). Der Anteil des Stratum reticulare an der Haut der unbehandelten Tiere war gegenüber den behandelten Tieren signifikant niedriger (Abbildung 23). Zwischen den Kontroll- und den behandelten Tieren bestand bzgl. der Volumendichte des Stratum papillare beziehungsweise reticulare in der Haut kein signifikanter Unterschied.

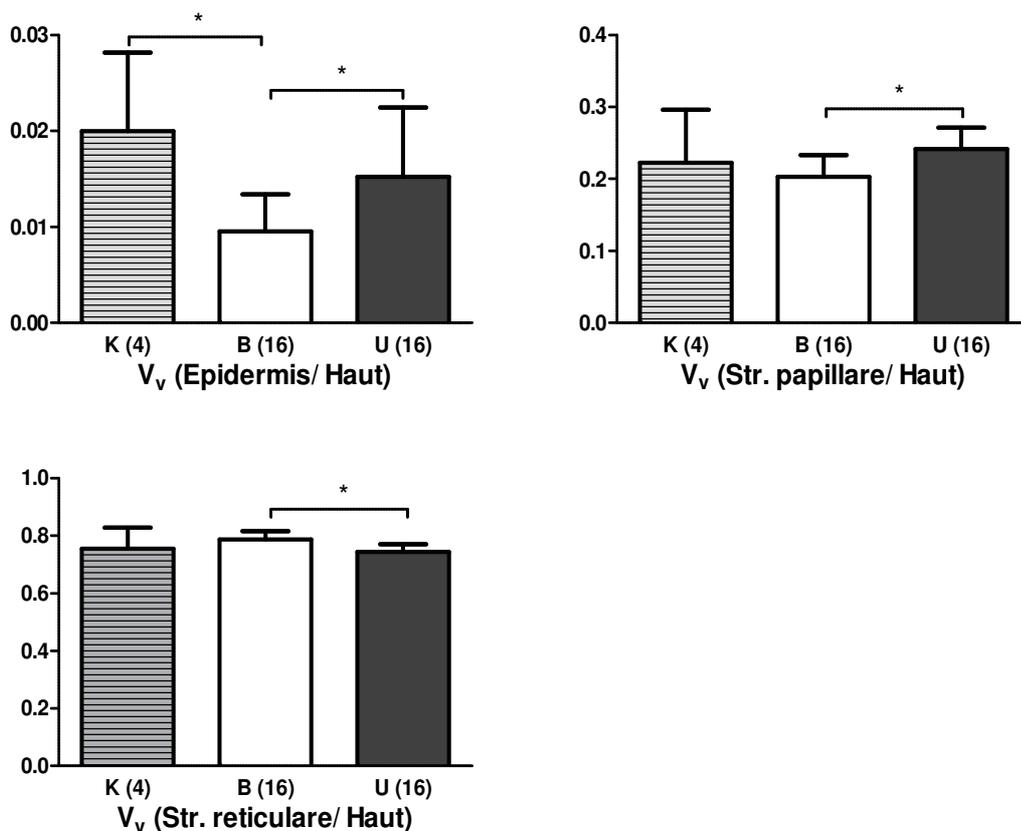


Abbildung 23: Volumendichten der einzelnen Hautschichten in der Haut (Tarsus), (K = Kontrolle, B = Behandelt, U = Unbehandelt, Gruppengröße in Klammern), Mittelwerte \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; 1way ANOVA, Post-Test: Tukey's Multiple Comparison Test.

5.1.1.3. Numerische Flächendichte eosinophiler Granulozyten und Mastzellen in den einzelnen Hautschichten

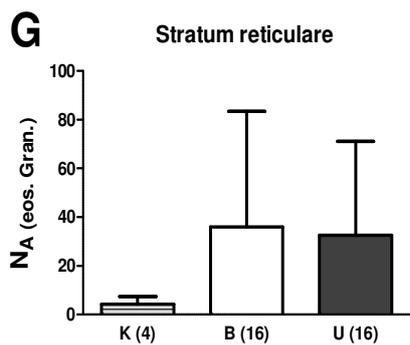
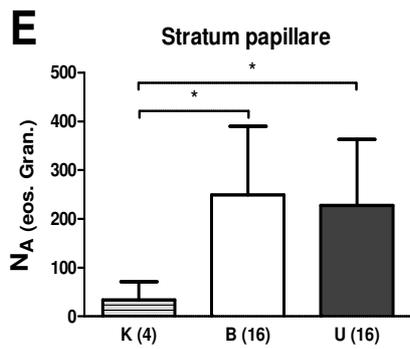
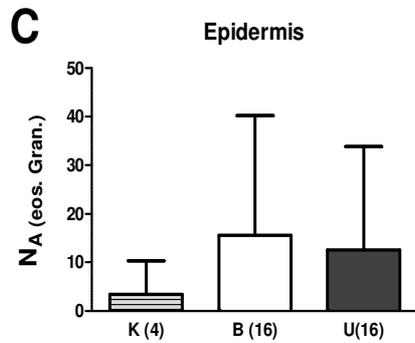
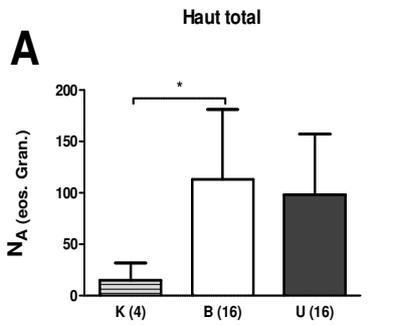
Insgesamt wies die Haut im Bereich des Tarsus der behandelten Gruppe signifikant mehr Kernanschnitte eosinophiler Granulozyten gegenüber Hautproben gleicher Lokalisation der Kontrollgruppe auf. Zwischen Proben der Kontrollgruppe und der unbehandelten Gruppe sowie zwischen Proben der behandelten und unbehandelten Tiere bestand kein signifikanter Unterschied (Abbildung 24 A). Aufgeschlüsselt nach einzelnen Hautschichten war im Stratum papillare ein signifikanter Unterschied an Kernanschnittsprofilen eosinophiler Granulozyten zwischen den Kontrolltieren und den infizierten Tieren zu verzeichnen. Zwischen den behandelten und unbehandelten Tieren bestand kein signifikanter Unterschied (Abbildung 24 E). In der Epidermis und im Stratum reticulare bestand zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied in der numerischen Flächendichte eosinophiler Granulozyten (Abbildung 24 C und G).

Die numerische Flächendichte von Mastzellen zeigte zwischen den Proben der drei Gruppen weder in der Haut des Tarsalbereiches insgesamt, noch in den einzelnen Hautschichten einen signifikanten Unterschied (Abbildung 24 B, D, F und H).

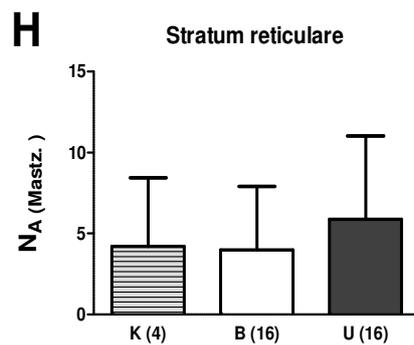
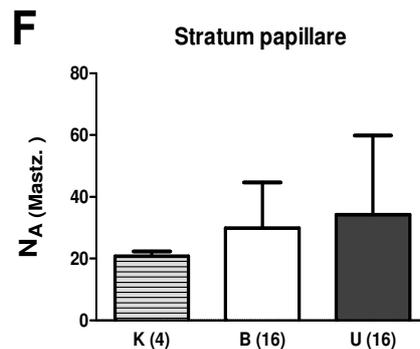
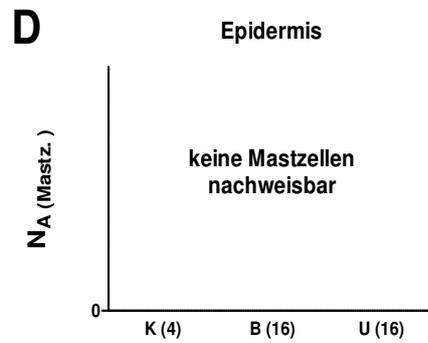
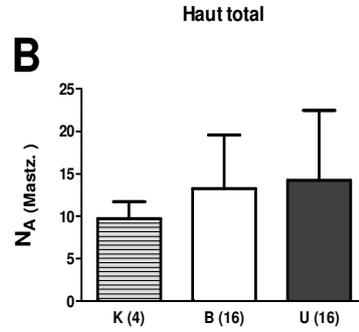
Abbildung 24 (nächste Seite): Numerische Flächendichte (N_A) eosinophiler Granulozyten (eos. Gran.) (A, C, E, G) und Mastzellen (Mastz.) (B, D, F, H) in der Haut bzw. einzelnen Hautschichten im Bereich des Tarsus, (K = Kontrolle, B = Behandelt, U = Unbehandelt, Gruppengröße in Klammern), N_A = numerische Flächendichte eos. Gran. bzw. Mastz. pro mm^2 Hautquerschnitt bzw. Anschnittsfläche, Mittelwerte \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; 1way ANOVA, Post-Test: Tukey's Multiple Comparison Test.

Tarsalbereich (nicht infizierte Lokalisation)

Eosinophile Granulozyten



Mastzellen



5.1.2. Widerrist (infizierte Lokalisation)

5.1.2.1. Dicke der Haut und ihrer Schichten

Die Haut im Bereich des Widerristes der unbehandelten Tiere war signifikant dicker gegenüber der behandelten Tiere und der der Kontrolltiere (Abbildung 25). Die Epidermis im Bereich des Widerristes unbehandelter Rinder war signifikant (durchschnittlich viermal) dicker als die der behandelten und Kontrolltiere (Abbildung 25). Das Stratum papillare unbehandelter Tiere war signifikant dicker gegenüber dem behandelten Tiere und dem von Tieren der Kontrollgruppe (Abbildung 25).

Zwischen den behandelten Tieren und den Kontrolltieren bestand in den Dicken der Haut, der Epidermis und des Stratum papillare kein signifikanter Unterschied. Das Stratum reticulare der drei Gruppen wies keine signifikanten Dickenunterschiede auf (Abbildung 25).

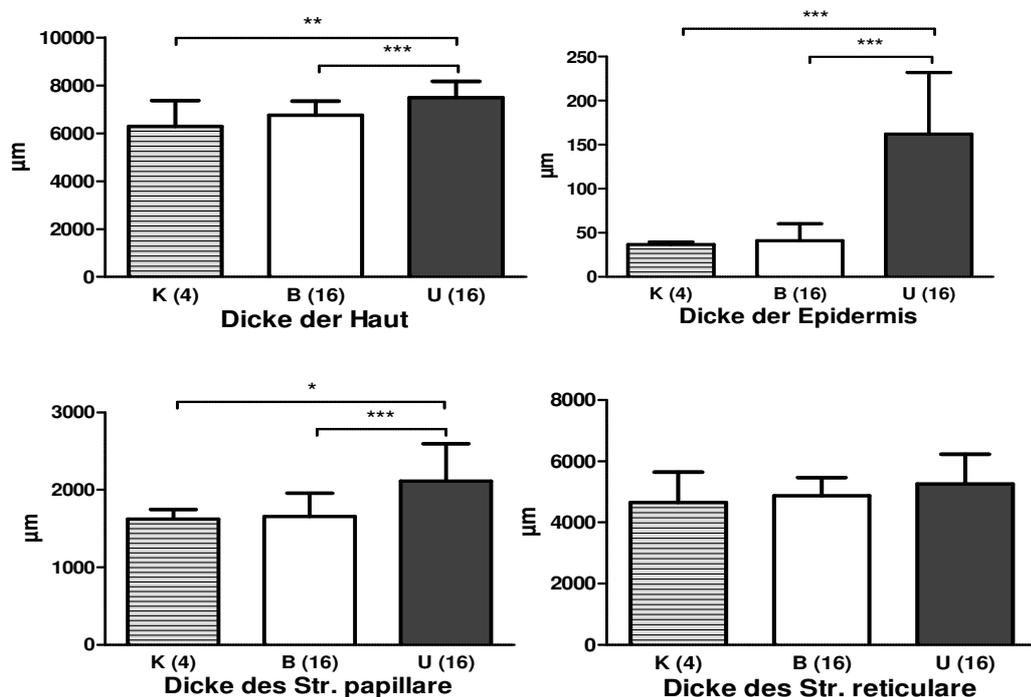


Abbildung 25: Dicke der Haut bzw. einzelnen Hautschichten (Widerrist), (K = Kontrolle, B = Behandelt, U = Unbehandelt, Gruppengröße in Klammern), Mittelwerte \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; 1way ANOVA, Post-Test: Tukey's Multiple Comparison Test.

5.1.2.2. Volumendichten der einzelnen Hautschichten in der Haut

Im Bereich des Widerristes waren die Volumendichten der Epidermis und des Stratum papillare in der Haut der unbehandelten Gruppe signifikant größer gegenüber jenen der behandelten und Kontrollgruppe (Abbildung 26).

Die Volumendichte des Stratum reticulare in der Haut der unbehandelten Gruppe war signifikant niedriger gegenüber dem der behandelten und Kontrollgruppe (Abbildung 26).

Zwischen den Volumendichten der einzelnen Hautschichten in der Haut der behandelten und der Kontrolltiere bestand kein signifikanter Unterschied (Abbildung 26).

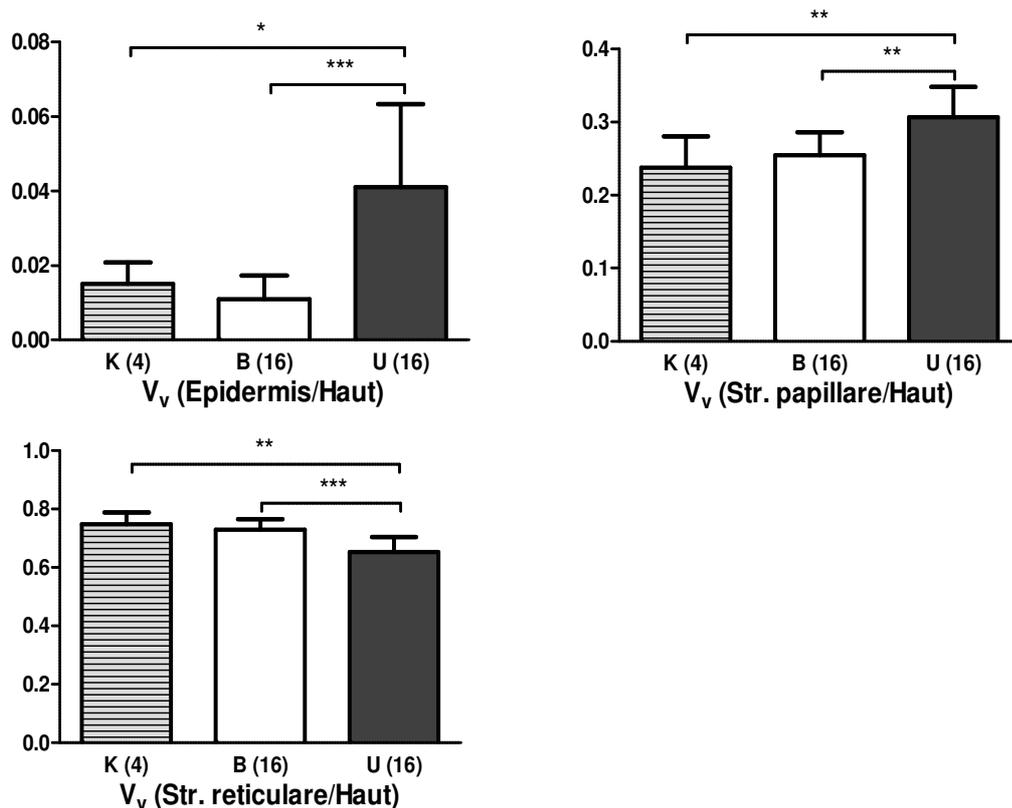


Abbildung 26: Volumendichten der einzelnen Hautschichten in der Haut (Widerrist), (K = Kontrolle, B = Behandelt, U = Unbehandelt, Gruppengröße in Klammern), Mittelwerte \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; 1way ANOVA, Post-Test: Tukey's Multiple Comparison Test.

5.1.2.3. Numerische Flächendichte eosinophiler Granulozyten und Mastzellen in den einzelnen Hautschichten

Die Haut im Bereich des Widerristes zeigte bei den unbehandelten gegenüber den behandelten als auch Kontrolltieren eine signifikant höhere numerische Flächendichte sowohl eosinophiler Granulozyten als auch Mastzellen.

Gegenüber behandelten Tieren war die numerische Flächendichte eosinophiler Granulozyten bei unbehandelten Tieren durchschnittlich zweimal und gegenüber Kontrolltieren 34 mal höher. Die numerische Flächendichte von Mastzellen bei unbehandelten Tieren war gegenüber behandelten Tieren durchschnittlich zweimal und gegenüber Kontrolltieren neunmal höher (Abbildung 27 A und B).

Unbehandelte Tiere wiesen in der Epidermis eine signifikant größere numerische Flächendichte eosinophiler Granulozyten gegenüber den Kontrolltieren und tendenziell gegenüber behandelten Tieren auf (Abbildung 27 C).

Im Stratum papillare war bei unbehandelten Tieren sowohl gegenüber behandelten Tieren als auch Kontrolltieren die Flächendichte eosinophiler Granulozyten signifikant höher. Behandelte Tiere wiesen im Stratum papillare eine höhere numerische Flächendichte eosinophiler Granulozyten gegenüber den Kontrolltieren auf (Abbildung 27 E).

Im Stratum reticulare war sowohl bei behandelten als auch unbehandelten Tieren die numerische Flächendichte eosinophiler Granulozyten signifikant höher gegenüber Kontrolltieren.

Zwischen behandelten und unbehandelten Tieren bestand in dieser Hautschicht kein signifikanter Unterschied in der numerischen Flächendichte eosinophiler Granulozyten (Abbildung 27 G).

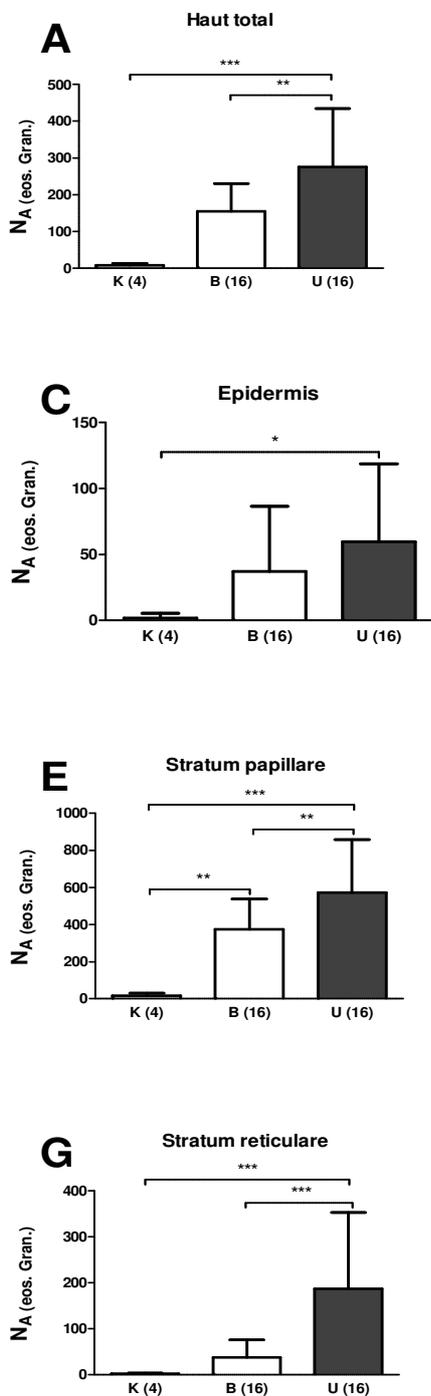
Im Stratum papillare als auch reticulare wiesen die unbehandelten Tiere eine signifikant höhere numerische Flächendichte von Mastzellen gegenüber den Kontrolltieren auf. Zwischen behandelten und unbehandelten Tieren bestand in diese Hautschichten kein signifikanter Unterschied in der numerischen Flächendichte von Mastzellen (Abbildung 27 F und H).

In drei von allen untersuchten epidermalen Gesichtsfeldern der unbehandelten Tiere war je ein Kernanschnitt einer Mastzelle nachweisbar, während in allen untersuchten epidermalen Gesichtsfeldern der behandelten Tiere und der Kontrollgruppe keine Mastzellen gefunden wurden (Abbildung 27 B).

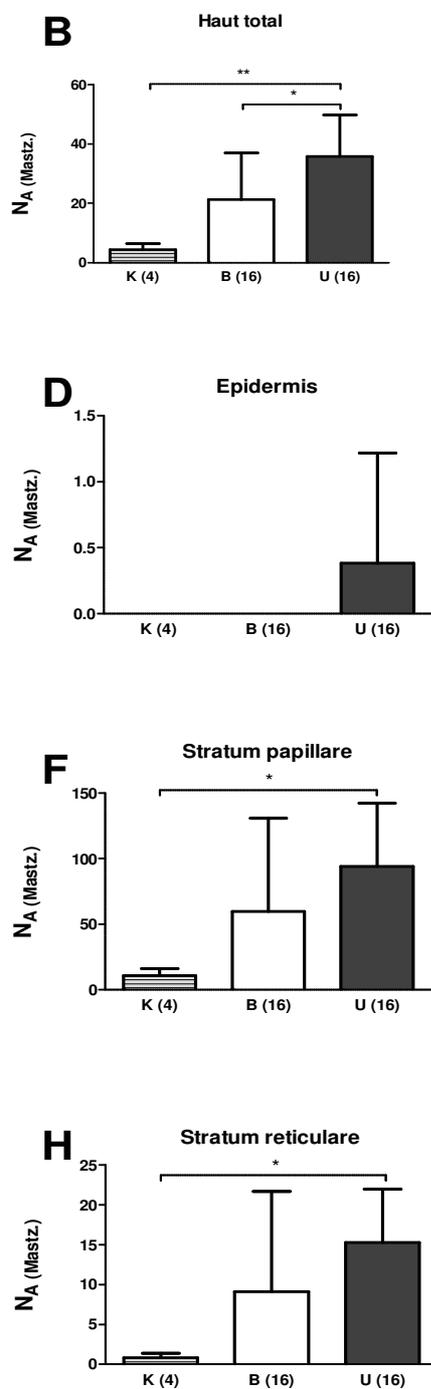
Abbildung 27 (nächste Seite): Numerische Flächendichte (N_A) eosinophiler Granulozyten (A, C, E, G) und Mastzellen (B, D, F, H) in der Haut bzw. einzelnen Hautschichten im Bereich des Widerristes, (K = Kontrolle, B = Behandelt, U = Unbehandelt, Gruppengröße in Klammern), N_A = numerische Flächendichte eos. Gran. bzw. Mastz. pro mm^2 Hautquerschnitt bzw. Anschnittsfläche, Mittelwerte \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; 1way ANOVA, Post-Test: Tukey's Multiple Comparison Test.

Widerrist (infizierte Lokalisation)

Eosinophile Granulozyten



Mastzellen



5.2. Buglymphknoten

5.2.1. Volumendichten der Lymphknotenkompartimente im Buglymphknoten

Die Volumendichten der lymphatischen Kompartimente (Keimzentren und lymphatisches Gewebe) im Lymphknoten waren bei den unbehandelten Tieren signifikant größer als bei den behandelten und den Kontrolltieren. Bei den Kontrolltieren war die Volumendichte der nichtlymphatischen Gewebe im Lymphknoten signifikant größer gegenüber den behandelten und unbehandelten Tieren. Die behandelten Tiere wiesen eine signifikant größere Volumendichte des lymphatischen Gewebes im Lymphknoten gegenüber den Kontrolltieren auf (Abbildung 28).

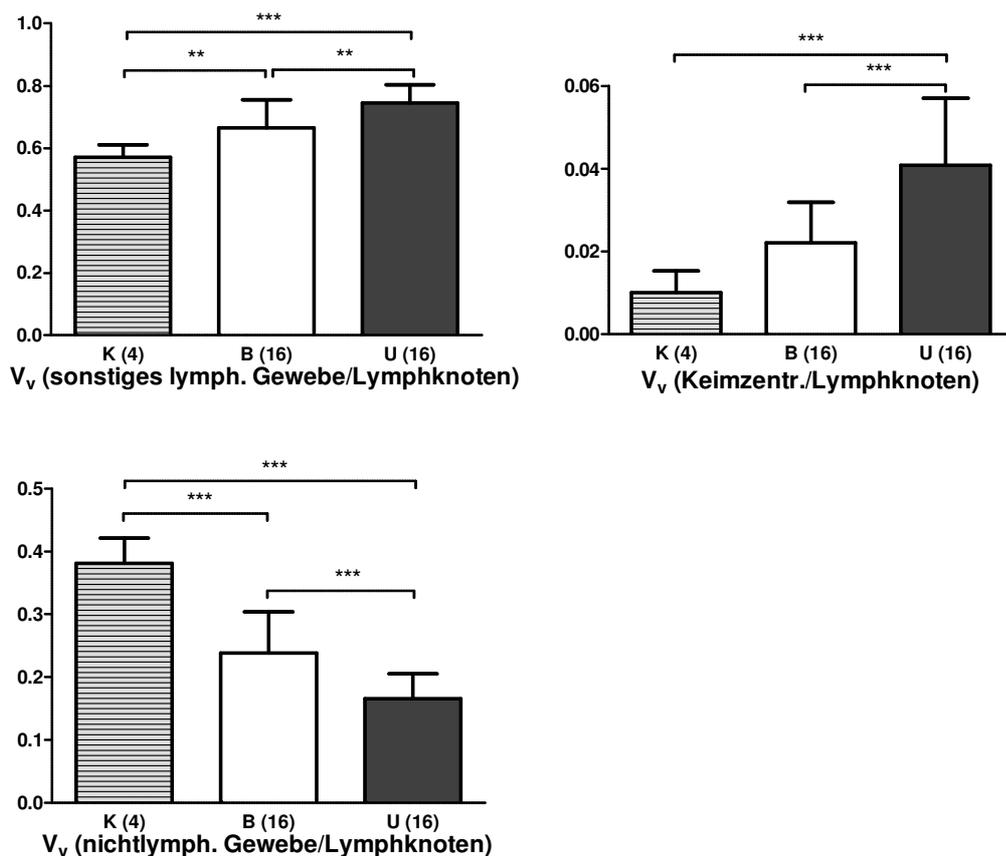


Abbildung 28: Volumendichten der einzelnen Lymphknotenkompartimente im Buglymphknoten, (K = Kontrolle, B = Behandelt, U = Unbehandelt, Gruppengröße in Klammern), Mittelwerte \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; 1way ANOVA, Post-Test: Tukey's Multiple Comparison Test.

5.2.2. Volumina der Lymphknotenkompartimente

Die Volumina der untersuchten Lymphknotenkompartimente waren bei der unbehandelten Gruppe signifikant größer als die der behandelten Tiere und der Kontrolltiere (Abbildung 29).

Das Volumen nichtlymphatischer Kompartimente war bei unbehandelten Tieren durchschnittlich zweimal höher gegenüber Kontrolltieren und zweieinhalbmal höher gegenüber behandelten Tieren.

In den Lymphknoten der unbehandelten Tiere war das Volumen der Keimzentren durchschnittlich fünfmal größer als bei behandelten Tieren und 32 mal größer als bei Kontrolltieren.

Das Volumen sonstiger lymphatischer Gewebe war bei unbehandelten Tieren gegenüber behandelten Tieren durchschnittlich viermal und gegenüber Kontrolltieren siebenmal größer.

Die Volumina von lymphatischen und nichtlymphatischen Kompartimenten sowie der Keimzentren zeigten zwischen Tieren der behandelten Gruppe und Tieren der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied.

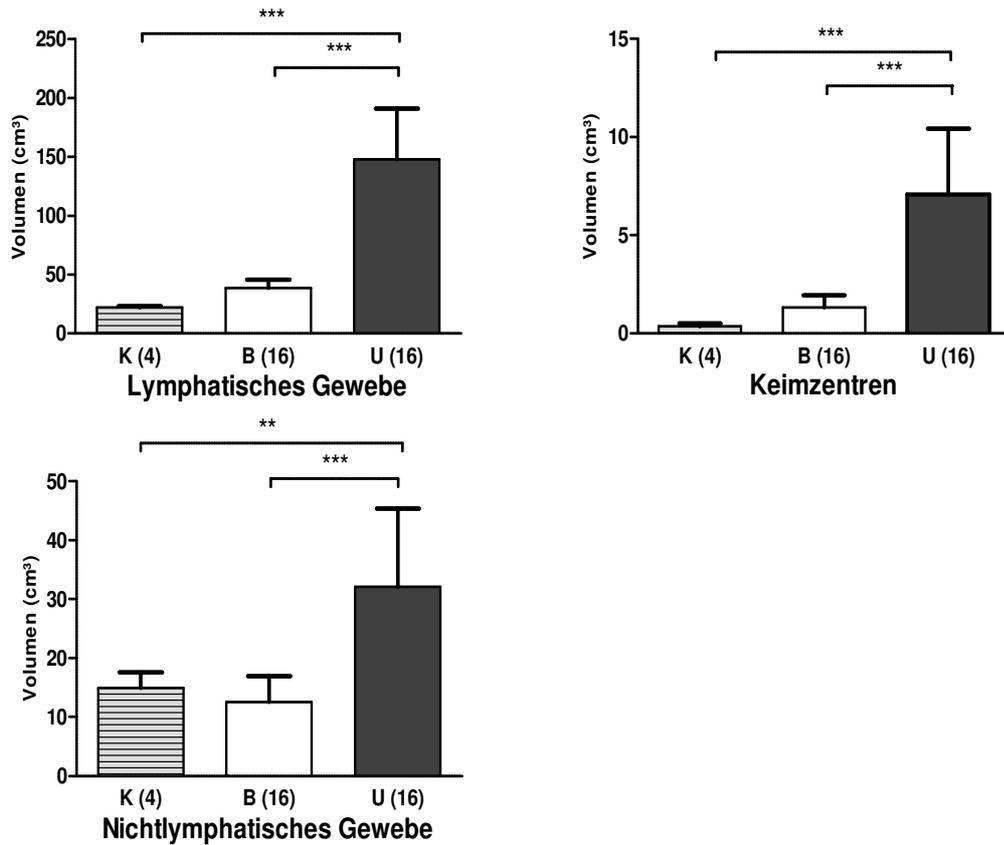


Abbildung 29: Volumina der Lymphknotenkompartimente, (K = Kontrolle, B = Behandelt, U = Unbehandelt, Gruppengröße in Klammern) Mittelwerte \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; 1way ANOVA, Post-Test: Tukey's Multiple Comparison Test.

5.3. Nebenniere

5.3.1. Volumendichten der Nebennierenkompartimente in der rechten Nebenniere

Die Volumendichte der Zona glomerulosa in der rechten Nebenniere war bei unbehandelten Tieren gegenüber behandelten Tieren signifikant reduziert. Zwischen den behandelten Tieren und den Kontrolltieren bestand kein signifikanter Unterschied in der Volumendichte der Zona glomerulosa (Abbildung 30).

Die Volumendichte der Zona fasciculata in der rechten Nebenniere war bei unbehandelten Tieren signifikant größer als bei behandelten Tieren. Die Volumendichte der Zona glomerulosa in der Nebenniere war zwischen Kontrolltieren und behandelten Tieren wie auch die Volumendichte der Zona fasciculata in der Nebenniere zwischen Kontrolltieren und unbehandelten Tieren nicht signifikant verschieden (Abbildung 30).

Die Volumendichte des Nebennierenmarkes in der rechten Nebenniere war zwischen behandelten Tieren, unbehandelten Tieren und Kontrolltieren nicht signifikant verschieden (Abbildung 30).

Zwischen den Werten, die für die rechten und der pro Gruppe zusätzlich ausgewerteten vier linken Nebennieren ermittelten Volumendichten der Zona glomerulosa, Zona fasciculata und des Markes in der linken Nebenniere bestanden innerhalb der jeweiligen Untersuchungsgruppen keine signifikanten Unterschiede.

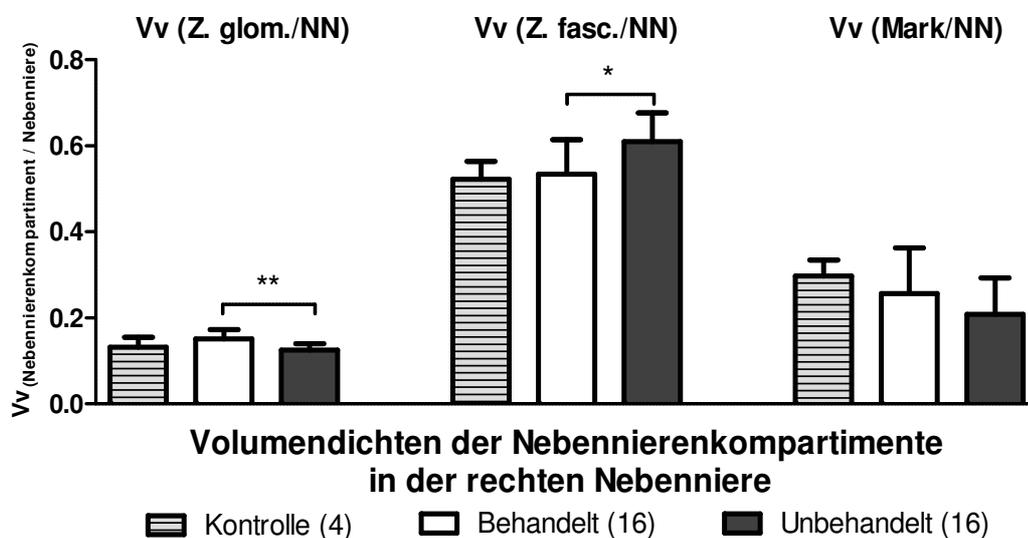


Abbildung 30: Volumendichten der Nebennierenkompartimente in der rechten Nebenniere, Gruppengröße in Klammern, Mittelwerte \pm SD, Mittelwerte \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; 1way ANOVA, Post-Test: Tukey's Multiple Comparison Test.

5.3.2. Gesamtvolumina der Nebennierenkompartimente in beiden Nebennieren

Unbehandelte Tiere wiesen ein signifikant größeres Volumen der Zona fasciculata gegenüber behandelten Tieren und Kontrolltieren auf. Das Volumen der Zona fasciculata war zwischen behandelten Tieren und Kontrolltieren nicht signifikant verschieden.

Zwischen dem Volumen der Zona glomerulosa als auch des Markes der drei Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied (Abbildung 31).

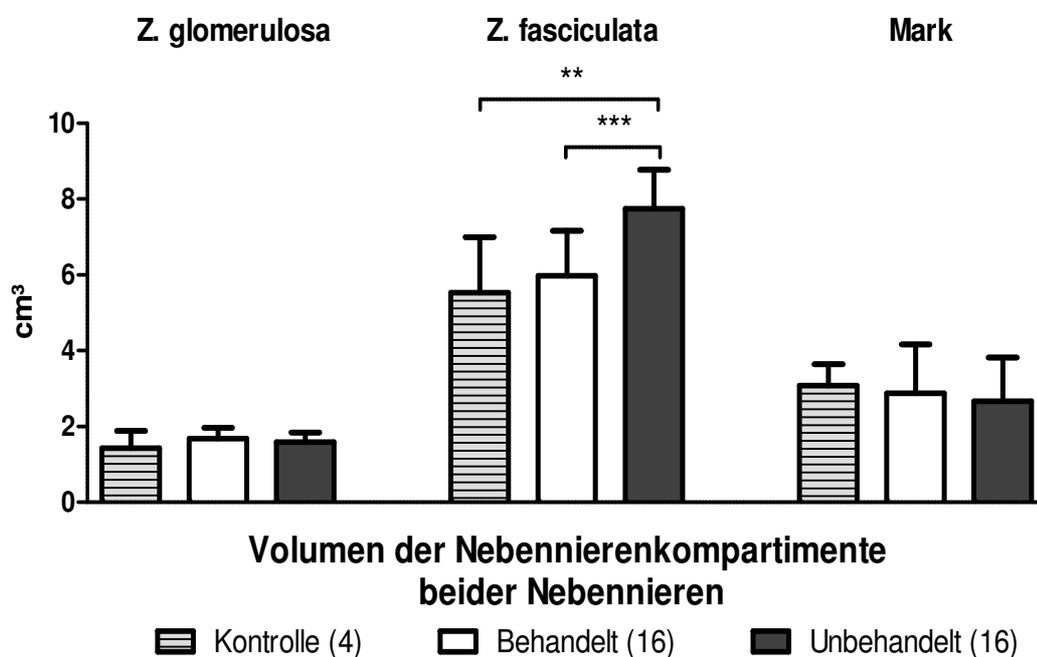


Abbildung 31: Gesamtvolumina der Nebennierenkompartimente in beiden Nebennieren, Gruppengröße in Klammern, Mittelwerte \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; 1way ANOVA, Post-Test: Tukey's Multiple Comparison Test.

5.3.3. Numerische Volumendichte der Zona fasciculata-Zellen in der Zona fasciculata der rechten Nebennierenrinde

Zwischen den drei Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied in der numerischen Volumendichte der Zona fasciculata-Zellen in der Zona fasciculata (Abbildung 32).

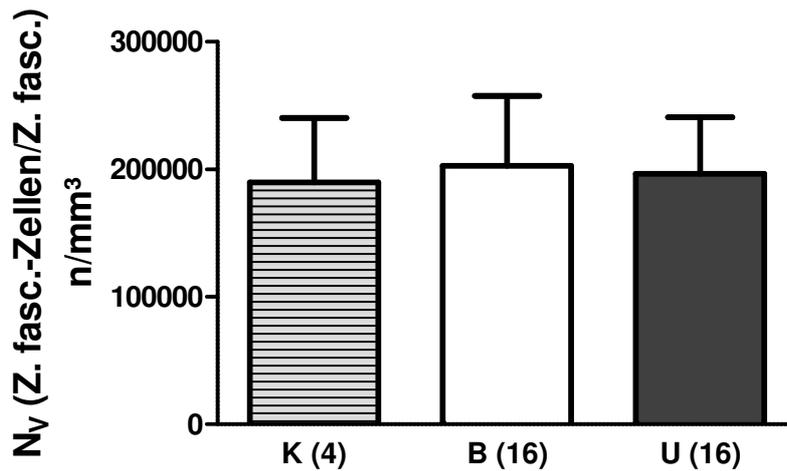


Abbildung 32: Numerische Volumendichte (N_V) der Zona fasciculata-Zellen in der Zona fasciculata der rechten Nebennierenrinde, (K = Kontrolle, B = Behandelt, U = Unbehandelt, Gruppengröße in Klammern), Mittelwerte \pm SD, 1way ANOVA.

5.3.4. Mittleres Volumen der Zona-fasciculata-Zellen der rechten Nebenniere

Das mittlere Volumen der Zona-fasciculata-Zellen zeigte zwischen den drei Gruppen keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 33).

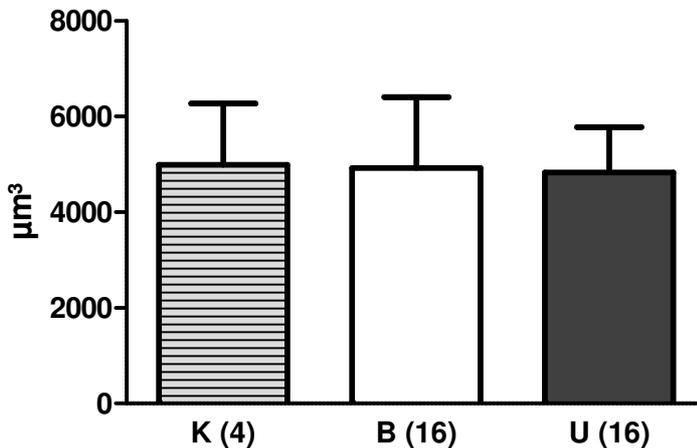


Abbildung 33: Mittleres Volumen der Zona fasciculata-Zellen der rechten Nebenniere, (K= Kontrolle, B= Behandelt, U= Unbehandelt, Gruppengröße in Klammern), Mittelwerte \pm SD, 1way ANOVA.

5.3.5. Absolute Anzahl der Zona-fasciculata-Zellen in beiden Nebennieren

Die unbehandelten Tiere wiesen signifikant mehr Zona fasciculata-Zellen in beiden Nebennieren gegenüber den behandelten Tieren auf. Zwischen den unbehandelten Tieren und den Kontrolltieren als auch zwischen behandelten Tieren und Kontrolltieren bestand kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Zona fasciculata- Zellen (Abbildung 34).

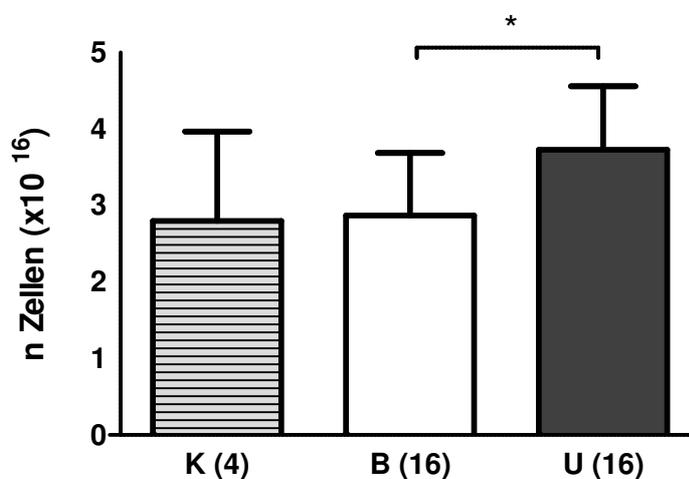


Abbildung 34: Absolute Anzahl der Zona fasciculata-Zellen in beiden Nebennieren, (K = Kontrolle, B = Behandelt, U = Unbehandelt, Gruppengröße in Klammern), Mittelwerte \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; 1way ANOVA, Post-Test: Tukey's Multiple Comparison Test.

6. Kortisolkonzentration im Serum

Die kurz vor der Schlachtung bestimmten Serumkortisolspiegel waren bei den Tieren der drei Gruppen nicht signifikant verschieden (Abbildung 35).

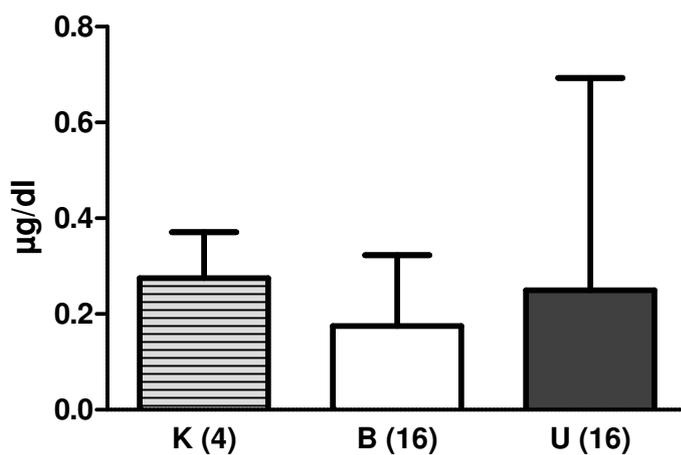


Abbildung 35: Kortisol im Serum, (K = Kontrolle, B = Behandelt, U = Unbehandelt, Gruppengröße in Klammern), Mittelwerte \pm SD, 1way ANOVA.

V. Diskussion

1. Allgemeine Aspekte

Psoroptes ovis ist eine auf der Hautoberfläche verschiedener Säugetierspezies parasitierende Milbe. Unter anderem befällt sie das Rind und ruft dort schwere Dermatitiden hervor. Neben der Schädigung der Haut und konsekutiv des daraus hergestellten Leders, führt der Befall zu Leistungseinbußen in der Mast und stellt somit ein ernst zu nehmendes wirtschaftliches Problem dar. Neben experimentellen, alternativen akariziden Behandlungsansätzen werden Infektionen heute durch Einsatz von Substanzen aus der Gruppe der makrozyklischen Lactone kontrolliert. Deren Wirksamkeit wird anhand verschiedener Studienmodelle evaluiert. In Zusammenarbeit mit der Firma Merial GmbH und dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Ludwig-Maximilians-Universität wurden Organproben von Rindern aus einer Therapiestudie zur Evaluierung eines Akarizids aus der Gruppe der makrozyklischen Lactone auf histopathologische Alterationen und Veränderungen morphometrischer und quantitativ-stereologischer Parameter untersucht. Dank der mitgeführten nicht infizierten Kontrollgruppe war es möglich, neben den durch Vergleich der behandelten und unbehandelten Tiere evaluierbaren Therapieeffekten, Alterationen der untersuchten Organe auf die Präsenz und Schädigung von *P. ovis* zurückzuführen und zu quantifizieren. Besonderes Interesse galt hierbei den Nebennieren als wichtiges Effektororgan der Stressreaktion.

2. Diskussion der Ergebnisse

2.1. Experimentelles Design

Das experimentelle Design entsprach international anerkannten Expertenrichtlinien zur Beurteilung der Effizienz von Antiparasitika (Vercruyse et al., 2006). Die Zeitspanne des Beobachtungszeitraumes gewährleistete eine Vermehrung der initial auf die Versuchstiere aufgetragenen Milben und die Ausprägung des klinischen Bildes der Räude. Eine der Behandlung folgende Beobachtungsperiode, die mehr als zwei komplette Lebenszyklen von *P. ovis* umfasste, erlaubte die Wirksamkeit sowohl gegen zum Zeitpunkt der Behandlung motiler Parasiten als auch nach Behandlung geschlüpfter Parasiten zu beurteilen. Üblicherweise werden für Effizienzstudien keine nicht infizierten Tiere als Kontrolle mitgeführt, im Rahmen des der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimentes wurde jedoch eine Gruppe solcher Tiere bereitgestellt. Dies ermöglichte, neben der Zielsetzung Therapieeffekte zu quantifizieren, die Auswirkungen der Milbeninfektion auf bislang unerforschte Aspekte hinsichtlich möglicher Alterationen innerer Organe zu objektivieren. Grundlage dieser Bestrebungen waren die beobachteten Veränderungen an der Nebennierenrinde von mit *Sarcoptes* und *Chorioptes* infizierter Rinder (Rehbein et al., 2003). Anhand dieser, und der vorliegenden Arbeit zeigt sich, dass die für derartige Effizienzstudien anberaumte Zeitspanne geeignet ist, auch mögliche Veränderungen innerer Organe zu erfassen. So konnten bei diagnostischen Sektionen, 63 Tage nach *P. ovis*-Infektion keine Alteration innerer Organe bei infizierten Rindern gegenüber nicht infizierten Kontrolltieren nachgewiesen werden (Stromberg et al., 1986).

Die gewählte Infektionsdosis von ca. 2000 Milben pro Tier stellt ein Vielfaches der empfohlenen Mindestinfektionsdosis von 50 bis 100 Milben dar. Mit dieser Dosis sind jedoch sicher und schnell die für Effizienzstudien benötigten Veränderungen an den Versuchstieren zu induzieren (Vercruyse et al., 2006). Zudem entspricht diese Anzahl eher einer manifesten Infektion unter natürlichen Bedingungen.

Die mit der Infektion eingetretenen und gegebenenfalls durch die Therapie beeinflussten Veränderungen an hier untersuchten Zielorganen und die zur Detektion angewandten Techniken werden im Folgenden diskutiert.

2.2. Methodische Aspekte

2.2.1. Haut

Die Haut von Rindern und Schafen, als primäres, durch *P. ovis*, geschädigtes Organ, war bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. In diesen Studien wurden an intra vitam (nach Lokalanästhesie) exzidierten beziehungsweise ausgestanzten Hautproben die Charakteristika und der Verlauf der durch *P. ovis* hervorgerufenen Dermatitis erhoben (Stromberg und Fisher, 1986; Van Den Broek et al., 2004). Bei subkutaner Applikation von Lokalanästhetika besteht jedoch die Möglichkeit einer lokalen Entzündungsreaktion durch das Anästhetikum selbst (Cavadas et al., 2003). Die Entnahme von Hautproben nach der Schlachtung bietet daher die Möglichkeit, entzündliche Veränderungen frei von möglichen medikamentell bedingten Verzerrungen zu beurteilen. Eine Verlaufskontrolle der dermalen Entzündungszellinfiltration war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Die entnommenen Hautproben spiegeln somit die situativen Verhältnisse des Tages 112 post infectionem (p. i.) wider, allerdings sind in der Literatur auch keine vergleichbaren Daten vorhanden, die die entzündliche Infiltration der Haut zu einem soweit fortgeschrittenem Zeitpunkt nach der Infektion beschreiben. Die Hautproben wurden in GMA/MMA eingebettet. Dieses für morphologische Studien hervorragend geeignete Kunststoffeinbettmedium bietet gegenüber der Paraffineinbettung den Vorteil einer geringeren Gewebeschrumpfung (Dorph-Petersen et al., 2001). In Giemsa-gefärbten GMA/MMA-Schnitten sowohl milbenalterierter als auch makroskopisch unveränderter Haut wurde die numerische Flächendichte eosinophiler Granulozyten und Mastzellen in systematisch zufällig gewählten Gesichtsfeldern jeder Hautschicht bestimmt.

Die dabei ausgewertete Fläche entspricht im Umfang den Untersuchungen bereits publizierter Studien (Van Den Broek et al., 2000, 2003, 2004; McNeilly et al., 2010). Mit der numerischen Flächendichte als nicht stereologischer Parameter kann jedoch keine exakte Aussage über die tatsächliche Anzahl eosinophiler Granulozyten und Mastzellen in den untersuchten Hautproben getroffen werden (Wanke, 1996). Der Parameter wurde gewählt, da er mit relativ geringem Aufwand ein anschaulicheres Abbild der entzündlichen Infiltration als eine semiquantitative Beurteilung (-, +, ++, +++) liefert. Zudem ist der Parameter, unter der Prämisse, dass die Größe der untersuchten Partikel (Kerne) bei Individuen der unbehandelten, behandelten und Kontrollgruppe nicht unterschiedlich ist, für den Vergleich zwischen den drei Gruppen ausreichend.

Die Dicke von milbenalterierter und im Vergleich dazu makroskopisch unversehrter Haut sowie jeweils ihrer einzelnen Schichten wurde anhand HE-gefärbter GMA/MMA-Schnitte computergestützt morphometrisch bestimmt (Hünemörder, 1995; Wanke et al., 1999). Das Kunststoffeinbettungsmedium weist gegenüber Paraffin den Vorteil einer geringeren Gewebeschrumpfung auf. Somit spiegeln die an den GMA/MMA-Schnitten erhobenen Befunde eine genauere Sicht der Dickenverhältnisse in der Haut wider. In der Literatur sind Methoden wie Sonografie oder Zählen von Zelllagen zur Bestimmung der Dicke von Haut und ihrer Schichten beschrieben (Monteiro-Riviere et al., 1990; Butler und Head, 1993; Van Amstel et al., 2004). Im Fall einer entzündlich infiltrierten Dermis ist mit der Sonografie jedoch eine sichere Differenzierung zwischen Dermis und Epidermis nicht möglich (El Gammal et al., 1999). Bei Zählen von Zelllagen bleibt ein möglicherweise bestehendes intra- und/oder interzelluläres Ödem unberücksichtigt. Insofern stellt die computergestützte Morphometrie eine geeignetere Methode zur Dickenbestimmung der Haut und ihrer Schichten dar.

Die Bestimmung der Volumendichten der einzelnen Hautschichten in der Haut erfolgte an HE-gefärbten GMA/MMA-Schnitten. Die angewandte Technik der Punktzählung stellt eine geeignete und akzeptierte Methode auch in der Dermatologie dar (Bahmer und Smolle, 1992; Smolle et al., 1993; Antico, 2004)

2.2.2. Lymphknoten

Die zur Volumetrie angewandte Methode nach Scherle bietet vergleichbar genaue Ergebnisse wie die stereologische Bestimmung des Volumens nach Cavalieri (Dorph-Petersen et al., 2005) und wurde aus Gründen der Praktikabilität letzterer vorgezogen. Die Bestimmung der Volumendichten einzelner Lymphknotenkompartimente durch Punktzählung ist eine bisher nur wenig beschriebene Methode (Kolotova et al., 2010; Vojdani et al., 2010). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass diese Untersuchung geeignet ist, subjektive Eindrücke zu objektivieren, indem gemessene Merkmale von Strukturen in Datenform abstrahiert werden (Oberholzer, 1983). Durch Vergleich dieser erhobenen Daten konnten eindeutige Unterschiede in der Komposition und in den Volumina der Lymphknotenkompartimente zwischen den drei Gruppen sicher erfasst werden.

2.2.3. Nebennieren

In der Literatur sind Daten über das spezifische Gewicht der Nebenniere von Mensch, Ratte und Hund verfügbar (Swinyard, 1939). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit an den Nebennieren angewandte Volumetrie nach Scherle ergab als Nebenbefund ein gegenüber diesen Spezies geringfügig höheres (6%) spezifisches Gewicht von 1,101 g/cm³. Diese Abweichung kann einerseits durch die Messgenauigkeit, andererseits durch einen speziesspezifisch unterschiedlichen Fettgehalt in der Nebenniere bedingt sein.

Während beim Rind ein Fünftel der Nebennierentrockensubstanz aus Lipiden besteht, macht beim Menschen der Lipidgehalt die Hälfte der Trockensubstanz aus (Jossiphov, 1968). Im Rahmen älterer an Rindern durchgeführten Studien wurde zur Beurteilung von möglichen Veränderungen der Nebennierenrinde der Adrenalindex (siehe Literaturübersicht Kapitel 8) bestimmt. Dieser ist jedoch von geringerer Aussagekraft. Dieser Parameter lässt eine Aussage über das Verhältnis der Zona glomerulosa zu der Zona fasciculata in der untersuchten, möglicherweise willkürlich gewählten, Lokalisation zu. Das Verhältnis zwischen Rinde beziehungsweise einzelnen Rindenzonen zum Mark bleibt dabei unberücksichtigt. Die in dieser Studie durchgeführte Bestimmung von Volumendichten einzelner Zonen mittels Punktzählung erlaubt bei bekannten Volumen des Organs eine quantitative Aussage über das Gesamtvolumen der einzelnen Nebennierenzonen und des Markes. Die Art von Veränderungen in den Volumina einzelner Zonen (Veränderung von Zellzahl oder Zellgröße) können anhand moderner quantitativ-stereologischer Analysen beurteilt werden. Diese Methoden sind beim Rind allerdings bislang selten, und unter anderer Fragestellung und an Paraffinschnitten angewendet worden (Blanco et al., 2001). Inwieweit, oder ob überhaupt eine Korrektur dabei erhobener Befunde hinsichtlich der Gewebeschrumpfung vorgenommen wurde, ist aus den Publikationen nicht zu entnehmen.

Bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen zur Einbettungsschrumpfung bovinen Nebennierengewebes in Epon ergab sich ein interessanter Befund. Entgegen der verbreiteten Auffassung, dass in Epon die einbettungsbedingte Schrumpfung zu vernachlässigen sei (Okwun et al., 1996), konnte hier eine mit dem linearen Schrumpfungsfaktor $f_s = 0,81 \pm 0,06$ einhergehende Volumenreduktion des Nebennierengewebes von 47% nachgewiesen werden. Vergleichbar hohe Volumenschrumpfungen sind auch für beispielsweise Hirngewebe von Ratten und Mäusen bei Epon einbettung beschrieben (Nomura et al., 1997; Fujise und Kosaka, 1999).

Das vergleichbare Ausmaß der Schrumpfung in diesen beiden Geweben liegt möglicherweise in ihrem hohen Gehalt an Lipidderivaten begründet. Der nicht unerhebliche Volumenschwund in der Nebenniere unterstreicht die Notwendigkeit, stereologische Daten einer Korrektur für die mitunter starke Gewebeschrumpfung zu unterziehen (Wanke et al., 1994; Wanke, 1996).

Die Anzahl und das mittlere Volumen der Zona fasciculata-Zellen wurde mit der Disektor-Methode bestimmt. Dieses Verfahren erlaubt die Anzahl und Größe von Partikeln in einem definierten Referenzvolumen verzerrungsfrei zu bestimmen.

Ein wichtiger Parameter bei Verwendung des physikalischen Disektors zur Zellzählung stellt die Schnittdicke dar. Anhand orthogonal wieder eingebetteten, den Schnittserien entnommenen Präparaten, konnte durch Schnittdickenmessungen an elektronenmikroskopischen Aufnahmen dieser Präparate eine konstante Schnittdicke bestätigt werden.

2.3. Diskussion der Ergebnisse

2.3.1. Milbenzahlen

Der Verlauf der Milbeninfektion wurde durch regelmäßige Kontrollen, die auf international anerkannten Standards beruhen, evaluiert (Oie, 2004; Vercruysse et al., 2006). Auch wenn die Methode des direkten Milbennachweises durch Untersuchung von Hautgeschabseln anerkannt ist, weist sie bekannte Schwächen in der Sensitivität auf (Meleney, 1978; Ochs et al., 2001; Alnaaimi und Al-Badrani, 2010). Durch Auswertung einer ausreichend großen Anzahl von Hautgeschabseln wird versucht, falsch negativen Ergebnissen vorzubeugen. In vorliegender Studie wurde die empfohlene Anzahl von sechs Geschabseln pro Tier pro Untersuchung ausgewertet (Vercruysse et al., 2006).

Infizierte Tiere, die medikamentell behandelt wurden, waren bis auf ein Tier der ersten Versuchsgruppe, bei dem am Tag 21 noch eine lebende Milbe gefunden wurde, nach zwei Wochen frei von Milben, während auf scheinbehandelten Tieren die Milben weiter persistierten. Das in dieser Studie angewandte Akarizid aus der Gruppe der makrozyklischen Lactone zeigte eine, mit der in der Literatur beschriebenen Effizienz diverser Avermectine vergleichbare Wirksamkeit. Eine ebenso schnelle Tilgung der Milbenlast nach Anwendung von Doramectin ist durch verschiedenen Autoren beschrieben (Logan et al., 1993; Hendrickx et al., 1995; Losson et al., 1996; Clymer et al., 1997). In einer vergleichenden Medikamentenstudie mit 1%igem subkutan appliziertem Ivermectin konnte bereits nach 7 Tagen eine vollständige Eliminierung der Milben diagnostiziert werden (Lonneux et al., 1997), während im Vergleich verschiedener Ivermectine die Tilgung der Milben frühestens nach 15 Tagen zu verzeichnen war (Genchi et al., 2008). Diese Diskrepanz könnte durch eine fast doppelt so große Probandengruppe der jüngeren Studie erklärt werden. Eine größere Probandenzahl ist begleitet von mehr Streuung. So waren 5 der 11 infizierten Tiere bereits bei der ersten Verlaufskontrolle frei von Milben, während die restlichen Tiere erst eine Woche später anhand milbenfreier Hautgeschabsel als parasitologisch negativ erfasst wurden. In einer Studie, in der die Effizienz von unter anderem subkutan appliziertem Doramectin und Ivermectin verglichen wurde, konnte bei beiden Präparaten hingegen erst nach 28 Tagen die vollständige Tilgung der Milben diagnostiziert werden (Rehbein et al., 2002). Neben der Beobachtung, dass Originalprodukte in der Regel eine größere Effizienz gegenüber Generika zeigen (Rehbein et al., 2002; Genchi et al., 2008) scheinen auch speziesspezifische Unterschiede in der Bioverfügbarkeit dieser Präparate zu bestehen. Ein Vergleich zwischen Holstein-Friesian und Weißblauen Belgiern zeigte nach subkutaner Injektion eines Ivermectin sowohl in der Haut als auch im Plasma zeitabhängig signifikante Konzentrationsunterschiede des Präparates in der area under the curve (AUC) (Vercruysse et al., 2008).

Ein möglicher Grund für dieses Phänomen könnte die ausgesprochene Lipophilie dieser Substanzen sein. Bei subkutaner Injektion würde dem zufolge in Tieren mit größeren Fettdepots eine geringere Bioverfügbarkeit erzielt. Eine Studie an Zebus attestiert Ivermectin eine schlechtere Verfügbarkeit als in anderen Rinderrasen, als mögliche Folge einer von der Spezies abhängigen Biotransformationsleistung in der Leber (Chiu et al., 1986, 1987; Ndong et al., 2005). Neben speziesspezifischen Unterschieden besteht auch, besonders bei topischer Anwendung, ausgeprägte individuelle Varianz in der Bioverfügbarkeit (Sallovitz et al., 2002).

2.4. Körpergewichtsentwicklung

In der vorliegenden Arbeit zeigten die zu Versuchsbeginn nahezu gleich schweren Tiere der behandelten und unbehandelten Gruppe signifikant unterschiedliche Gewichtsentwicklungen. Zum Versuchsende waren behandelte Tiere signifikant schwerer als die unbehandelten Tiere. Diese Beobachtung ist im Einklang mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen (Tobin, 1962; Meleney und Fisher, 1979; Guillot und Cole, 1984; Cole und Guillot, 1987; Lonneux et al., 1996, 1997; Rehbein et al., 2002). Negative Einflüsse einer *P. ovis*-Infektion auf die Körpergewichtsentwicklung sind auch beim Schaf beschrieben (Sargison et al., 1995; Rehbein et al., 2000a; Meintjes et al., 2002). Die im Vergleich zu den behandelten Tieren reduzierte Körpergewichtsentwicklung wird als Summation mehrerer Effekte gewertet. Die Infektion mit *P. ovis* führt zu einer reduzierten Retention der mit der Nahrung aufgenommenen Energie und steigert für jede 10% mehr alterierte Körperoberfläche den Erhaltungsbedarf um 0,5 mcal ME pro Tag (Cole und Guillot, 1987). Im Hinblick auf die reduzierte Energieretention kommt der sowohl bei Schafen als auch Rindern beobachteten verminderten Quantität und Qualität des Wiederkauens eine wichtige Bedeutung zu (Corke und Broom, 1999; De Bonte et al., 2009).

Durch eine signifikante Abnahme der Kauschläge pro Bolus wird die Nahrung weniger effektiv zerkleinert und konsekutiv weniger effektiv durch die Pansenflora fermentiert.

Daneben sind die von infizierten Tieren gegen den Juckreiz gerichtete Bewegungen wie Kratzen, Scheuern und Benagen mit einem Verlust an Energie und einer Beeinträchtigung der Ruhephasen, an die die Rumination gebunden ist, verbunden. Über die entzündlich veränderte Haut verlieren infizierte Tiere ein proteinreiches Exsudat (Stromberg und Fisher, 1986). Zudem ist die isolierende und schützende Funktion der Haut gestört. Die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur und die Immunantwort auf potenzielle Sekundärinfektionen der Haut sind ebenfalls energiezehrende Prozesse. Im Rahmen der bestehenden *P. ovis*-Infektion werden vermehrt Proteine, die mit Entzündung assoziiert sind, synthetisiert (Coles, 1967; Fisher und Crookshank, 1982). Aus der Leber stammen die sogenannten Akute-Phase-Proteine wie Fibrinogen, Plasminogen, C-reaktives Protein sowie Komplementfaktoren. Im späteren Verlauf kommen die von B-Zellen generierten Immunglobuline hinzu. Einen bedeutenden Einfluss auf den Energiehaushalt haben die in der Nebennierenrinde synthetisierten Glukokortikoide (Ogwu et al., 1992). Diese wirken katabol, das heißt, unter ihrem Einfluss werden Protein- und Fettdepots mit dem Ziel der Energiemobilisation abgebaut. Erhöhte Serumkortisolspiegel werden im Allgemeinen mit Stress in Verbindung gebracht. Studien an verschiedenen Säugetieren haben gezeigt, dass chronischer Stress mit depressiver Wirkung auf das Körpergewicht einhergeht (Suleman et al., 2000; Otten et al., 2004; Ulrich-Lai et al., 2006). Mit der Beeinträchtigung der Ruhephasen und physiologischer Prozesse wie die Digestion ist die Infektion mit *P. ovis* als eine solche Stresssituation zu werten. Die kurz vor der Schlachtung bestimmten Serumkortisolspiegel zeigten zum Teil eine starke Streuung zwischen den einzelnen Individuen. Der durchschnittliche Wert lag bei nicht infizierten Tieren nur geringgradig höher als bei unbehandelten Tieren, dieser Effekt liegt jedoch in der verhältnismäßig kleinen Tierzahl in der nicht infizierten Gruppe begründet.

2.5. Haut

Die Haut im Bereich des Widerristes als Ort der Infektion war bei unbehandelten Tieren signifikant dicker als bei behandelten Tieren und entsprechenden, nicht milbenalterierten Proben der Kontrolltiere. Dabei rührte die größere Dicke vor allem aus einer Höhenzunahme des Stratum papillare. Zwar zeigte sich auch die Epidermis im Bereich des Widerristes der unbehandelten Tiere signifikant gegenüber der Epidermis behandelter und Kontrolltiere verdickt, jedoch leistet diese Schicht aufgrund ihrer insgesamt vergleichsweise geringen Stärke einen vernachlässigbaren Beitrag zur gesamten Dickenzunahme der Haut. Im Übrigen decken sich die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte der Epidermisdicke bei behandelten Tieren und Kontrolltieren mit in der Literatur beschriebenen Daten für die Epidermis von Rindern (Monteiro-Riviere et al., 1990; Stahl et al., 2009). Die Verdickung des Stratum papillare war vor allem bedingt durch ein massives entzündliches Ödem, welches in anderen Studien ebenfalls beschrieben wurde (Stromberg und Fisher, 1986; Van Den Broek et al., 2004). Verantwortlich für die Ödematisierung sind vasoaktive Substanzen, die die Permeabilität der Gefäßwände verändern. Dabei ist vor allem das in großen Mengen in Mastzellen gespeicherte Histamin zu nennen. Neben der Wirkung auf die Permeabilität wird durch Histamin auch die Gefäßweite beeinflusst. Die ausgeprägte Hyperämie des Stratum papillare infizierter Tiere, die in Proben der Kontrolltiere nicht vorlag, steht im Einklang mit der Wirkung von Histamin.

Die Alteration der Dicke der Epidermis und des Stratum papillare spiegelt sich auch im Vergleich der Volumendichten dieser Schichten an der Haut wider. Diese wurden ebenfalls an den HE-gefärbten GMA/MMA-Schnitten bestimmt. In Proben des Widerristes waren die Volumendichten von Epidermis und Stratum papillare bei unbehandelten Tieren signifikant größer als bei behandelten Tieren und Kontrolltieren. Die Volumendichten beider Hautschichten zeigten hingegen zwischen der behandelten und der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied.

Dies verdeutlicht, dass der nicht therapierte Milbenbefall vor allem diese beiden oberflächlichen Hautschichten alteriert.

Während die gefäßfreie Epidermis proliferiert, morphologisch durch zahlreiche Mitosen im Stratum basale und verlängerte Reteleisten gekennzeichnet, zeigt das Stratum papillare eine Volumenzunahme durch entzündlich bedingte Ödematisierung und Hyperämie. Induziert wird die epidermale Proliferation möglicherweise durch biologisch aktive Komponenten wie diverse Enzyme, die aus *P. ovis* isoliert wurden (Nisbet und Billingsley, 2000, 2002; Kenyon und Knox, 2002; Kenyon et al., 2003; Nisbet et al., 2006). Mit der gesteigerten Proliferation der Epidermis verbunden ist die in Proben der infizierten Tiere nachgewiesene und in der Literatur beschriebene Hyperkeratose (Losson et al., 1999; Van Den Broek et al., 2004). Diese Verhornungsstörung schafft auf der geschädigten Epidermis eine günstige Mikroumgebung für Bakterien, welche in Proben der infizierten Tiere nachzuweisen waren und zu einer Exazerbation der Dermatitis beitragen können (Losson et al., 1999). Aus *P. ovis* konnten Mykoplasmen kultiviert beziehungsweise diverse Bakterien isoliert werden (Cottew und Yeats, 1982; Damassa und Brooks, 1991; Mathieson und Lehane, 1996; Hogg und Lehane, 1999, 2001; Bates, 2003). Unklar ist, ob diese primär mit der Milbe oder mit der läsionierten Haut assoziiert sind; daher bedarf es weiterer Studien, ob und inwieweit *P. ovis* zu der bakteriellen Kontamination beiträgt.

In Proben aus dem Widerrist als Ort der Infektion wiesen die unbehandelten Tiere eine signifikant größere Anzahl von Kernanschnitten sowohl eosinophiler Granulozyten als auch Mastzellen pro Fläche gegenüber den Kontrolltieren als auch den behandelten Tieren auf. Die hier ermittelten Werte stellen die situativen Verhältnisse des Tages 112 post infektionem (p. i.) dar. Ein Vergleich dieser Werte mit Literaturangaben ist aufgrund fehlender ähnlicher Langzeitstudien nicht möglich. Die Studien von van den Broek et al. (2004) erfassen ein Zeitfenster von maximal 84 Tagen p. i., zudem wurden die Daten an infizierten Schafen erhoben, die möglicherweise eine vom Rind abweichende zelluläre Antwort auf die Infektion mit *P. ovis* zeigen.

Anzumerken ist jedoch, dass bei Schafen 84 p. i. die entzündliche Infiltration rückläufig war. Die am Tag 84 p. i. bei den Schafen ermittelte, gegenüber den bei den Rindern am Tag 112 p. i. erhobene, geringere numerische Flächendichte eosinophiler Granulozyten mag bedingt sein durch die wesentlich schwächere Infektionsdosis von 25-50 gegenüber den in der vorliegenden Studie pro Rind eingesetzten 2000 Milben. Der Influx von eosinophilen Granulozyten in entzündete Hautbereiche scheint durch Stoffe induziert zu werden, die in der Milbe vorhanden sind oder von ihr generiert werden (Wildblood und Jones, 2007). Werden die Milben durch eine akarizide Therapie eliminiert, kann der auf der Haut verbleibende Milbenkot durch sukzessive Freisetzung der darin möglicherweise enthaltenden Stoffe den chemotaktisch gesteuerten Influx von eosinophilen Granulozyten in die Haut aufrechterhalten. Milbenkot, der auf die Hintergliedmaße gelangte, könnte so die signifikant stärkere Präsenz eosinophiler Granulozyten auch in den Hautproben aus dem Bereich des Tarsus infizierter Tiere gegenüber Kontrolltieren bedingen. Eosinophile Granulozyten sind gleichermaßen an Schutz und Zerstörung von Gewebe beteiligt (Munitz und Levi-Schaffer, 2004; Williams, 2004), in den vorliegenden Hautproben infizierter Rinder beobachtete und auch in der Literatur beschriebene Ulzerationen (Sargison, 2005) sind möglicherweise auf die Exozytose der in Vesikeln gespeicherten Inhaltsstoffe von eosinophilen Granulozyten wie Peroxidase und major basic protein zurückzuführen. Ulzerationen der Epidermis können jedoch auch durch Automutilation, induziert durch Pruritus, hervorgerufen werden. Das aus Mastzellen stammende Histamin ist ein potentes Pruritogen (Greaves und Wall, 1996) und möglicherweise an der Entstehung der oben erwähnten Ulzerationen beteiligt. Die Auslöser für eine vermehrte Migration von Mastzellen sind nicht hinreichend identifiziert, als potente Attraktoren für Mastzellen gelten beim Menschen unter anderem jedoch der sogenannte Stem-cell-factor, Komplementfaktoren wie C3a und C5a, IL- 8 und Mitglieder der TGF-(Transforming Growth-Factor)- β -Familie (Nilsson et al., 1994; Hartmann et al., 1997; Lippert et al., 1998; Olsson et al., 2000).

Die numerische Flächendichte von Mastzellen in Hautproben aus dem Bereich des Widerristes war sowohl bei unbehandelten Tieren als auch behandelten Tieren gegenüber Kontrolltieren signifikant größer. Die ermittelten Werte liegen jedoch deutlich unter den in der Literatur beschriebenen Werten. Diese Diskrepanz ist möglicherweise bedingt durch die Fixierung der Hautproben in Formaldehydlösung, die zu einer reduzierten Erkennbarkeit selektiv einer Subpopulation von Mastzellen führt (Küther et al., 1998).

2.6. Buglymphknoten

Die regionären Buglymphknoten zeigten bei der Sektion deutliche Größen- und signifikante Gewichtsunterschiede zwischen den unbehandelten und den behandelten Tieren, während die Buglymphknoten der behandelten Tiere und Kontrolltiere nahezu gleich groß und schwer waren. Lymphknotenvergrößerungen sind bei Infektion mit Räudemilben beschrieben (Minihan et al., 2002; Rehbein et al., 2003). Die Volumenzunahme regionaler Lymphknoten ist eine bei Entzündungen im tributären Gebiet nach uniformem Muster ablaufende und typische Reaktion. Jedoch existieren keine vergleichbaren morphometrischen Daten. In der vorliegenden Arbeit wurden die Volumendichten von Keimzentren, sonstigem lymphatischen (parafollikulären) und nichtlymphatischen Geweben im Lymphknoten und die Gesamtvolumina dieser Kompartimente ermittelt. Ein Vergleich der dabei erhobenen Befunde ist aufgrund fehlender ähnlicher Studien nicht möglich. Infizierte Tiere wiesen signifikant höhere Volumendichten der lymphatischen Kompartimente gegenüber den Kontrolltieren auf, wobei in den Lymphknoten unbehandelter Tiere gegenüber behandelten Tieren signifikant höhere Volumendichten dieser Kompartimente nachzuweisen waren.

Kontrolltiere zeigten im Gegensatz dazu eine signifikant höhere Volumendichte des nichtlymphatischen Kompartiments gegenüber den infizierten Tieren, wobei behandelte Tiere eine signifikant größere Volumendichte dieses Kompartimentes gegenüber unbehandelten Tieren aufwiesen. Diese Relativgrößen spiegeln die Reaktion der in die Immunantwort eingeschalteten Lymphknoten wieder. Die Absolutvolumina von sonstigem lymphatischem Gewebe und Keimzentren in den Lymphknoten unbehandelter Tiere waren signifikant größer gegenüber den entsprechenden Volumina in Lymphknoten behandelter und Kontrolltiere. An der Volumendichte des nichtlymphatischen Gewebe im Lymphknoten und dessen absolutes Volumen lässt sich jedoch sehr eindrucksvoll ein Phänomen demonstrieren: Die Volumendichte des nichtlymphatischen Gewebes als Relativwert ist bei den Kontrolltieren signifikant größer als bei beiden infizierten Gruppen. Der Absolutwert, das Gesamtvolumen hingegen ist jedoch bei unbehandelten Tieren signifikant größer als bei den Kontrolltieren. Für die Beurteilung von Relativwerten ist schlussfolgernd immer die Größe des Referenzvolumens mit zu betrachten. Die Missachtung dieser Notwendigkeit kann zu dem in der stereologischen Literatur als sogenannten "reference trap" bekannten Phänomen führen (Gundersen et al., 1988a).

Die Proliferation der Keimzentren repräsentiert das morphologische Äquivalent der gesteigerten Antikörperproduktion. Die Zunahme der Volumendichte der parakortikalen Region im Lymphknoten hingegen wird als wichtiger Parameter für chronischen Antigenstimulus betrachtet (Myking, 1980). Eine Beteiligung der aus *P. ovis* isolierten und Homologie zu Hausstaubmilbenallergenen aufweisenden Stoffe (Pruett, 1999; Kenyon und Knox, 2002; Lee et al., 2002a, 2002b; Kenyon et al., 2003; Huntley et al., 2004; Nisbet et al., 2006), erscheint hierbei möglich. Diese Analoga sollen mit dem Kot der Milbe auf die Haut des Wirtes und aufgrund ihres geringen relativen Molekulargewichtes zellunabhängig via Lymphe in den Lymphknoten gelangen (Sixt et al., 2005).

Die mit der Proliferation von B-Lymphozyten in den Keimzentren einhergehende reaktive Hyperplasie führt je nach Ausmaß des auslösenden Stimulus zu einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Volumenzunahme des Lymphknotens. Dabei hängt die Geschwindigkeit dieser Reaktion davon ab, ob der proliferationsinduzierende Stimulus zellgebunden oder in der Lymphflüssigkeit gelöst in den Lymphknoten gelangt. Die bei den Versuchstieren dieses Experimentes applizierte Infektionsdosis von ca. 2000 *P. ovis*-Milben pro Tier dürfte gemessen an der für antiparasitäre Effizienzstudien empfohlenen Mindestdosis von 50 bis 100 *P. ovis*-Milben als ein starker Stimulus betrachtet werden, der in der entsprechenden Volumenzunahme der Lymphknoten infizierter nicht behandelter Tiere sich morphologisch widerspiegelt. Die Therapie des Milbenbefalls bewirkte eine signifikante Abschwächung der reaktiven Hyperplasie, da durch die Eliminierung der Milben die Produktion und das Aufbringen entzündungsstimulierender Faktoren auf die Haut beendet wurden.

2.7. Nebennieren

Behandelte und unbehandelte Tiere sowie Kontrolltiere zeigten nur geringe Unterschiede in der Größe ihrer Nebennieren. Die Nebennieren der unbehandelten Tiere waren jedoch signifikant schwerer als die entsprechenden Organe der beiden anderen Gruppen. Ähnliche Verhältnisse zeigten sich in einer mit dieser vergleichbaren Studie an den Nebennieren von mit *Sarcoptes* und *Chorioptes* infizierten Rindern und den mitgeführten nicht infizierten Kontrolltieren (Rehbein et al., 2003).

Die Volumendichte der Zona fasciculata war bei unbehandelten Tieren signifikant größer als bei behandelten Tieren, während umgekehrt die Volumendichte der Zona glomerulosa bei behandelten Tieren signifikant größer als bei unbehandelten Tieren war. Anhand der ermittelten Volumendichten wurden die Gesamtvolumina der einzelnen Nebennierenrindenzonen und des Markes in den Nebennieren berechnet.

Unbehandelte Tiere wiesen ein signifikant größeres Volumen der Zona fasciculata gegenüber behandelten Tieren und Kontrolltieren auf, während zwischen den behandelten Tieren und den Kontrolltieren kein signifikanter Unterschied im Volumen der Zona fasciculata bestand. Da weder das Volumen der Zona glomerulosa noch des Markes signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen zeigte, ist das signifikant größere Volumen der gesamten Nebenniere unbehauelter Tiere gegenüber den anderen beiden Gruppen allein auf das größere Volumen der Zona fasciculata zurückzuführen.

Zur Klärung, ob der Zona fasciculata abhängige Volumenunterschied der Nebennieren einer Vermehrung und/oder Vergrößerung der Zellen dieser Zone zugrunde liegt, wurde eine stereologische Schätzung von Anzahl und mittlerem Volumen der Zona fasciculata-Zellen in der Nebenniere vorgenommen. Quantitativ-stereologische Methoden sind die einzige Möglichkeit, zuverlässige Informationen über Zellzahl und Zellgröße zu erhalten (Bielohuby et al., 2007). Das Volumen dieser Zellen wies zwischen den drei Gruppen keinen signifikanten Unterschied auf, jedoch konnte bei unbehauelten Tieren gegenüber behandelten Tieren eine signifikant größere Anzahl von Zona fasciculata-Zellen in den Nebennieren nachgewiesen werden. Somit konnte das größere Volumen der Nebennieren mit *P. ovis* infizierter, unbehauelter Rinder auf eine Hyperplasie der Zona fasciculata-Zellen zurückgeführt werden. Eine zum Versuchsende bei allen Tieren entnommene Blutprobe zeigte zwischen den drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede der bis auf bei zwei unbehauelten Tieren im Referenzbereich liegenden Kortisolkonzentrationen im Serum. An Mäusen konnte gezeigt werden, dass sowohl Kortikosteron- als auch Kortisolhypersekretion eher an eine Hypertrophie als an Hyperplasie der Zona fasciculata-Zellen gebunden ist (Hoeflich et al., 2002; Bielohuby et al., 2007).

Diese Beobachtung deckt sich auch mit an durch Dauerlicht gestressten Ratten erhobenen Befunden (Milosevic et al., 2005). Interessanterweise waren die Nebennieren dieser Tiere im Gegensatz zu den Nebennieren nicht durch Licht gestresster Kontrolltiere signifikant kleiner, während das absolute Volumen der Zona fasciculata bei den gestressten Tieren signifikant größer als bei den nicht gestressten Ratten war. Studien mit Hitzestress beziehungsweise Lärm ausgesetzten Ratten wiederum zeigen eine Volumenreduktion der Zona fasciculata (Koko et al., 2004; Oliveira et al., 2009). Insofern scheint die Antwort der Nebenniere auf Stress abhängig von dem auslösenden Stimulus zu sein.

Ergebnisse aus unterschiedlichen Studien beim Rind zeigen, dass die Konzentration von Kortisol im Serum beim Rind nicht unbedingt als Langzeitstressparameter geeignet ist (Ley et al., 1996; Munksgaard und Simonsen, 1996; Walker et al., 2008). Selbst kontinuierliche Schmerzzustände müssen nicht zwingend mit erhöhten Serumkortisolspiegeln einhergehen (Ley et al., 1996). Eine Serumkortisolkonzentration innerhalb des Referenzbereiches bei chronischer Stressexposition spiegelt entweder eine verminderte Wahrnehmung des Stressors oder einen Mechanismus des Organismus gegen protrahierte und/oder kontraproduktive Kortisolexposition wider (Knights und Smith, 2007). Ein solcher Mechanismus beim Rind ist beispielsweise die verminderte Expression der ADH- und CRH-Rezeptoren V3 und CRFR1 in der Hypophyse nach systemischer Applikation von Lipopolysaccharid (LPS) (Qahwash et al., 2002). Die entzündungshemmende Wirkung der Glukokortikoide ist bei einer Infektion nicht unbedingt von Nutzen, da die Migration von Entzündungszellen in entzündete Gewebe durch die Glukokortikoide gehemmt wird. Im Blut der mit LPS manipulierten Rindern zirkulierte weniger ACTH und folglich weniger Kortisol. Dieser Mechanismus zur Vermeidung einer gesteigerten Kortisolsekretion wäre auch bei den mit *Psoroptes* infizierten Rindern aus zwei Gründen denkbar: Einerseits ist das infizierte Rind auf die Migration von Entzündungszellen in die Haut angewiesen.

Mit der Infektion und der Gewebeschädigung geht eine Ulzeration der Epidermis einher, die eine Sekundärinfektion mit Bakterien begünstigt. Diese, und hier vor allem die gramnegativen, möglicherweise mit den Milben assoziierten Bakterien könnten aufgrund der LPS-Wirkung auf den Wirtsorganismus für die nicht erhöhten Serumkortisolspiegel mit verantwortlich sein. Dieser Mechanismus verdeutlicht, warum Serumkortisolkonzentrationen nicht unbedingt einen aussagekräftigen Parameter zur Beurteilung von Langzeitstress darstellen. Prolongierter Stress in Form von persistierenden Hautinfektionen, widrigen Haltungsbedingungen und lang andauernden Tiertransporten führt bei Rindern hingegen zu Gewichtsveränderungen der Nebennieren und morphometrisch erfassbaren Veränderungen in der Nebennierenrinde (Hartmann, 1974; Makumyaviri et al., 1985; Wilson, 2002; Rehbein et al., 2003). Die zonenspezifische Volumenzunahme wird daher als adaptive Reaktion der Nebenniere unbehandelter Tiere auf eine durch den persistierenden Milbenbefall induzierte und prolongierte Stresssituation angesehen. Als Ursache dieser Volumenzunahme konnte im Rahmen der vorliegenden Studie erstmalig eine Hyperplasie der Zona fasciculata-Zellen identifiziert werden. Daher erlauben quantitativ-stereologische Analysen im Gegensatz zu den sowohl schnell ansteigenden als auch sinkenden und durch die Wirkung anderer Faktoren beeinflusster Serumkortisolkonzentrationen eine retrograde Beurteilung der Verhältnisse in der Nebenniere im Hinblick auf Langzeitstress.

3. Schlussfolgerung und Ausblick

Ein Teil der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten bestätigt bereits bekannte Aspekte der *P. ovis*-Infektion beim Rind. Darüber hinaus wurden mit dieser Studie erstmalig durch den Milbenbefall induzierte Alterationen an regionären Lymphknoten und Nebennieren durch morphometrische und quantitativ stereologische Methoden quantifiziert. Ebenso konnte durch die erhobenen Daten der Einfluss einer akariziden Therapie auf die milbeninduzierten Alterationen der hier untersuchten Organe objektiviert werden.

Die Serumkortisolkonzentration war zwischen den Tieren der behandelten und unbehandelten Gruppe sowie der Kontrollgruppe nicht signifikant verschieden. Die erhobenen quantitativ-stereologischen Befunde hingegen zeigen, dass bei nicht behandelten Tieren der Milbenbefall zu einer selektiven Volumenzunahme der Zona fasciculata führt, die wiederum durch eine Hyperplasie der Zona fasciculata Zellen bedingt wird. Dieser Befund wird als Effekt eines prolongierten, durch den untherapierten Befall mit *P. ovis* unterhaltenen Langzeitstress angesehen. Die quantitativ-stereologischen Untersuchungen an den Nebennieren zeigen somit ihre Eignung, Veränderungen zu erfassen, die weder durch Laborparameter noch durch die herkömmliche histologische Befundung zu diagnostizieren sind.

Das deutsche Tierschutzgesetz in seiner aktuellen Fassung würdigt die besondere Bedeutung des Terminus „Wohlbefinden“, indem es diesen bereits im ersten Satz des § 1 anführt. Eine Infektion mit *P. ovis* bedingt eine Änderung des Verhaltens betroffener Tiere. Verhaltensmuster wie Ruhen und Wiederkauen, die sowohl mit Wohlbefinden assoziiert als auch für einen ungestörten Ablauf physiologischer Prozesse unabdingbar sind, werden durch den Milbenbefall beeinträchtigt (Berriatua et al., 2001; De Bonte et al., 2009). Neben der ökonomischen Bedeutung muss die Infektion mit *P. ovis* somit auch als ein tierschutzrechtlich relevantes Problem betrachtet werden.

VI. Zusammenfassung

Psoroptes ovis ist eine weltweit vorkommende Räude milbe, die auf der Haut vieler Säugetierspezies parasitiert. Der Befall mit *Psoroptes ovis* führt bei den Wirten zur Entwicklung schwerer exsudativer Dermatitis. Bei infizierten Rindern können durch reduzierte Effizienz der Futtermittelverwertung und Minderung der Lederqualität erhebliche wirtschaftliche Verluste entstehen. Über mögliche, durch den Milbenbefall bedingte Alterationen innerer Organe existieren nur wenige Informationen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen einer experimentellen *Psoroptes ovis*-Infektion beim Rind auf die Haut, die regionären Lymphknoten und die Nebennieren sowie der Einfluss einer akariziden Therapie auf die Alteration dieser Organe untersucht. Zweiunddreißig Fleckviehbullen wurden im Alter von 39 ± 3 Wochen experimentell mit *Psoroptes ovis* infiziert. 56 Tage post infektionem wurde die Hälfte der Tiere ($n = 16$) mit einem Akarizid behandelt, die andere Hälfte der Tiere ($n = 16$) verblieb unbehandelt. Zum Versuchsende nach weiteren 56 Tagen wurden die Tiere geschlachtet und die Buglymphknoten, Nebennieren sowie Hautproben aus dem Bereich der Rändeläsionen am Widerrist und aus einem makroskopisch unveränderten Hautareal (Tarsus) entnommen. Entsprechende Proben von 4 nicht infizierten, nicht behandelten 43 ± 1 Wochen alten Tieren dienten als Kontrolle. Die Proben wurden mittels qualitativer und quantitativ-morphologischer Verfahren analysiert. Der Befall mit *Psoroptes ovis* führte zu einer schweren, exsudativen, mitunter ulzerativen Dermatitis. Die Haut unbehandelter Tiere war im Vergleich zu behandelten Tieren und Kontrolltieren signifikant dicker und wies eine signifikant stärkere entzündliche Infiltration mit eosinophilen Granulozyten und Mastzellen auf. Die akarizide Therapie infizierter Tiere bewirkte sowohl eine Reduktion der reaktiven Dickenzunahme der Haut als auch eine Reduktion der entzündlichen Zellinfiltrationen bis auf das Niveau nicht infizierter Kontrolltiere.

Die Buglymphknoten unbehandelter infizierter Tiere waren schwerer und wiesen im Vergleich zu behandelten oder Kontrolltieren eine reaktive Hyperplasie mit Erhöhung der Volumendichten des parakortikalen lymphatischen Gewebes und der Keimzentren des Lymphknotens auf. Die Volumina des parakortikalen lymphatischen Gewebes, der Keimzentren sowie der nicht lymphatischen Lymphknotenkompartimente waren bei unbehandelten Tieren signifikant größer als bei behandelten Tieren und Kontrolltieren. Die akarizide Therapie führte zu einer Normalisierung der Volumina der verschiedenen Lymphknotenkompartimente auf das Niveau von Kontrolltieren. Das Volumen der Nebennieren war bei unbehandelten Tieren gegenüber behandelten Tieren und Kontrolltieren signifikant größer. Mittels quantitativ-stereologischer Untersuchungen konnte eine selektive Volumenzunahme der Zona fasciculata der Nebennierenrinde als Ursache der Volumenvergrößerung der Nebennieren infizierter unbehandelter Tiere identifiziert werden. Diese selektive Volumenzunahme der Zona fasciculata war durch eine signifikante Erhöhung der absoluten Anzahl der Zona fasciculata-Zellen bei infizierten unbehandelten Tieren gegenüber infizierten behandelten Tieren bedingt. Zwischen infizierten behandelten Tieren und Kontrolltieren bestand kein signifikanter Unterschied in der Gesamtzahl der Zona fasciculata-Zellen. Die mittleren Volumina der Zona fasciculata-Zellen der Tiere der drei Untersuchungsgruppen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Diese Untersuchungsergebnisse zeigen somit erstmalig, dass die durch die *Psoroptes ovis*-Infektion induzierte Volumenvergrößerung der Nebennieren durch ein selektives hyperplastisches Wachstum der Zellen der Zona fasciculata der Nebennierenrinde bedingt ist. Die Hyperplasie der Zona fasciculata als Folge eines nicht therapierten Milbenbefalles kann im Sinne einer adaptiven Reaktion der Nebenniere auf ein chronisches Stressgeschehen interpretiert werden. Die zum Versuchsende bestimmten Serum-Kortisolkonzentrationen waren zwischen unbehandelten und behandelten infizierten Tieren sowie Kontrolltieren nicht signifikant verschieden.

Sie stellen daher einen weniger sensitiven Parameter zur Beurteilung von Langzeitstressgeschehen dar. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gebieten daher auch unter dem Aspekt des Tierschutzes die therapeutische Intervention bei Befall mit *Psoroptes ovis* und stellen die Basis für weiterführende Studien zur Erforschung systemischer Wirkungen ektoparasitärer Infektionen und anderer chronischer Stressgeschehen beim Rind dar.

VII. Summary

Psoroptes ovis is an ubiquitous mite, parasitizing on the skin of a broad range of mammals. Mite-infestation induces dermatitis and an inflammatory exsudate, which serves as food source for the mites. In cattle, *Psoroptes ovis* infections may cause serious financial losses due to reduced feed conversion efficiencies of infected animals and impaired leather quality of affected skins. However, little is known about potential effects of *Psoroptes ovis* infections on alterations of inner organs. The present work analyzed the effects of an experimental *Psoroptes ovis* infection, as well as the effects of an acaricidal treatment of cattle on alterations of the skin, the regional lymph nodes and the adrenal glands.

Thirty-two German Fleckvieh bulls, aged 39 ± 3 weeks, were experimentally infested with *Psoroptes ovis*. Eight weeks after infestation, sixteen of these animals were treated with an acaricide, while the other 16 animals remained untreated. Four non-infected and not treated 43 ± 1 weeks aged bulls served as control group. At the end of the trial after another eight weeks, the prescapular lymph nodes, the adrenal glands and specimens of the skin from altered and unaffected localisations were taken and processed for histopathological evaluation, morphometrical and quantitative stereological analysis. Infestation with *Psoroptes ovis* induced the development of a severe, exsudative, occasionally ulcerative dermatitis. As evidenced by morphometric analyses, these alterations were associated with a significant thickening of the skin and a significantly increased infiltration of inflammatory cells into all skin layers in untreated infected animals versus treated or control animals. The acaricidal therapy resulted in both a reduction of reactive skin thickening and a reduction of inflammatory infiltration to the level of uninfected control animals. The prescapular lymph nodes of untreated infected animals displayed a significantly increased weight, reactive hyperplasia and a significantly increased volume density of paracortical lymphatic tissue as compared to treated or control animals.

The volumes of the paracortical lymphatic tissue, the germinal centers and non lymphoid tissues were in untreated animals compared to both treated and control animals significantly increased. In treated animals, the acaricidal therapy lead to normalization of the volumes of the different lymph-node compartments to the level of non infected animals. In the adrenal glands, the untreated infections with *Psoroptes ovis* caused a significant increase of the organ volumes, due to a selective increase of the volume of the zona fasciculata in the adrenal cortex. By quantitative stereological analyses, the increase of the volume of the zona fasciculata in the adrenal cortex of untreated infected animals versus treated or control animals, was demonstrated to originate from a significant increase of the numbers of the zona fasciculata cells, while their mean cellular volumes remained unaltered between the different animal cohorts. Between treated and control animals was no significant difference in the total number of zona fasciculata cells.

The observation of a reactive hyperplastic growth of zona fasciculata cells following a prolonged infection with *Psoroptes ovis* mites is interpreted as an unspecific reaction of the adrenal cortex due to long-term stress events. Otherwise, the serum concentrations of cortisol, which were determined at the end of the trial, displayed no significant differences between treated, untreated and control animals. This means that quantitative morphological studies are suitable to detect changes in organs that can not be detected by laboratory parameters.

The results of this for the first time in *Psoroptes ovis* infection performed morphometric and quantitative-stereological studies on the adrenal glands provide the basis for further studies to explore systemic effects of ectoparasitic infections and other stressful events in cattle. The findings from economic point of view, and under the aspect of animal protection, strongly demands the therapeutic intervention in *Psoroptes ovis* infestation.

VIII. Literaturverzeichnis

Abolins S, Thind B, Jackson V, Luke B, Moore D, Wall R, Taylor MA (2007): Control of the sheep scab mite *Psoroptes ovis* in vivo and in vitro using fungal pathogens. *Vet Parasitol* **148**, 3-4, 310-317.

Alnaaimi OA, Al-Badrani BA (2010): Diagnosis of psoroptic mange in sheep by modified modified ELISA test
J Anim Vet Adv **9**, 13, 1880-1884.

Andreis PG, Neri G, Rebuffat P, Gottardo G, Mazzocchi G, Nussdorfer GG (1990): Stereological and functional investigations on isolated adrenocortical cells. III. Zona glomerulosa cells of chronically ACTH-treated rats. *J Anat* **168**, 199-207.

Antico A (2004): Morphometry in skin-test methodological studies--validation of the point-counting technique for precise area determination. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* **36**, 6, 219-224.

Appleby EC, Sohrabi I (1978): Pathology of the adrenal glands and paraganglia. *Vet Rec* **102**, 76-78.

Bahmer FA, Smolle J (1992): Morphometry in clinical dermatology. *Acta Derm Venereol* **72**, 1, 52-55.

Banchereau J, Steinman RM (1998): Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 6673, 245-252.

Barth D, Visser M (1985): Comparison of two methods for counting living mites in skin scrapings. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A* **260**, 412.

Bassett JR, West SH (1997): Vascularization of the adrenal cortex: Its possible involvement in the regulation of steroid hormone release. *Microsc*

Res Tech **36**, 6, 546-557.

Bates PG, Groves BA, Courtney SA, Coles GC (1995): Control of sheep scab (*Psoroptes ovis*) on artificially infested sheep with a single injection of doramectin. *Vet Rec* **137**, 19, 491-492.

Bates PG (1996a): Epidemiology of subclinical ovine psoroptic otoacariasis in great britain. *Vet Rec* **138**, 16, 388-393.

Bates PG (1996b): Ovine psoroptic otoacariasis: An abattoir survey. *Vet Rec* **139**, 10, 235-236.

Bates P (2003): Bacterial associations with the sheep scab mite (*Psoroptes ovis*). *Vet Rec* **152**, 7, 206-208.

Bates P (2004): Therapies for ectoparasiticism in sheep. *In Pract.* **26**, 10, 538-547.

Baulieu EE (1998): Neurosteroids: A novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* **23**, 8, 963-987.

Berriatua E, French NP, Wall R, Smith KE, Morgan KL (1999): Within-flock transmission of sheep scab in naive sheep housed with single infested sheep. *Vet Parasitol* **83**, 3-4, 277-289.

Berriatua E, French NP, Broster CE, Morgan KL, Wall R (2001): Effect of infestation with *Psoroptes ovis* on the nocturnal rubbing and lying behaviour of housed sheep. *Appl Anim Behav Sci* **71**, 1, 43-55.

Bielohuby M, Herbach N, Wanke R, Maser-Gluth C, Beuschlein F, Wolf E, Hoefflich A (2007): Growth analysis of the mouse adrenal gland from weaning to adulthood: Time- and gender-dependent alterations of cell size and number in the cortical compartment. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**, 1, E139-146.

Bisdorff B, Wall R, Milnes A (2006): Prevalence and regional distribution of scab, lice and blowfly strike in Great Britain. *Vet Rec* **158**, 22, 749-752.

Blanco A, Monterde JG, Mendez A, Artacho-Perula E (2001): Stereological study of normal and apoptotic cell populations in the adrenal gland in calves. *Cells Tissues Organs* **169**, 1, 73-80.

Boyce WM, Brown RN (1991): Antigenic characterization of *Psoroptes* spp. (Acari: Psoroptidae) mites from different hosts. *J Parasitol* **77**, 5, 675-679.

Boyce WM, Mazet JAK, Mellies J, Gardner I, Clark RK, Jessup DA (1991): Kinetic ELISA for detection of antibodies to *Psoroptes* sp. (Acari: Psoroptidae) in bighorn sheep (*Ovis canadensis*). *J Parasitol* **77**, 5, 692-696.

Brooks AJ, Wall R (2001): Infection of *Psoroptes* mites with the fungus *Metarhizium Anisopliae*. *Exp Appl Acarol* **25**, 10, 869-880.

Brooks A, Wall R (2005): Horizontal transmission of fungal infection by *Metarhizium Anisopliae* in parasitic *Psoroptes* mites (Acari: Psoroptidae). *Biol Control* **34**, 1, 58-65.

Buechler PR, Hannigan, M.V., Carroll, R.J., Dahms, M.P., Fairheller, S.H., Meleney, W.P., Wright, F.C (1984): Studies of hyperkeratosis of cattle hides attributable to psoroptic scabies. *J Am Leather Chem As* **v. 79(11)**, 0002-9726, p. 416-434.

Butler LG, Head GM (1993): The medium frequency (7.5 mHz) ultrasound image characteristics of cattle skin. *Aust Vet J* **70**, 9, 344-347.

Bygrave A, Bates P, Daniel N (1993): Epileptiform seizure in ewes associated with sheep scab mite infestation. *Vet Rec* **132**, 15, 394-395.

Cannon WB (1928): Die Notfallfunktion des sympathiko-adrenalen Systems. *Ergeb Physiol* **27**, 380-460.

Carmichael SW, Winkler H (1985): The adrenal chromaffin cell. *Sci Am* **253**, 2, 40-49.

Carstens E, Moberg GP (2000): Recognizing pain and distress in laboratory animals. *ILAR J* **41**, 2, 62-71.

Caulfield JB (1957): Effects of varying the vehicle for OsO₄ in tissue fixation. *J of Biophys Biochem Cytol* **3**, 5, 827-830.

Cavadas C, Grand D, Mosimann F, Cotrim MD, Fontes Ribeiro CA, Brunner HR, Grouzmann E (2003): Angiotensin II mediates catecholamine and neuropeptide Y secretion in human adrenal chromaffin cells through the AT1 receptor. *Regul Peptides* **111**, 1-3, 61-65.

Chiu SH, Sestokas E, Taub R, Buhs RP, Green M, Sestokas R, Vandenheuvell WJ, Arison BH, Jacob TA (1986): Metabolic disposition of ivermectin in tissues of cattle, sheep, and rats. *Drug Metab Dispos* **14**, 5, 590-600.

Chiu SH, Taub R, Sestokas E, Lu AY, Jacob TA (1987): Comparative in vivo and in vitro metabolism of ivermectin in steers, sheep, swine, and rat. *Drug Metab Rev* **18**, 2-3, 289-302.

Chrousos GP (1998): Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response: The 1997 Hans Selye memorial lecture. *Ann NY Acad Sci* **851**, 1, 311-335.

Clark AM, Stephen FB, Cawley GD, Bellworthy SJ, Groves BA (1996): Resistance of the sheep scab mite *Psoroptes ovis* to propetamphos. *Vet Rec* **139**, 18, 451.

Clymer BC, Janes TH, McKenzie ME (1997): Evaluation of the therapeutic and protective efficacy of doramectin against psoroptic scabies in cattle. *Vet Parasitol* **72**, 1, 79-89.

Colbatzky F, Hermanns W (1987): Immunohistochemical demonstration of various antigens in tissues embedded in plastic. *Histochem J* **19**, 10, 589-593.

Cole NA, Guillot FS (1987): Influence of *Psoroptes ovis* on the energy metabolism of heifer calves. *Vet Parasitol* **23**, 3-4, 285-295.

Colebrook E, Wall R (2004): Ectoparasites of livestock in Europe and the mediterranean region. *Vet Parasitol* **120**, 4, 251-274.

Coles EH (1967): Veterinary clinical pathology, W.B. Saunders, Philadelphia. pp 455.

Coles GC (1998): Drug resistant parasites of sheep: An emerging problem in Britain? *Parasitol Today* **14**, 3, 86-88.

Conran RM, Nickerson PA (1982): Atrophy of the zona fasciculata in the adrenal cortex of thyroparathyroidectomized rats: A quantitative study. *Am J Anat* **164**, 2, 133-143.

Corke MJ, Broom DM (1999): The behaviour of sheep with sheep scab, *Psoroptes ovis* infestation. *Vet Parasitol* **83**, 3-4, 291-300.

Corke MJ, Broom DM (2000): Sheep scab: A questionnaire survey. In: *Proc Sheep Vet Soc* **24**. pp 115-121.

Cottew GS, Yeats FR (1982): Mycoplasmas and mites in the ears of clinically normal goats. *Aust Vet J* **59**, 3, 77-81.

Curtis SE (1983): Environmental management in animal agriculture. Iowa State University Press. pp 409.

DaMassa AJ, Brooks DL (1991): The external ear canal of goats and other animals as a mycoplasma habitat. *Small Ruminant Res* **4**, 1, 85-93.

De Bonte L, Vervaecke H, Laevens H, Vicca J, Kolkman I, Aerts S, Lips D (2009): Growth and behaviour in relation to skin lesion surface, *Animal Science and Biotechnologies*, 66, 1-2, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca

Dimri U, Sharma MC, Yamdagni A, Ranjan R, Zama MMS (2010): Psoroptic mange infestation increases oxidative stress and decreases antioxidant status in sheep. *Vet Parasitol* **168**, 3-4, 318-322.

Dirksen G, Gründer H-D, Stöber M (2006): Innere Medizin und Chirurgie des Rindes, Parey Stuttgart.

Döcke F (1994): Veterinärmedizinische Endokrinologie
3. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena-Stuttgart.

Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJ (2001): Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *J Microsc* **204**, Pt 3, 232-246.

Dorph-Petersen KA, Pierri JN, Perel JM, Sun Z, Sampson AR, Lewis DA (2005): The influence of chronic exposure to antipsychotic medications on brain size before and after tissue fixation: A comparison of haloperidol and olanzapine in macaque monkeys. *Neuropsychopharmacology* **30**, 9, 1649-1661.

Drummond RO, G. Lambert, H.E. Smalley, and S.E. Ted (1981): Estimated losses of livestock to pests. In: CRC handbook of pest management in agriculture, Eds: D. Pimentel, CRC Press, Boca Raton, FL.

Edwards AV, Jones CT (1994): Adrenal responses to the peptide PACAP in conscious functionally hypophysectomized calves. *Am J Physiol* **266**, 6 Pt 1, E870-876.

El-Khodery S, Osman S, Ishii M, Al-Gaabary M (2010): Risk factors of infestation by *Psoroptes spp.* Mites in buffalo (*Bubalus bubalis*) at smallholder farms in the Nile delta region, Egypt. *Trop Anim Health Pro* **42**, 2, 275-281.

El Gammal S, El Gammal C, Kaspar K, Pieck C, Altmeyer P, Vogt M, Ermert H (1999): Sonography of the skin at 100 mHz enables in vivo visualization of stratum corneum and viable epidermis in palmar skin and psoriatic plaques. *J Invest Dermatol* **113**, 5, 821-829.

Engeland WC, Ennen WB, Elayaperumal A, Durand DA, Levay-Young BK (2005): Zone-specific cell proliferation during compensatory adrenal growth in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**, 2, E298-306.

Faccini JL, Ribeiro VR (2008): *Raillietia caprae* (Acari: Raillietidae) and *Psoroptes ovis* (Acari: Psoroptidae) in the ears of goats in the state of Rio de Janeiro, southeast Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* **17**, 1, 59-61.

Falconi F, Ochs H, Deplazes P (2002): Serological cross-sectional survey of psoroptic sheep scab in Switzerland. *Vet Parasitol* **109**, 1-2, 119-127.

Fisher WF, Crookshank HR (1982): Effects of *Psoroptes ovis* (Acarina: Psoroptidae) on certain biochemical constituents of cattle serum. *Vet Parasitol* **11**, 2-3, 241-251.

Fisher WF (1983a): Detection of serum antibodies to psoroptic mite antigens in rabbits infested with *Psoroptes cuniculi* or *P. ovis* (Acari: Psoroptidae) by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and immunodiffusion. *J Med Entomol* **20**, 3, 257-262.

Fisher WF (1983b): Development of serum antibody activity as determined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to *Psoroptes ovis* (Acarina: Psoroptidae) antigens in cattle infested with *P. ovis*. *Vet Parasitol* **13**, 4, 363-373.

Fisher WF, Guillot FS, Cole NA (1986): Development and decline of serum antibody activity to *Psoroptes ovis* antigens in infested cattle in an endemic and nonendemic scabies area of Texas. *Exp Appl Acarol* **2**, 3, 239-248.

Flatmark (2000): Catecholamine biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells. *Acta Physiol Scand* **168**, 1, 1-17.

Foreyt WJ (1997): Contact transmission of psoroptic mange from bighorn to stone sheep. *J Wildl Dis* **33**, 3, 664-665.

Fourie LJ, Meintjes T, Kok DJ, Horak IG (2002): The growth of sheep scab lesions in relation to sheep breed and time of the year. *Exp Appl Acarol* **27**, 4, 277-281.

French NP, Berriatua E, Wall R, Smith K, Morgan KL (1999): Sheep scab outbreaks in Great Britain between 1973 and 1992: Spatial and temporal patterns. *Vet Parasitol* **83**, 3-4, 187-200.

Friel J, Greiner EC (1988): Ear mites from domestic goats in Florida. *Exp and Appl Acarol* **4**, 4, 345-351.

Fritsch P (1988): Aufbau und Funktion der normalen Haut. In: Dermatologie, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp 3-32.

Fujise N, Kosaka T (1999): Mossy cells in the mouse dentate gyrus: Identification in the dorsal hilus and their distribution along the dorsoventral axis. *Brain Res* **816**, 2, 500-511.

Fukunaga A, Khaskhely NM, Sreevidya CS, Byrne SN, Ullrich SE (2008): Dermal dendritic cells, and not langerhans cells, play an essential role in inducing an immune response. *J Immunol* **180**, 5, 3057-3064.

Gabai G, Marinelli L, Simontacchi C, Bono GG (2004): The increase in plasma C19[delta]5 steroids in subcutaneous abdominal and jugular veins of dairy cattle during pregnancy is unrelated to estrogenic activity. *Steroids* **69**, 2, 121-127.

Geisert RD, Conley AJ (1998): Secretion and metabolism of steroids in subprimate mammals during pregnancy. In: The endocrinology of pregnancy, Eds: F.W. Bazer, Humana Press Inc., Towota, NJ. pp 291-318.

Genchi C, Alvinerie M, Forbes A, Bonfanti M, Genchi M, Vandoni S, Innocenti M, Sgoifo Rossi CA (2008): Comparative evaluation of two ivermectin injectable formulations against psoroptic mange in feedlot cattle. *Vet Parasitol* **158**, 1-2, 110-116.

Greaves MW, Wall PD (1996): Pathophysiology of itching. *The Lancet* **348**, 9032, 938-940.

Guillot FS (1981): Population increase of *Psoroptes ovis* (Acari: Psoroptidae) on stanchioned cattle during summer. *J Med Entomol* **18**, 44-47.

Guillot FS, Wright FC (1983): Precopulatory pairing and mating of *Psoroptes* mites (Acari: Psoroptidae). *J Med Entomol* **20**, 591-596

Guillot FS, Cole NA (1984): Development and transmission of psoroptic mange of cattle in feed lots in endemic and non-endemic regions. *Vet Parasitol* **16**, 1-2, 127-135.

Guillot FS, Stromberg PC (1987): Reproductive success of *Psoroptes ovis* (Acari: Psoroptidae) on hereford calves with a previous infestation of psoroptic mites. *J Med Entomol* **24**, 416-419.

Gundersen HJG (1977): Notes on the estimation of the numerical profiles: The edge effect. *J. Microsc.* **111**, 219-223.

Gundersen HJ (1978): Estimators of the number of objects per area unbiased by edge effects. *Microsc Acta* **81**, 2, 107-117.

Gundersen HJ (1986): Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of william r. Thompson. *J Microsc* **143**, Pt 1, 3-45.

Gundersen HJ, Jensen EB (1987): The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* **147**, Pt 3, 229-263.

Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, et al. (1988a): Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* **96**, 5, 379-394.

Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ (1988b): The new stereological tools: Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* **96**, 7-12, 857-881.

Halley BA, Van den Heuvel WJ, Wislocki PG (1993): Environmental effects of the usage of avermectins in livestock. *Vet Parasitol* **48**, 1-4, 109-125.

Hartmann H, Guenther, H. (1974): The general adaptation syndrome in the calf. Iv. Histological studies on the adrenal cortex with reference to functional parameters. *Arch Exp Veterinarmed* **28**, 6, 927-941.

Hartmann K, Henz BM, Kruger-Krasagakes S, Kohl J, Burger R, Guhl S, Haase I, Lippert U, Zuberbier T (1997): C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. *Blood* **89**, 8, 2863-2870.

Haug (1980): Die Abhängigkeit der Einbettungsschrumpfung des Gehirngewebes vom Lebensalter. *Verh Anat Ges* **74**, 699-700.

Heite HJ, Ritter K (1962): [critical study of errors in the measurement of the thickness of the epidermis in the acanthosis test.]. *Dermatologica* **124**, 406-419.

Hendrickx MO, Levasseur G, Saget Y, Gevrey J, Shanks DJ (1995): Etude de l'efficacite de la doramectine dans le traitement de la gale psoroptique des bovins. *Bull GTV* **4**, 53-57.

Hering (1838): Die Kräzmilben der Thiere und einige verwandte Arten, nach eigenen Untersuchungen beschrieben. In: Nova acta physico-medica academiae caesareae leopoldino-carolinae naturae curiosorum, Wolfgang Schwarzkopf, Breslau und Bonn. pp 574-626.

Hermanns W, Liebig K, Schulz LC (1981): Postembedding immunohistochemical demonstration of antigen in experimental polyarthritis using plastic embedded whole joints. *Histochem Cell Biol* **73**, 3, 439-446.

Hinojosa-Laborde C, Lange DL (1999): Endothelin regulation of adrenal function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**, 12, 995-999.

Hoeflich A, Weber MM, Fisch T, Nedbal S, Fottner C, Elmlinger MW, Wanke R, Wolf E (2002): Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) separates hypertrophic and hyperplastic effects of growth hormone (GH)/IGF-1 excess on adrenocortical cells in vivo. *FASEB J.* **16**, 13, 1721-1731.

Hoek A, Rutten VP, Kool J, Arkesteijn GJ, Bouwstra RJ, Van Rhijn I, Koets AP (2009): Subpopulations of bovine wc1(+) gammadelta T cells rather than CD4(+)CD25(high) foxp3(+) T cells act as immune regulatory cells ex vivo. *Vet Res* **40**, 1, 6.

Hogg JC, Lehane MJ (1999): Identification of bacterial species associated with the sheep scab mite (*Psoroptes ovis*) by using amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **65**, 9, 4227-4229.

Hogg JC, Lehane MJ (2001): Microfloral diversity of cultured and wild strains of *Psoroptes ovis* infesting sheep. *Parasitology* **123**, 05, 441-446.

Holbrook KA, Wolff K (1987): Structure and development of skin. In: *Dermatology in general medicine, cutaneous manifestations of general medicine*, Eds: F.B.; Eisen Fitzpatrick, Z.A.; Wolff, W.; Freedberg, I.M.; Austen, K.F., Mc Graw & Hill Inc. pp 93-131.

Hu Y, Cardounel A, Gursoy E, Anderson P, Kalimi M (2000): Anti-stress effects of dehydroepiandrosterone: Protection of rats against repeated immobilization stress-induced weight loss, glucocorticoid receptor production, and lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* **59**, 7, 753-762.

Hünemörder (1995): Morphometrische sowie licht- und elektronenmikroskopische Charakterisierung kutaner Alterationen wachstumshormon-transgener Mäuse. Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Huntley JF, Machell J, Nisbet AJ, Broek Avd, Chua KY, Cheong N, Hales BJ, Thomas WR (2004): Identification of tropomyosin, paramyosin and apolipoprotein/vitellogenin as three major allergens of the sheep scab mite, *Psoroptes ovis*. *Parasite Immunol* **26**, 8-9, 335-342.

Jensen R, Fitzhugh, H.A., Gaafar, S.M., Loomis, E.C., Matthyse, J.G., McDonald, R.P. and Wagstaff, D.J. (1979): Psoroptic cattle scabies research: An evaluation, U.S. National Research Council

Jolly S, Thomas C, Genicot B, Dessy-Doizé CE, Coignoul FL, Desmecht D (2001): Effect of intravenous platelet-activating factor on bovine pulmonary mast cells. *J Comp Pathol* **125**, 2-3, 81-89.

Jossiphov J (1968): Die Lipidverteilung zwischen Rinde und Mark der Nebenniere bei verschiedenen Tierarten. Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Keegan CE, Hammer GD (2002): Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. *Trends Endocrinol Metab* **13**, 5, 200-208.

Kenyon F, Knox D (2002): The proteinases of *Psoroptes ovis*, the sheep scab mite--their diversity and substrate specificity. *Vet Parasitol* **105**, 4, 317-325.

Kenyon F, Welsh M, Parkinson J, Whitton C, Blaxter ML, Knox DP (2003): Expressed sequence tag survey of gene expression in the scab mite *Psoroptes ovis*--allergens, proteases and free-radical scavengers. *Parasitology* **126**, 05, 451-460.

Kirkwood A (1980): Effect of *Psoroptes ovis* on the weight of sheep. *Vet Rec* **107**, 20, 469-470.

Kirkwood AC (1985): Some observations on the biology and control of the sheep scab mite *Psoroptes ovis* (Hering) in Britain. *Vet Parasitol* **18**, 3, 269-279.

Kirkwood AC (1986): History, biology and control of sheep scab. *Parasitol Today* **2**, 11, 302-307.

Knights M, Smith GW (2007): Decreased ACTH secretion during prolonged transportation stress is associated with reduced pituitary responsiveness to tropic hormone stimulation in cattle. *Domest Anim Endocrinol* **33**, 4, 442-450.

Koko V, Djordjevic J, Cvijic G, Davidovic V (2004): Effect of acute heat stress on rat adrenal glands: A morphological and stereological study. *J Exp Biol* **207**, 24, 4225-4230.

Kolotova N, Maiborodin I, Fursov S, Lushnikova E, Zarubekov O, Maiborodina V (2010): Morphology of pararectal lymph nodes in rectal cancer after neoadjuvant therapy. *B Exp Biol Med* **149**, 2, 250-254.

König HE, Liebich H-G (1999): Anatomie der Haussäugetiere, Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis Band II, 2. Auflage Schattauer GmbH, Stuttgart.

Küther K, Audigé L, Kube P, Welle M (1998): Bovine mast cells: Distribution, density, heterogeneity, and influence of fixation techniques. *Cell Tissue Res* **293**, 1, 111-119.

Labrie F (1991): Intracrinology. *Mol Cell Endocrinol* **78**, 3, C113-C118.

Lee AJ, Huntley J, Van den Broek A, Coates D, Elwyn Isaac R (2002a): Expression and characterisation of a *Psoroptes ovis* glutathione S-transferase. *Vet Parasitol* **105**, 1, 49-63.

Lee AJ, Machell J, Van Den Broek AH, Nisbet AJ, Miller HR, Isaac RE, Huntley JF (2002b): Identification of an antigen from the sheep scab mite, *Psoroptes ovis*, homologous with house dust mite group I allergens. *Parasite Immunol* **24**, 8, 413-422.

Lefcourt AM, Bitman J, Kahl S, Wood DL (1993): Circadian and ultradian rhythms of peripheral cortisol concentrations in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* **76**, 9, 2607-2612.

Lekimme M, Mignon B, Tombeux S, Focant C, Maréchal F, Losson B (2006): In vitro entomopathogenic activity of *Beauveria bassiana* against *Psoroptes* spp. (Acari: Psoroptidae). *Vet Parasitol* **139**, 1-3, 196-202.

Lewis-Beck MS, Bryman A, Futing Liao T (2004): The sage encyclopedia of social science research methods, Band 1, SAGE Publications Inc., Thousand Oaks, California.

Ley SJ, Waterman AE, Livingston A (1996): Measurement of mechanical thresholds, plasma cortisol and catecholamines in control and lame cattle: A preliminary study. *Res Vet Sci* **61**, 2, 172-173.

Lippert U, Artuc M, Grutzkau A, Moller A, Kenderessy-Szabo A, Schadendorf D, Norgauer J, Hartmann K, Schweitzer-Stenner R, Zuberbier T, Henz BM, Kruger-Krasagakes S (1998): Expression and functional activity of the IL-8 receptor type CXCR1 and CXCR2 on human mast cells. *J Immunol* **161**, 5, 2600-2608.

Liu PS, Wang PY (2004): DHEA attenuates catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells. *J Bio Sci* **11**, 2, 200-205.

Logan NB, Weatherley AJ, Phillips FE, Wilkins CP, Shanks DJ (1993): Spectrum of activity of doramectin against cattle mites and lice. *Vet Parasitol* **49**, 1, 67-73.

Lonneux JF, Nguyen TQ, Hollanders W, Losson BJ (1996): A sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to study the antibody response against *Psoroptes ovis* in cattle. *Vet Parasitol* **64**, 4, 299-314.

Lonneux JF, Nguyen TQ, Losson BJ (1997): Efficacy of pour-on and injectable formulations of moxidectin and ivermectin in cattle naturally infected with *Psoroptes ovis*: Parasitological, clinical and serological data. *Vet Parasitol* **69**, 3-4, 319-330.

Lonneux JF, Nguyen TQ, Detry J, Farnir F, Losson BJ (1998): The relationship between parasite counts, lesions, antibody titres and daily weight gains in *Psoroptes ovis* infested cattle. *Vet Parasitol* **76**, 1-2, 137-148.

Lonneux JF, Boelaert F, Biront P, Meulemans G, Losson BJ, Vermeersch J-P (2000): *Psoroptes ovis* infestations in Belgium: A study of seroprevalence. In: Scientific report 1999-2000, epidemiological networks and interactions, VAR (Veterinary and Agrochemical Research Centre)

Löscher W, Ungemach F, Kroker R (2002): Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren, Parey Buchverlag.

Losson B, Lonneux JF, Roelants B, Keulenaer KIT (1996): Activité de la doramectine, une nouvelle avermectine, sur *Psoroptes ovis* chez le bovin lors d'infestations naturelles. . *Ann Méd Vét* **140**, 439-444.

Losson BJ, Lonneux JF, Lekimme M (1999): The pathology of *Psoroptes ovis* infestation in cattle with a special emphasis on breed difference. *Vet Parasitol* **83**, 3-4, 219-229.

Lusat J, Morgan ER, Wall R (2009): Mange in alpacas, llamas and goats in the UK: Incidence and risk. *Vet Parasitol* **163**, 1-2, 179-184.

Makumyaviri AM, Ottowicz G, Verhulst A (1985): Le stress de transport et l'histo-physiologie des surrénales et thyroïdes des bovins au shaba: Cas du transfert du bétail de kundelungu a l'abattoir de lumbumbashi (zaïre). *Rev Méd Vét* **136**, 69-72.

Mapstone SC, Beasley A, Wall R (2002): Structure and function of the gnathosoma of the mange mite, *Psoroptes ovis*. *Med Vet Entomol* **16**, 4, 378-385.

Marinelli L, Trevisi E, Da Dalt L, Merlo M, Bertoni G, Gabai G (2007): Dehydroepiandrosterone secretion in dairy cattle is episodic and unaffected by ACTH stimulation. *J Endocrinol* **194**, 3, 627-635.

Marx C, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA, Bornstein SR (1998): Regulation of adrenocortical function by cytokines--relevance for immune-endocrine interaction. *Horm Metab Res* **30**, 6-7, 416-420.

Mathieson BR, Lehane MJ (1996): Isolation of the gram-negative bacterium, *Serratia marcescens*, from the sheep scab mite, *Psoroptes ovis*. *Vet Rec* **138**, 9, 210-211.

Mathieson BRF, Lehane MJ (2002): Ultrastructure of the alimentary canal of the sheep scab mite, *Psoroptes ovis* (Acari: Psoroptidae). *Vet Parasitol* **104**, 2, 151-166.

Mattfeldt T (1990): Stereologische Methoden in der Pathologie, Thieme, Stuttgart.

Matthes HF, Harrison GBL, Shaw RJ, Heath ACG, Pfeffer A, Hiepe TH (1996): Cross-reacting antibodies to *Sarcoptes suis*, *Chorioptes bovis* and *Notoedres cati* and anti-*P. ovis* IgE in sera from sheep infested naturally with *Psoroptes ovis*. *Int J Parasitol* **26**, 4, 437-444.

Matthias D (1968): Die Nebennieren, glandulae suprarenales, chromaffines Gewebe. In: Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. Bd. 3, Endokrine Drüsen, Nervensysteme, Sinnesorgane., Dobberstein, J.; Stünzi, H., Verl. P. Parey, Berlin und Hamburg. pp 49-88.

Mazet JA, Boyce WM, Mellies J, Gardner IA, Clark RK, Jessup DA (1992): Exposure to *Psoroptes sp.* mites is common among bighorn sheep (*Ovis canadensis*) populations in california. *J Wildl Dis* **28**, 4, 542-547.

Mazyad SA, Sanad EM, Morsy TA (2001): Two types of scab mites infesting man and sheep in north sinai. *J Egypt Soc Parasitol* **31**, 1, 213-222.

Mazzocchi G, Malendowicz LK, Robba C, Rebuffat P, Gottardo G, Meneghelli V, Nussdorfer GG (1983): Effects of testosterone on the zona fasciculata of the male rat adrenal cortex. A correlated stereological and biochemical study. *J Submicrosc Cytol* **15**, 4, 991-1005

Mazzocchi G, Malendowicz LK, Rebuffat P, Robba C, Gottardo G, Nussdorfer GG (1986): Short- and long-term effects of acth on the adrenal zona glomerulosa of the rat. A coupled stereological and enzymological study. *Cell Tissue Res* **243**, 2, 303-310.

McNair CM, Nisbet AJ, Billingsley PF, Knox DP (2009): Molecular characterization, expression and localization of a peroxiredoxin from the sheep scab mite, *Psoroptes ovis*. *Parasitology* **136**, 4, 453-460.

McNeilly TN, McIntyre J, Frew D, Griffiths DJ, Wattedgedera SR, van den Broek A, Huntley JF (2010): Infestation of sheep with *Psoroptes ovis*, the sheep scab mite, results in recruitment of Foxp3⁺ T cells into the dermis. *Parasite Immunol* **32**, 5, 361-369.

Meintjes T, Fourie LJ, Horak IG (2002): Effects of the scab mite *Psoroptes ovis* on the haematology and live mass of merino and dorper sheep. *Onderstepoort J Vet Res* **69**, 4, 285-293.

Meleney WP, Christy, J.E. (1978): Factors complicating the control of psoroptic scabies of cattle. *J Am Vet Med Assoc* **173**, 1473-1478.

Meleney WP, Fisher WF (1979): The effect of exposure to mites, *Psoroptes ovis* (acarina: Psoroptidae), on calves of varying susceptibility to common scabies. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc* **83**, 340-346.

Milosevic V, Velkovski S, Brkic B, Sekulic M, Lovren M, Starcevic V, Severs WB (1996): Inhibitory effects of centrally administered somatostatin on the adrenal zona glomerulosa in male rats. *Pharmacology* **53**, 6, 369-375

Milosevic V, Trifunovic S, Sekulic M, Sosic-Jurjevic B, Filipovic B, Negic N, Nestorovic N, Manojlovic Stojanoski M, Starcevic V (2005): Chronic exposure to constant light affects morphology and secretion of adrenal zona fasciculata cells in female rats. *Gen Physiol Biophys* **24**, 3, 299-309.

Minihan D, Barrett D, Mulcahy G, Cassidy JP (2002): *Psoroptes ovis* infestation in a belgium blue bull. *Ir Vet J* **55**, 4, 168-171.

Minton JE (1994): Function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the sympathetic nervous system in models of acute stress in domestic farm animals. *J Anim Sci* **72**, 7, 1891-1898.

Moberg GP (1987): Problems in defining stress and distress in animals. *J Am Vet Med Assoc* **191**, 10, 1207-1211.

Monteiro-Riviere NA, Bristol DG, Manning TO, Rogers RA, Riviere JE (1990): Interspecies and interregional analysis of the comparative histologic thickness and laser doppler blood flow measurements at five cutaneous sites in nine species. *J Investig Dermatol* **95**, 5, 582-586.

Mounier L, Veissier I, Boissy A (2005): Behavior, physiology, and performance of bulls mixed at the onset of finishing to form uniform body weight groups. *J Anim Sci* **83**, 7, 1696-1704.

Munitz A, Levi-Schaffer F (2004): Eosinophils: 'new' roles for 'old' cells. *Allergy* **59**, 3, 268-275.

Munksgaard L, Simonsen HB (1996): Behavioral and pituitary adrenal-axis responses of dairy cows to social isolation and deprivation of lying down. *J Anim Sci* **74**, 4, 769-778.

Myking AO (1980): Actual volume estimation of the paracortex in lymph nodes by morphometry. Significance of centrally placed sections. *Pathol Res Pract* **166**, 2-3, 372-380.

Ndong TB, Kane Y, Ba MA, Sane I, Sutra JF, Alvinerie M (2005): Pharmacokinetics of ivermectin in zebu gobra (*Bos indicus*). *Vet Parasitol* **128**, 1-2, 169-173.

Nieuwhof GJ, Bishop SC (2005): Costs of the major endemic diseases of sheep in great britain and the potential benefits of reduction in disease impact. *Anim Sci* **81**, 23-29.

Nilsson G, Butterfield JH, Nilsson K, Siegbahn A (1994): Stem Cell Factor is a chemotactic factor for human mast cells. *J Immunol* **153**, 8, 3717-3723.

Nisbet AJ, Billingsley PF (2000): A comparative survey of the hydrolytic enzymes of ectoparasitic and free-living mites. *Int J Parasitol* **30**, 1, 19-27.

Nisbet AJ, Billingsley PF (2002): Characterisation of aminopeptidase activity in scab mites (*Psoroptes* spp.). *Insect Biochem Molec Biol* **32**, 9, 1123-1131.

Nisbet AJ, MacKellar A, Wright HW, Brennan GP, Chua KY, Cheong N, Thomas JE, Huntley JF (2006): Molecular characterization, expression and localization of tropomyosin and paramyosin immunodominant allergens from sheep scab mites (*Psoroptes ovis*). *Parasitology* **133**, Pt 4, 515-523.

Nomura T, Fukuda T, Aika Y, Heizmann CW, Emson PC, Kobayashi T, Kosaka T (1997): Distribution of nonprincipal neurons in the rat hippocampus, with special reference to their dorsoventral difference. *Brain Res* **751**, 1, 64-80.

Norrix LW, DeYoung DW, Krausman PR, Etchberger RC, Glatke TJ (1995): Conductive hearing loss in bighorn sheep. *J Wildl Dis* **31**, 2, 223-227.

NRC (2008): Recognition and alleviation of distress in laboratory animals., National Academies Press (US), Washington, DC .

Nussdorfer GG, Kasprzak A, Mazzocchi G, Rebuffat P, Malendowicz LK, Robba C (1986): Short- and long-term effects of angiotensin II on the rat adrenal zona glomerulosa. A coupled stereological and enzymological study. *Exp Clin Endocrinol* **88**, 2, 158-164.

Nussdorfer GG, Malendowicz LK (1998): Role of VIP, PACAP, and related peptides in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Peptides* **19**, 8, 1443-1467.

O' Brien DJ (1992): Studies on the epidemiology of psoroptic mange of sheep in Ireland
National University of Ireland.

O' Brien DJ, Gray JS, O' Reilly PF (1994): The use of moxidectin 1% injectable for the control of psoroptic mange in sheep. *Vet Parasitol* **52**, 1-2, 91-96.

O' Brien DJ (1999): Treatment of psoroptic mange with reference to epidemiology and history. *Vet Parasitol* **83**, 3-4, 177-185.

Oberholzer M (1983): Morphometrie in der klinischen Pathologie. Allgemeine Grundlagen., Springer Verlag, Berlin.

Ochs H, Lonneux JF, Losson BJ, Deplazes P (2001): Diagnosis of psoroptic sheep scab with an improved Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Vet Parasitol* **96**, 3, 233-242.

Ogwu D, Njoku CO, Ogbogu VC (1992): Adrenal and thyroid dysfunctions in experimental *Trypanosoma congolense* infection in cattle. *Vet Parasitol* **42**, 1-2, 15-26.

OIE (2004): Mange. In: Manual of standards for diagnostic tests and vaccines
5edn.

Okwun OE, Igboeli G, Ford JJ, Lunstra DD, Johnson L (1996): Number and function of sertoli cells, number and yield of spermatogonia, and daily sperm production in three breeds of boar. *J Reprod Fertil* **107**, 1, 137-149.

Oliveira MJ, Monteiro M, Ribeiro A, Pignatelli D, Aguas A (2009): Chronic exposure of rats to occupational textile noise causes cytological changes in adrenal cortex. *Noise Health* **11**, 43, 118-123.

Olsson N, Piek E, ten Dijke P, Nilsson G (2000): Human mast cell migration in response to members of the Transforming Growth Factor-beta family. *J Leukoc Biol* **67**, 3, 350-356.

Otten W, Kanitz E, Puppe B, Tuchscherer M, Brüssow KP, Nürnberg G, Stabenow B (2004): Acute and long term effects of chronic intermittent noise stress on hypothalamic-pituitary-adrenocortical and sympatho-adrenomedullary axis in pigs. *Anim Sci* **78**, 271-284.

Pegler KR, Evans L, Stevens JR, Wall R (2005): Morphological and molecular comparison of host-derived populations of parasitic *Psoroptes* mites. *Med Vet Entomol* **19**, 4, 392-403.

Pfister K (1978): Epizootologische Betrachtungen zum Vorkommen von *Psoroptes*-Räude und andern Ektoparasiten beim Schaf im Kanton Bern. In: *Schweiz Arch Tierheilk* pp 561–567.

Piérard GE, Lapière CM (1987): Microanatomy of the dermis in relation to relaxed skin tension lines and Langer's lines. *Am J Dermatopathol* **9**, 3, 219-224.

Pouplard L, Losson, B., Detry, M., Hollanders, W. (1990): Les gales bovines. *Ann Méd Vét* **134**, 531-539.

Pruett JH (1999): Identification and purification of a 16-kDa allergen from *Psoroptes ovis* (Acarina: Psoroptidae). *J Med Entomol* **36**, 544-550.

Qahwash I, Cassar C, Radcliff R, Smith G (2002): Bacterial lipopolysaccharide-induced coordinate downregulation of arginine vasopressin receptor V3 and corticotropin-releasing factor receptor 1 messenger ribonucleic acids in the anterior pituitary of endotoxemic steers. *Endocrine* **18**, 1, 13-20.

Ramey RR, Kelley ST, Boyce WM, Farrell BD (2000): Phylogeny and host specificity of psoroptic mange mites (Acarina: Psoroptidae) as indicated by its sequence data. *J Med Entomol* **37**, 6, 791-796.

Rebuffat P, Belloni AS, Mazzocchi G, Vassanelli P, Nussdorfer GG (1979): A stereological study of the trophic effects of the renin-angiotensin system on the rat adrenal zona glomerulosa. *J Anat* **129**, Pt 3, 561-570.

Rehbein S, Pitt SR, Langholff WK, Barth D, Eagleson JS (1997): Therapeutic and prophylactic efficacy of the ivomec sr bolus against nematodes and *Psoroptes ovis* in cattle weighing more than 300 kg at the time of treatment. *Parasitol Res* **83**, 7, 722-726.

Rehbein S, Barth D, Visser M, Winter R, Cramer LG, Langholff WK (2000a): Effects of *Psoroptes ovis* infection and its control with an ivermectin controlled-release capsule on growing sheep: 1. Evaluation of weight gain, feed consumption and carcass value. *Vet Parasitol* **91**, 1-2, 107-118.

Rehbein S, Oertel H, Barth D, Visser M, Winter R, Cramer LG, Langholff WK (2000b): Effects of *Psoroptes ovis* infection and its control with an ivermectin controlled-release capsule on growing sheep: 2. Evaluation of wool production and leather value. *Vet Parasitol* **91**, 1-2, 119-128.

Rehbein S, Visser M, Winter R, Maciel A (2002): Efficacy of a new long-acting formulation of ivermectin and other injectable avermectins against induced *Psoroptes ovis* infestations in cattle. *Parasitol Res* **88**, 12, 1061-1065.

Rehbein S, Visser M, Winter R, Trommer B, Matthes HF, Maciel AE, Marley SE (2003): Productivity effects of bovine mange and control with ivermectin. *Vet Parasitol* **114**, 4, 267-284.

Reynolds ES (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* **17**, 1, 208-212.

Rohen JW, Lütjen-Drecoll E (2000): Funktionelle Histologie des Menschen., 4. Auflage, Verlag Schattauer, Stuttgart-New York.

Roncalli RA (1987): The history of scabies in veterinary and human medicine from biblical to modern times. *Vet Parasitol* **25**, 2, 193-198.

Rosa AB, Moschini G (1988): Psoroptic mange in sheep. Histopathology of the skin in acute and chronic cases. *Vet Argent* **5**, 771-773.

Rose H, Learmount J, Taylor M, Wall R (2009): Mapping risk foci for endemic sheep scab. *Vet Parasitol* **165**, 1-2, 112-118.

Rovere RJ, Nunez JL (1977): Psoroptic mange in sheep. Histopathological study of the skin in acute and chronic cases. *Gac Vet Argent* **39**, 172-177.

Sallovitz J, Lifschitz A, Imperiale F, Pis A, Virkel G, Lanusse C (2002): Breed differences on the plasma availability of moxidectin administered pour-on to calves. *Vet J* **164**, 1, 47-53.

Samuel WM, Welch DA, Smith BL (1991): Ectoparasites from elk (*Cervus elaphus nelsoni*) from Wyoming. *J Wildl Dis* **27**, 3, 446-451.

Sanders A, Froggatt P, Wall R, Smith KE (2000): Life-cycle stage morphology of *Psoroptes* mange mites. *Med Vet Entomol* **14**, 2, 131-141.

Sargison ND, Scott PR, Penny CD, Pirie RS (1995): Effect of an outbreak of sheep scab (*Psoroptes ovis* infestation) during mid-pregnancy on ewe body condition and lamb birthweight. *Vet Rec* **136**, 12, 287-289.

Sargison ND (2005): Differential diagnoses of sheep skin conditions. Part 1: Ectoparasitic diseases. *UK Vet* **10**, 3.

Schaaf F (1959): Die Epidermisverbreiterung im Tierexperiment. In: *Dermatol. Wochenschr.* pp 297-305.

Schmidt P, Dahme E (2007): Organe der inneren Sekretion (endokrines System). In: Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere; Eds: E. Weiss; Dahme, E.; Enke Verlag, Stuttgart. pp 346.

Seidl K, Unsicker K (1989): The determination of the adrenal medullary cell fate during embryogenesis. *Dev Biol* **136**, 2, 481-490.

Selye H (1975): Stress without distress., New American Library, New York.

Sinclair AN, Filan SJ (1989): Lipid ingestion from sheep epidermis by *Psoroptes ovis* (Acari: Psoroptidae). *Vet Parasitol* **31**, 2, 149-164.

Sixt M, Kanazawa N, Selg M, Samson T, Roos G, Reinhardt DP, Pabst R, Lutz MB, Sorokin L (2005): The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. *Immunity* **22**, 1, 19-29.

Smolle J, Stolz W, Bahmer FA, el-Gammal S, Heinisch G, Mattfeldt T, Nilles M, Otto F, Peter RU, Soyer HP, Sepp N, Vogt T (1993): Analytic morphology in clinical and experimental dermatology. *J Am Acad Dermatol* **29**, 1, 86-97.

Sobotta J, Welsch U (2006): Lehrbuch Histologie, Urban & Fischer bei Elsevier.

Stahl J, Niedorf F, Kietzmann M (2009): Characterisation of epidermal lipid composition and skin morphology of animal skin ex vivo. *Eur J Pharm Biopharm* **72**, 2, 310-316.

StatTrek (2009): Random number generator.
<http://stattrek.com/Tables/Random.aspx>

Steinman RM (1991): The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* **9**, 271-296.

Sterio DC (1984): The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* **134**, Pt 2, 127-136.

Stockman S (1910): Some points on the epizootiology of sheep scab in relation to eradication. *J Comp Path Therap* **23**, 303–304.

Stromberg PC, Fisher WF (1986): Dermatopathology and immunity in experimental *Psoroptes ovis* (Acari:Psoroptidae) infestation of naive and previously exposed hereford cattle. *Am J Vet Res* **47**, 7, 1551-1560.

Stromberg PC, Fisher WF, Guillot FS, Pruett JH, Price RE, Green RA (1986): Systemic pathologic responses in experimental *Psoroptes ovis* infestation of hereford calves. *Am J Vet Res* **47**, 6, 1326-1331.

Stromberg PC, Guillot FS (1987): Hematology in the regressive phase of bovine psoroptic scabies. *Vet Pathol* **24**, 5, 371-377.

Suleman MA, Wango E, Farah IO, Hau J (2000): Adrenal cortex and stomach lesions associated with stress in wild male african green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) in the post-capture period. *J Med Primatol* **29**, 5, 338-342.

Sweatman GK (1958): On the life history and validity of the species in *Psoroptes*, a genus of mange mites. *Can J Zool* **36**, 905-929.

Swinyard CA (1939): Methods for volumetric determination of fresh endocrine glands. *Anat Rec* **74**, 1, 71-78.

Tasawar Z, Rauf B, Hayat CS, Lashari MH (2007): Prevalence of *Psoroptes ovis* in sheep around Multan, Pakistan. *Pak Vet J* **27**, 4, 199-200.

Thind B, Ford H (2007): Maintaining *Psoroptes ovis* (Acari: Psoroptidae) off-host in the laboratory. *Exp Appl Acarol* **43**, 3, 205-211.

Thun RE, E.; Zerobin, K.; Luscher, T.; Vetter, W. (1981): Twenty-four-hour secretory pattern of cortisol in the bull: Evidence of episodic secretion and circadian rhythm. *Endocrinology* **109**, 6, 2208-2212.

Tobin WC (1962): Cattle scabies can be costly. *J Am Vet Med Assoc* **141**, 845-847.

Trifunovic S, Filipovic B, Ajdzanovic V, Sosic-Jurijevic B, Manojlovic-Stojanoski M, Nestorovic N, Ristic N, Sekulic M, Milosevic V (2008): The effects of chronic SRIH-14 and octreotide administration on the pituitary-adrenal axis in adult male rats. *Eur J Histochem* **52**, 1, 61-68.

Turnbull AV, Rivier CL (1999): Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: Actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* **79**, 1, 1-71.

Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP (2006): Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**, 5, E965-973.

UniProt (2010): Taxonomy.

<http://www.uniprot.org/taxonomy/83912>

van Amstel SR, Palin FL, Shearer JK (2004): Measurement of the thickness of the corium and subcutaneous tissue of the hind claws of dairy cattle by ultrasound. *Vet Rec.* **155**, 20, 630-633.

van den Broek AH, Huntley JF, MacHell J, Taylor M, Bates P, Groves B, Miller HR (2000): Cutaneous and systemic responses during primary and challenge infestations of sheep with the sheep scab mite, *Psoroptes ovis*. *Parasite Immunol* **22**, 8, 407-414.

van den Broek AHM, Huntley JF, Halliwell REW, Machell J, Taylor M, Miller HRP (2003): Cutaneous hypersensitivity reactions to *Psoroptes ovis* and Der p 1 in sheep previously infested with *P. ovis*--the sheep scab mite. *Vet Immunol Immunopathol* **91**, 2, 105-117.

van den Broek AHM, Else RW, Huntley JF, Machell J, Taylor MA, Miller HRP (2004): Early innate and longer-term adaptive cutaneous immunoinflammatory responses during primary infestation with the sheep scab mite, *Psoroptes ovis*. *J Comp Pathol* **131**, 4, 318-329.

van den Broek AH, Huntley JF, Mackellar A, Machell J, Taylor MA, Miller HR (2005): Characterisation of lesional infiltrates of dendritic cells and T cell subtypes during primary infestation of sheep with *Psoroptes ovis*, the sheep scab mite. *Vet Immunol Immunopathol* **105**, 1-2, 141-150.

van Rijswijk AW, Vorster F (1995): The influence of stress on the adrenals of the springbok (*Antidorcas marsupialis*). *J South Afr Vet Assoc* **66**, 251-253.

Vercruysse J, Rehbein S, Holdsworth PA, Letonja T, Peter RJ (2006): World association for the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of acaricides against (mange and itch) mites on ruminants. *Vet Parasitol* **136**, 1, 55-66.

Vercruysse J, Deprez P, Everaert D, Bassissi F, Alvinerie M (2008): Breed differences in the pharmacokinetics of ivermectin administered subcutaneously to holstein and belgian blue calves. *Vet Parasitol* **152**, 1-2, 136-140.

Vinson GP, Hinson JP, Toth IE (1994): The neuroendocrinology of the adrenal cortex. *J Neuroendocrinol* **6**, 3, 235-246.

Vojdani Z, Dehghani F, Seyedi F, Noorafshan A, Baha-al-din Bagi F (2010): Quantitative study of the effects of morphine on the mouse spleen and inguinal lymph node. *Arch Iran Med* **13**, 4, 294-300.

Von Rotz A, Mumcuoglu Y, Pohlenz JFL, Suter M, Brossard M, Barth D (1983): Experimentelle Infestation von Rindern mit Ektoparasiten und deren Einfluß auf die Lederqualität. *Zentralbl Veterinarmed A* **30**, 1-10, 397-407.

Walker JD, Close CF, Jones SL, Rafferty M, Keen H, Viberti G, Osterby R (1992): Glomerular structure in type-1 (insulin-dependent) diabetic patients with normo- and microalbuminuria. *Kidney Int* **41**, 4, 741-748.

Walker SL, Smith RF, Jones DN, Routly JE, Dobson H (2008): Chronic stress, hormone profiles and estrus intensity in dairy cattle. *Horm Behav* **53**, 3, 493-501

Walker S, Smith R, Jones D, Routly J, Morris M, Dobson H (2010): The effect of a chronic stressor, lameness, on detailed sexual behaviour and hormonal profiles in milk and plasma of dairy cattle. *Reprod Domest Anim* **45**, 1, 109-117.

Wanke R, Weis S, Kluge D, Kahnt E, Schenck E, Brem G, Hermanns W (1994): Morphometric evaluation of the pancreas of growth hormone-transgenic mice. *Acta Stereol* **13**, 3-8.

Wanke (1996): Charakterisierung der renalen Alterationen wachstumshormon-transgener Mäuse, ein Beitrag zur Morpho- und Pathogenese der progressiven Glomerulosklerose. Habilitationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Wanke R, Milz S, Rieger N, Ogiolda L, Renner-Muller I, Brem G, Hermanns W, Wolf E (1999): Overgrowth of skin in growth hormone transgenic mice depends on the presence of male gonads. *J Invest Dermatol* **113**, 6, 967-971.

Wassall DA, Kirkwood AC, Bates PG, Sinclair IJ (1987): Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of antibodies to the sheep scab mite *Psoroptes ovis*. *Res Vet Sci* **43**, 1, 34-35.

Weibel ER, Gomez DM (1962): A principle for counting tissue structures on random sections. *J Appl Physiol* **17**, 2, 343-348.

Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF (1966): Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol* **30**, 1, 23-38.

Weibel ER (1979): Stereological methods, Academic Press, London ; New York

Weiss E, Teifke P (2007): Haut. In: Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere; Eds: E. Weiss; Dahme, E., Enke Verlag, Stuttgart. pp 355-356.

Wildblood L, Jones D (2007): Stimulation of the in vitro migration of ovine eosinophils by factors derived from the sheep scab mite, *Psoroptes ovis*. *Vet Res Commun* **31**, 2, 197-206.

Williams TJ (2004): The eosinophil enigma. *J Clin Invest* **113**, 4, 507-509.

Wilson SC, Fell, L.R., Colditz, I.G. and Collins, D.P. (2002): An examination of some physiological variables for assessing the welfare of beef cattle in feedlots. *Anim Welfare* **11**, 305-316.

Wise TH, Caton D, Thatcher WW, Lehrer AR, Fields MJ (1982): Androstenedione, dehydroepiandrosterone and testosterone in ovarian vein plasma and androstenedione in peripheral arterial plasma during the bovine oestrous cycle. *J Reprod Fertil* **66**, 2, 513-518.

Zahler M, Essig A, Gothe R, Rinder H (1998): Genetic evidence suggests that *Psoroptes* isolates of different phenotypes, hosts and geographic origins are conspecific. *Int J Parasitol* **28**, 11, 1713-1719.

Zuckerman-Levin N, Tiosano D, Eisenhofer G, Bornstein S, Hochberg Z (2001): The importance of adrenocortical glucocorticoids for adrenomedullary and physiological response to stress: A study in isolated glucocorticoid deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 12, 5920-5924.

IX. Anhang

1. Verwendete Materialien

1.1. Paraffin-Histologie

1.1.1. 1%ige Eosin-Lösung

Eosin G (Nr. 7089, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) 10 g

Ad 1,0 L erhitztes destilliertes Wasser

Hinzufügen von filtriertem 96%igem Eisessig

(Nr. 100063, Merck, Darmstadt) 1,5 ml

1.2. GMA/MMA-Histologie

1.2.1. Spüllösung

0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,2 (siehe 1.2.2.) 1,5 L

Saccharose (Nr. A1125, Applichem, Darmstadt) 105 g

Kaliumchlorid-Dihydrat (Nr.102383, Merck, Darmstadt) 1,105 g

Durchmischen und einstellen auf pH 7,2

1.2.2. 0,1 M Cacodylatpuffer

Dimethylarsinsäure-Natriumsalz-Trihydrat

(Nr. A2140, Applichem, Darmstadt) 16,5 g

Destilliertes Wasser 1,5 L

1 molare Salzsäure (Nr. 1040.1000, neoLab Migge

Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg) 6,23 ml

Einstellen auf pH 7,2

1.2.3. Lösung A

Benzoylperoxid

(Nr. 33581, Fluka, Buchs, Schweiz) 338 mg

Methylmethacrylat (Nr. 8.00590.1000,

VWR International GmbH, Ismaning) 20 ml

2-Hydroxyethyl-Methacrylat (Nr. 8.00588.0250,

VWR International GmbH, Ismaning) 60 ml

Ethylenglycolmonobutylether

(Nr. 113102, Serva, Heidelberg) 16 ml

Polyethylenglycol 400 (Nr. 817003, Merck, Darmstadt) 2,0 ml

1.2.4. 1%iges HCl-Ethanol

25%ige Salzsäure (Nr. A0658, Applichem, Darmstadt) 100 ml

96%iges Ethanol (Bundesmonopol für Branntwein,

Offenbach a. Main) 700 ml

Destilliertes Wasser 250 ml

1.2.5. Eosin-Phloxin-Gebrauchslösung

96%iges Ethanol (Bundesmonopol für Branntwein,

Offenbach a. Main) 468 ml

Stammlösung Eosin (siehe 1.2.5.1.) 30 ml

Stammlösung Phloxin (siehe 1.2.5.2.) 3,0 ml

96%ige Essigsäure (siehe 1.2.5.3.) 2,4 ml

1.2.5.1. Stammlösung Eosin

Eosin gelblich (Nr. A0822, Applichem, Darmstadt)	1,0	g
Destilliertes Wasser	1,0	L

1.2.5.2. Stammlösung Phloxin

Phloxin (Nr. 15926, Merck, Darmstadt)	1,0	g
Destilliertes Wasser	1,0	L

1.2.5.3. 96%ige Essigsäure

Eisessig (Nr. 3738, Carl Roth, Karlsruhe)	96	ml
Destilliertes Wasser	100	ml

1.2.6. 7%ige Giemsa-Gebrauchslösung

Phosphat-Puffer (siehe 1.2.6.1.)	200	ml
Giemsa-Stammlösung (Nr. 109204, Merck, Darmstadt)	14	ml
Einstellen auf pH 6,7		

1.2.6.1. Phosphat-Puffer

di-Kaliumhydrogenphosphat 9,12 g/L (Nr.105104, Merck, Darmstadt)	200	ml
di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (Nr. 106580, Merck, Darmstadt)	160	ml
Einstellen auf pH 6,7		

1.2.7. 0,5%ige Essigsäure

Eisessig (Nr. 100063, Merck, Darmstadt)	5,0	ml
Destilliertes Wasser	1,0	L

1.3. Epon-Histologie**1.3.1. Glutaraldehyd 6,25%ig**

Glutaraldehyd 25%ig	2,5	ml
Sörensen Phosphatpuffer (siehe 1.3.2.)	10	ml

1.3.2. Sörensen Phosphat-Puffer 0,067 M, pH 4,7

Lösung I (siehe 1.3.1.1.)	80,8	ml
Lösung II (siehe 1.3.1.2.)	19,2	ml
Einstellen auf pH 7,4		

1.3.2.1. Lösung I

Kaliumdihydrogenphosphat (Nr. 120340250, Merck, Darmstadt)	9,08	g
Ad 1 L destilliertes Wasser		

1.3.2.2. Lösung II

di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Nr. 105099.1000, Merck, Darmstadt)	11,88	g
Ad 1 L destilliertes Wasser		

1.3.3. Osmiumtetroxid 1%

Osmiumtetroxid 2% (Nr. 006051, ChemPur, Karlsruhe)	5,0	ml
Veronal-Acetat-Puffer, pH 10,3 (siehe 1.3.3.1.)	2,0	ml
Salzsäure 0,1 N (Nr. 109060, Merck, Darmstadt)	2,0	ml
Destilliertes Wasser	1,0	ml
Saccharose (Nr. 107653, Merck, Darmstadt)	0,45	g

1.3.3.1. Veronal-Acetat-Puffer, pH 10,3

Veronal (5,5-Diethylbarbitursäure-Natriumsalz, Nr. 6318, Merck, Darmstadt)	2,95	g
Natriumacetat (Nr. 106267, Merck, Darmstadt)	1,94	g
Ad 100 ml destilliertes Wasser		

1.3.4. Epon-Einbettlösung

Lösung A (siehe 1.3.4.1.)	3,5	ml
Lösung B (siehe 1.3.4.2.)	6,5	ml
2-4-6-Trisdimethylaminomethylphenol (Nr. 36975, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)	0,15	ml

1.3.4.1. Lösung A

Glycidäther 100 (Nr. 21045, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)	62	ml
2-Dodecenyln-Bernsteinsäureanhydrid (Nr. 20755, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)	100	ml

1.3.4.2. Lösung B

Glycidäther 100	100	ml
Methylnadicanhydrid (Nr. 29452, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)	89	ml

1.3.5. Uranylacetat 2%ig

Uranylacetat (R 1260 A, Agar Scientific, Essex, GB) 1,0 g

Ad 50 ml destilliertes Wasser

1.3.6. Bleicitrat-Kontrastierung

Destilliertes Wasser 32 ml

Natriumcitrat (siehe 1.3.6.1.) unter Rühren zugeben 6,0 ml

Bleinitrat (siehe 1.3.6.2.) tropfenweise 4,0 ml

NaOH (siehe 1.3.6.3.) 8,0 ml

Filterieren mit Hartfilter (H602, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel)

1.3.6.1. Natriumcitrat

tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Nr. 106448, Merck, Darmstadt) 2,94 g

Ad 10 ml destilliertes Wasser

1.3.6.2. Bleinitrat

Bleinitrat (Nr. 7398, Merck, Darmstadt) 1,655 g

Ad 5 ml destilliertes Wasser

1.3.6.3. NaOH

Natriumhydroxid-Plätzchen

(Nr. 106498, Merck, Darmstadt) 1,0 g

Ad 25 ml destilliertes Wasser

X. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Pierre Björn Börjes

Geboren: 07. März 1975 in Nordhorn

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

1987 - 1994 Gymnasium Nordhorn

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1994 - 1995 Grundwehrdienst, Werlte

04/1995 - 03/1998 Ausbildung zum staatlich anerkannten Kinderkrankenpfleger, Clemenshospital GmbH, Münster

10/2003 - 01/2009 Studiengang Veterinärmedizin, Tiermedizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München, Abschluss: Staatsexamen

02/2009 Approbation als Tierarzt

Seit 04/2009 Mitarbeit in der Praxis für Tierpathologie, Dr. Wolf v. Bomhard, Dr. Stephan Pfleghaar, München

Seit 05/2009 Arbeit an vorliegender Dissertation

XI. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wanke für die Überlassung dieses Dissertationsthemas und die mir gewährte intensive Betreuung. Der Firma Merial und Herrn Privatdozent Dr. Rehbein gilt, neben meinem Dank für die Bereitstellung der Probanden ebenso wie Herrn Prof. Dr. Pfister mein Dank für die finanzielle Unterstützung und die intensive Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Hermanns danke ich für die uneingeschränkte Nutzung der institutseigenen Labore und Gerätschaften sowie für seine konstruktive Kritik und Anregungen.

Allen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Tierpathologie sei hiermit für ihre Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft gedankt.

Mein besonderer und tiefer Dank gilt hier Herrn Dr. Andreas Blutke und Frau Dr. Nadja Herbach für ihre fürsorgliche und geduldige Betreuung.

Ebenso danke ich Fr. Siebert, Fr. Maier und Fr. Sperling für exzellente Semidünn- beziehungsweise Kunststoffschnitte als auch Fr. Pichl für ihre Unterstützung und solide Unterweisung in paraffinhistologische Labortechniken. Marjam O´Gorman, Beate Schmidt und Christina Pollach danke ich für ihre freundliche und engagierte Unterstützung in formellen Angelegenheiten.

Der Praxis von Dres. Bomhard/Pfleghaar mit allen Mitarbeitern sei für ihre verständnisvolle Berücksichtigung meiner eingeschränkten Verfügbarkeit zum Ende dieser Dissertation gedankt.

Zuletzt danke ich meiner Freundin und Familie für den bedingungslosen Rückhalt und die liebe- und verständnisvolle Unterstützung.