

HISTOLOGISCHE UND QUANTITATIV  
STEREOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER EIPHYSE  
VON PFERDEN

von Marion Ettl

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

HISTOLOGISCHE UND QUANTITATIV  
STEREOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER EPIPHYSE  
VON PFERDEN

von Marion Ettl

aus München

München 2019

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-  
Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Nadja Herbach

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Nadja Herbach

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Lutz S.Göhring

Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Tag der Promotion: 25.02.2019

Widmung  
Meiner Familie

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Die Epiphyse .....</b>	<b>2</b>
2.1.1	Embryologie .....	2
2.1.2	Topografie und Anatomie .....	3
2.1.2.1	Topografie .....	3
2.1.2.2	Anatomie .....	3
2.1.2.3	Innervation .....	4
2.1.3	Histologie .....	5
2.1.4	Physiologie .....	8
2.1.4.1	Melatonin .....	8
2.1.4.2	Andere biologisch aktive Substanzen in der Epiphyse .....	12
2.1.5	Altersbedingte und altersunabhängige Veränderungen.....	12
2.1.5.1	Verkalkung/Azervuli/ Hirnsand .....	13
2.1.5.2	Lipofuscin Pigment .....	14
2.1.5.3	Melanin Pigment .....	14
2.1.5.4	Hämosiderin .....	15
<b>2.2</b>	<b>Pathologie der Epiphyse .....</b>	<b>15</b>
2.2.1	Entzündung.....	15
2.2.1.1	Uveitis assoziierte Pinealitis.....	15
2.2.1.2	Borna-Enzephalitis .....	16
2.2.2	Neoplasien und Zysten .....	17
2.2.2.1	Tumore der Pinealparenchymzellen.....	17
2.2.2.1.1	Pinealozytome .....	17
2.2.2.1.2	Pinealoblastome .....	18
2.2.2.1.3	Mischtumore der Epiphyse.....	19
2.2.2.1.4	Keimzelltumoren der Epiphyse / Germinome.....	19
2.2.2.2	Pinealiszysten .....	20
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>Tiere und Untersuchungsmaterial.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2</b>	<b>Fixierung und Vorbereitung .....</b>	<b>22</b>

---

<b>3.3</b>	<b>Paraffineinbettung und Schnittherstellung .....</b>	<b>22</b>
<b>3.4</b>	<b>Färbung der Paraffinschnitte.....</b>	<b>23</b>
3.4.1	Hämalaun-Eosin-Färbung .....	24
3.4.2	Giemsa-Färbung .....	24
3.4.3	Spezialfärbungen an Paraffinschnitten.....	25
3.4.3.1	Turnbull-Blau-Färbung .....	25
3.4.3.2	PAS-Reaktion.....	26
3.4.3.3	Bleichung .....	26
<b>3.5</b>	<b>Kunststoffeinbettung und Schnittherstellung.....</b>	<b>26</b>
<b>3.6</b>	<b>Färbung der Kunststoffschnitte.....</b>	<b>28</b>
3.6.1	Hämalaun-Eosin (HE)–Färbung an Kunststoffschnitten .....	28
3.6.2	Giemsa–Färbung .....	29
<b>3.7</b>	<b>Immunhistochemie Borna .....</b>	<b>29</b>
<b>3.8</b>	<b>Gruppenverteilung der Pferde.....</b>	<b>31</b>
3.8.1	Demographische Daten der Pferde für qualitativ-histologische Auswertungen .....	31
3.8.2	Demographische Daten der Pferde für quantitativ-stereologische Untersuchungen.....	32
<b>3.9</b>	<b>Histologische Auswertung .....</b>	<b>34</b>
<b>3.10</b>	<b>Quantitativ-stereologische Auswertung .....</b>	<b>35</b>
3.10.1	Berechnung des spezifischen und relativen Gewichts der Epiphyse .....	35
3.10.2	Quantitativ-stereologische Analysen.....	36
3.10.3	Bestimmung der Volumendichte und des Gesamtvolumens der der Pinealzellen .....	36
<b>3.11</b>	<b>Statistische Analyse.....</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Histologische Untersuchung der Epiphyse .....</b>	<b>38</b>
4.1.1	Postmortale Veränderungen .....	38
4.1.2	Pigment.....	38
4.1.3	Verkalkung .....	47
4.1.4	Pinealitis .....	47
4.1.5	Zysten und Tumore .....	50

---

<b>4.2</b>	<b>Quantitativ-stereologische Untersuchung der Epiphyse .....</b>	<b>50</b>
4.2.1	Körpergewicht, Epiphysengewicht und Epiphysenvolumen .....	50
4.2.2	Korrelation der quantitativen Parameter mit dem Körpergewicht .....	51
4.2.3	Einfluss von Geschlecht und der Zuordnung Großpferd/Pony auf Volumendichte und Gesamtvolumen der Pinealzellen in der Epiphyse .....	53
4.2.4	Einfluss des Alters auf Volumendichte und Gesamtvolumen der Pinealzellen, Bindegewebe und Pigment in der Epiphyse .....	57
4.2.5	Einfluss der Saison auf Gesamtvolumen und Volumendichte der Pinealzellen in der Epiphyse .....	60
<b>4.3</b>	<b>Immunhistochemie Borna .....</b>	<b>62</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>63</b>
<b>5.1</b>	<b>Histologische Untersuchung der Epiphyse .....</b>	<b>63</b>
5.1.1	Pigment.....	63
5.1.2	Kalzifizierung/Azervuli.....	64
5.1.3	Pinealitis .....	65
5.1.4	Zysten und Tumore .....	66
<b>5.2</b>	<b>Quantitativ-stereologische Untersuchung der Epiphyse .....</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>73</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>88</b>
<b>10</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>91</b>
<b>11</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>93</b>
<b>11.1</b>	<b>Verwendete Materialien für Paraffinschnitte.....</b>	<b>93</b>
11.1.1	Hämalaun-Eosin-Färbung .....	93
11.1.1.1	HCl-Alkohol-Stammlösung 1%ig .....	93
11.1.1.2	HCl-Alkohol-Gebrauchslösung 0,5%ig .....	93
11.1.1.3	Eosin-Lösung 1%ig .....	93
11.1.2	Giemsa-Färbung .....	93
11.1.2.1	Phosphatpuffer 0,1 Mol.....	93
11.1.2.2	Giemsa-Gebrauchslösung 7%ig .....	94

---

11.1.2.3	Essigsäure 0,5%ig .....	94
11.1.3	Turnbull-Blau-Färbung .....	94
11.1.3.1	Ammoniumsulfidlösung 10%ig .....	94
11.1.3.2	Kaliumhexacyanoferrat (III) 20%ig .....	94
11.1.3.3	Salzsäure 1%ig .....	94
11.1.3.4	Kernechtrot 0,1%ig .....	95
11.1.4	PAS-Reaktion.....	95
11.1.4.1	Perjodsäure 1 % .....	95
11.1.4.2	HCl-Alkohol-Stammlösung 1%ig .....	95
11.1.4.3	HCl-Alkohol-Gebrauchslösung 0,5%ig .....	95
11.1.5	Bleichung .....	95
11.1.5.1	Bleichlösung 5%ig .....	95
<b>11.2</b>	<b>Verwendete Materialien für die Kunststoffeinfärbung.....</b>	<b>96</b>
11.2.1	Spülflüssigkeit.....	96
11.2.2	Cacodylatpuffer.....	96
11.2.3	Einbettungsmedium (Lösung A) .....	96
11.2.4	Einbettungsmedium (Lösung B) .....	96
<b>11.3</b>	<b>Verwendete Materialien für Färbung der Kunststoffschritte .....</b>	<b>97</b>
11.3.1	HE – Färbung .....	97
11.3.1.1	HCl – Ethanol 1%ig .....	97
11.3.1.2	Eosin – Phloxin – Gebrauchslösung.....	97
11.3.1.3	Stammlösung Eosin.....	97
11.3.1.4	Stammlösung Phloxin .....	97
11.3.2	Giemsa – Färbung .....	98
11.3.2.1	Giemsa – Gebrauchslösung.....	98
11.3.2.2	Phosphat-Puffer 0,067M .....	98
11.3.2.3	Essigsäure 0,5%ig .....	98
<b>11.4</b>	<b>Immunhistochemie Borna .....</b>	<b>98</b>
11.4.1	Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 1 % .....	98
11.4.2	Tris buffered saline (TBS) pH-Wert 7,6 .....	98
11.4.3	DAB pH-Wert 7,0 .....	99
<b>11.5</b>	<b>Allgemeine Daten der untersuchten Pferde .....</b>	<b>100</b>
<b>11.6</b>	<b>Ergebnisse der histologischen Untersuchung .....</b>	<b>116</b>

---

<b>11.7</b>	<b>Ergebnisse der stereologischen Untersuchung .....</b>	<b>126</b>
<b>12</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>129</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ACTH	Adrenocorticotrophes Hormon (ACTH)	Mgr.	Mittelgradig
AK	Antikörper	MS	Multiple Sklerose
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose	n	Anzahl
AVT	Arginine Vasotocin	n.b.	Nicht bekannt
Bayr.	Bayrisch	nekr.	nekrotisch
BDV	Bornavirus	NFP	Neurofilament Protein
BWS	Brustwirbelsäule	NPY	Neuropeptid Y
chron.	chronisch	NSE	Neuronen – spezifische Enolase
dest.	destillata	Öster.	Österreichisches
E	Euthanasie	P	Punkte
EAU	Autoimmune Uveitis	PAS	Periodic Acid Schiff
EHV	Equines Herpes Virus	PB	Pinealoblastome
ERU	Equine rezidivierende Uveitis	PC	Pinealozytome
F	Frühjahr	PGC	Pineal germ cell tumors, Germanome
Franz.	Französisches	PPTID	Pinealisparenchymtumor intermediärer Differenzierung
GCTs	Pineal germ cell tumors	PRL	Prolactin
Ggr.	Geringgradig	S	Sommer
GP	Großpferd	Süddt.	Süddeutsches
GRH	Gonadotropin-releasing Hormone	SYN	Synaptophysin
H	Herbst	T	Tod
HE	Hämatoxylin – Eosin	V <sub>(Pin, Epi)</sub>	Gesatvolumen der Pinealiszellen
Hgr.	Hochgradig	VB	Vollblut
HWS	Halswirbelsäule	VIP	Vasoactive intestinal peptide
IHC	Immunhistochemie	V <sub>V(Pin/Epi)</sub>	Volumendichte der Pinealiszellen in der Epiphyse
IL	Interleukin	w	weiblich, Stute
KB	Kaltblut	W	Winter
LH	Luteinisierendes Hormon	WB	Warmblut
m	Männlich, Hengst		
M	Masse		
mk	Männlich kastriert, Wallach		

# 1 EINLEITUNG

Bereits vor 2000 Jahren wurde die Epiphyse von dem Arzt und Anatom Galen von Pergamon als Drüse beschrieben. Der Philosoph René Descartes machte die Epiphyse im 17. Jahrhundert als Sitz der Seele populär (Rodin und Overall, 1967). Über Jahrhunderte war ihre Funktion unbekannt, erst im letzten Jahrhundert wurden die Funktionen der Epiphyse erforscht und dem endokrinen System zugeordnet. Zusammen mit dem Hypothalamus und der Hypophyse gehört die Epiphyse dem höchsten Zentrum des endokrinen Systems an (Khavinson und Linkova, 2012). Nach der Niere ist die Epiphyse das am stärksten durchblutete Organ (Goldman und Wurtman, 1964).

McCord und Allen untersuchten 1915 die Wirkung von Epiphysenextrakt auf Kaulquappen und entdeckten, dass die Kaulquappen, die mit Rinderepiphysen gefüttert wurden, einheitlich heller und sogar durchsichtig wurden (McCord und Allen, 1917). Erst 1958 isolierten Lerner et al. (1960) die Substanz N-acetyl-5-methoxytryptamin aus Rinderepiphysen, die zur Aufhellung der Kaulquappen führte und nannten sie Melatonin (Lerner et al., 1960). Das Melatonin wird von der Epiphyse synthetisiert und erreicht nachts die höchsten Werte im Blut (Gusek, 1981). Melatonin nimmt Einfluss auf den saisonalen Rhythmus und in der Folge über die Hypothalamus-Gonaden-Achse auf die Fortpflanzungsorgane (Nickel et al., 1992a; Salomon et al., 2008)

Ziel dieser Arbeit war es, die pathohistologischen Veränderungen der Epiphyse beim Pferd aufzuzeigen, sowie eine quantitativ-stereologische Analyse durchzuführen, um die Einflüsse von Alter, Geschlecht, Zuordnung Großpferd/Pony und Saison auf das Gesamtvolumen der Pinealzellen zu untersuchen. Alle Pferdeepiphysen der vorliegenden Arbeit wurden zwischen 2008 und 2012 aus dem Sektionsgut des Instituts für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München entnommen.

## **2 LITERATURÜBERSICHT**

### **2.1 Die Epiphyse**

Die Epiphyse ist unter den Synonymen Epiphysis cerebri, Zirbeldrüse oder Glandula pinealis bekannt, da ihre Form beim Menschen der eines Pinienzapfen gleicht (Nickel et al., 1992a). Bei Wirbeltieren ist die Epiphyse ein unpaares, intrakraniell gelegenes Organ. Im Gegensatz zu den höheren Wirbeltieren liegt bei Reptilien ein Teil, der als Parapinealorgan bezeichnet wird, zwischen dem knöchernen Schädel und der Haut auf der Stirn. Das Parapinealorgan dient als sogenanntes „Drittes Auge“ dazu, Lichtsignale zu erkennen, neuronal weiterzuleiten und ähnelt damit funktionell den Zapfen der retinalen Sinneszellen der Wirbeltiere. Bei höheren Wirbeltieren steht die sekretorische Funktion der Epiphyse im Vordergrund (Gusek, 1981).

#### **2.1.1 Embryologie**

Die Entwicklung der Epiphyse steht genauso wie die von Hypophyse und Nebenniere im Zusammenhang mit der Entwicklung des Nervensystems (Schnorr und Kressin, 2006).

Die Gehirnentwicklung beginnt mit der bläschenförmigen Gehirnanlage aus Erst- und Zweithirn, welches ohne scharfe Grenze ins Rückenmark übergeht. Aus diesem entwickelt sich das hufeisenförmige Dreiblasenstadium aus Prosencephalon (Vorderhirn), Mesencephalon (Mittelhirn) und Rhombencephalon (Rautenhirn). Darauf folgt das Fünfblasenstadium, in welchem das Prosencephalon in Telencephalon (Endhirn) und Diencephalon (Zwischenhirn) differenziert und das Rhombencephalon in Metencephalon (Hinterhirn) und Myelencephalon (Nachhirn) (Schnorr und Kressin, 2006).

Die Entwicklung der Epiphyse beginnt beim Menschen im zweiten Schwangerschaftsmonat. Im kaudalen Teil des Daches des Diencephalons entsteht eine Epithelverdickung, aus der sich die Epiphysenknospe ausstülpt (Nickel et al., 1992b; Macchi und Bruce, 2004; Schnorr und Kressin, 2006).

## **2.1.2 Topografie und Anatomie**

Die Epiphyse ist ein oval bis rundliches unpaares Organ, welches zwischen der Commissura habenularum und der Commissura caudalis gelegen ist (Nickel et al., 1992b). Untersuchungen an Ratten zeigen, dass die Epiphyse nach der Niere das am stärksten durchblutete endokrine Organ des Körpers ist (Goldman und Wurtman, 1964). Kapillaren und Venolen finden sich sowohl peripher als auch zentral, wohingegen Arterien bei den meisten Tierarten nur peripher auftreten (Gusek, 1981).

### **2.1.2.1 Topografie**

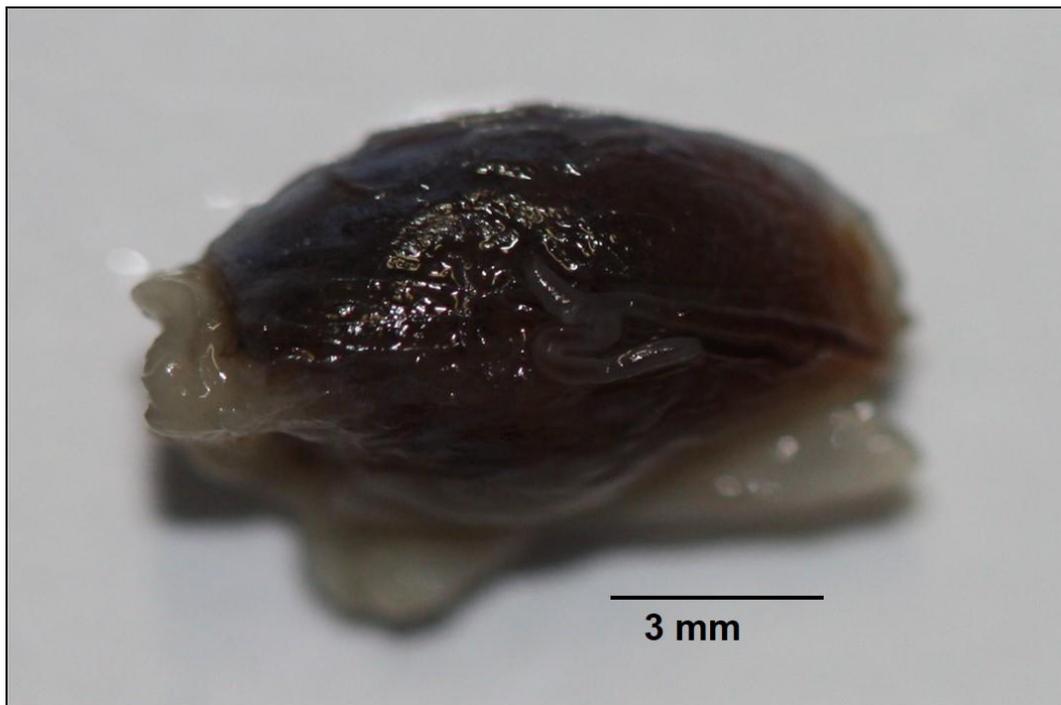
Das Zwischenhirn liegt rostral des Mittelhirns und ventral der Großhirnhemisphären (Salomon et al., 2008). Das kaudale Ende des Diaenzephalons wird von der Commissura caudalis, der Epiphyse und der Commissura habenularum gebildet (Salomon et al., 2008). Die Commissura caudalis, die Habenulae, die Commissura habenularum, der Nuclei habenulares sowie die Epiphyse gehören dem Epithalamus an (Salomon et al., 2008). Die Epiphyse ist über zwei dünne Markbündel (Habenulae) mit dem Thalamus verbunden, diese Bündel werden auch als Epiphysenstiel bezeichnet (Salomon et al., 2008). Die Epiphyse liegt kaudodorsal des dritten Ventrikels, aus diesem Ventrikel zieht ein Ausläufer in die Basis der Epiphyse (Salomon et al., 2008).

### **2.1.2.2 Anatomie**

Zwischen den Haussäugetieren bestehen beträchtliche Unterschiede in Form und Größe der Epiphyse. Zudem gibt es aber auch individuelle Unterschiede sowie Geschlechts- und Altersunterschiede im Volumen der Epiphyse und auch Lichtverhältnisse können die Epiphysengröße beeinflussen (Nickel et al., 1992a). Die geografische Lage und die damit verbundenen Witterungsbedingungen nehmen ebenfalls einen gewissen Einfluss auf die Größe der Epiphysen von Wirbeltieren. Dabei wurden größere Epiphysen in kälteren Gebieten der Erde gefunden (Ralph, 1975; Tan et al., 2018). Es konnte gezeigt werden, dass die Epiphyse von adipösen Menschen signifikant kleiner ist als die Epiphyse von schlanken Menschen (Grosshans et al., 2016; Tan et al., 2018).

Durchschnittlich wiegt die Pferdeepiphyse ca. 200 mg, hat eine Länge x Breite von 8x4 mm (eine dritte Dimension wird üblicherweise nicht angegeben) und ist rundlich bis birnenförmig (Cozzi und Ferrandi, 1984; Nickel et al., 1992a). Im

Vergleich ist die erdnussförmige Epiphyse des Rindes mit 300 mg etwas schwerer und mit 16x8 mm etwas größer. Beim Hund dagegen ist sie konisch, lanzettförmig, 10 mg leicht und 3x3 mm groß. Diese Maße sind allerdings nur Anhaltspunkte und unterliegen großen individuellen Schwankungen. Auch in der Färbung gibt es tierartige Unterschiede, während die Epiphyse bei Pferd und Rind braun bis grauschwarz gefärbt ist und sich beim Pferd im Alter vermehrt fleckig braunschwarz verfärbt (Abbildung 1), erscheint die Epiphyse beim Fleischfresser weißgrau (Nickel et al., 1992a). Beim Menschen wird ein Gewicht zwischen 100-180 mg, eine Größe von 5-9x3-6 mm angegeben, wobei das Gewicht alters- und geschlechtsabhängig ist. Die Epiphyse erreicht ihr Gewichtmaximum beim Menschen zwischen dem 40igsten bis 50igsten Lebensjahr, wobei bis zum 30igsten das Durchschnittsgewicht der männlichen Epiphyse, das der weiblichen übertrifft, dieses Verhältnis dreht sich nach dem 30igsten Lebensjahr um (Gusek, 1981).



**Abbildung 1: Epiphyse, Pferd, S 1283/09**

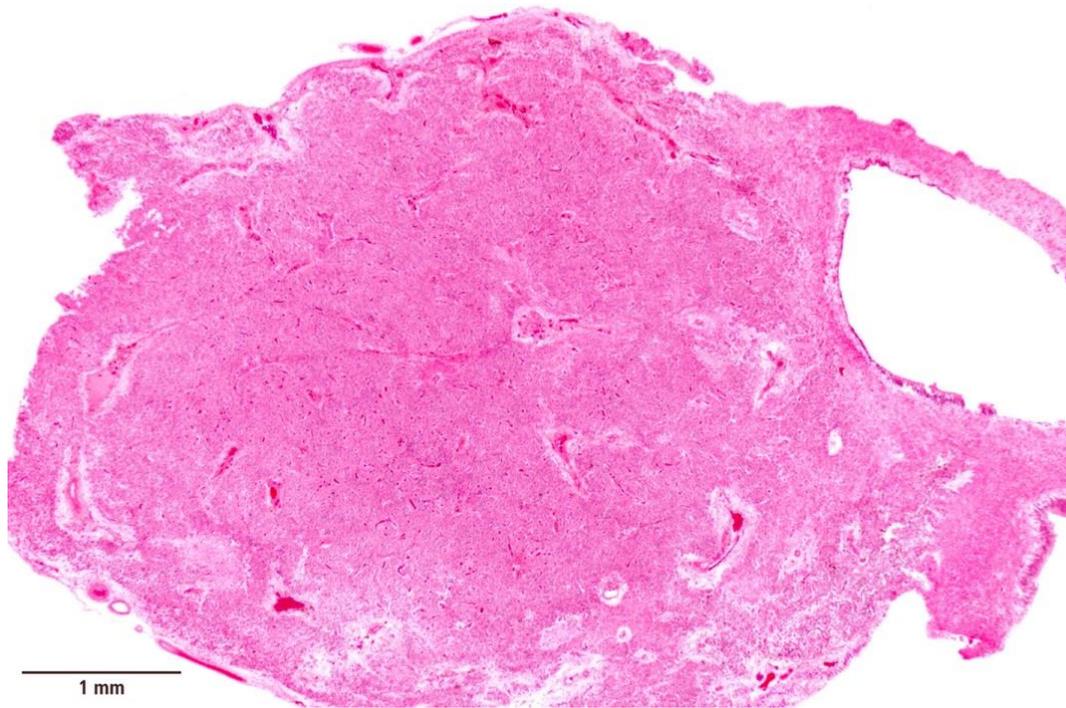
### **2.1.2.3 Innervation**

Die Steuerung der Sekretionstätigkeit der Epiphyse erfolgt über Lichtimpulse, die von der Retina über den Hypothalamus, den thorakalen Abschnitt des Rückenmarks und das Ganglion cervicale craniale zur Epiphyse weitergeleitet werden (König und Liebich, 2009). Diese aus dem oberen Halsganglion

stammenden, postganglionären sympathischen Nervenfasern verlieren beim Eintritt in die Zirbeldrüse ihre Markscheide (Junqueira et al., 2013). Es erfolgt demnach keine Innervation der Epiphyse durch das Großhirn, sondern ausschließlich durch das Ganglion cervicale craniale (Gusek, 1981). Bei Primaten wurde neben den sympathischen auch parasymphatische Nervenfasern nachgewiesen (Junqueira et al., 2013).

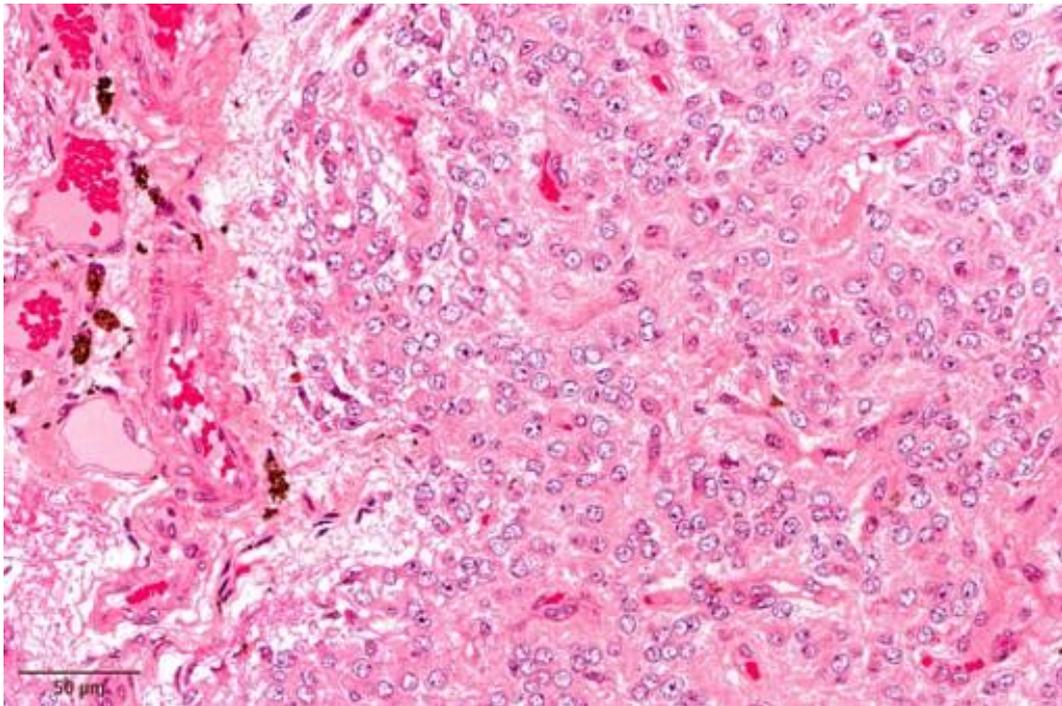
### **2.1.3 Histologie**

Die Zirbeldrüse ist umgeben von der Pia mater, ausgehend von dieser ziehen Bindegewebssepten mit Blutgefäßen und marklosen sympathischen Nervenfasern in das Epiphysengewebe und teilen es in unvollständig getrennte Läppchen (Junqueira et al., 2013). Die sekretorischen Pinealozyten (modifizierte Photorezeptoren) bilden mit den interstitiellen Zellen und den Gliazellen (Astrozyten) das Parenchym der Zirbeldrüse (Kühnel, 2002; Sobotta und Welsch, 2005). Im Alter erhöht sich der Bindegewebsanteil in der Epiphyse (Junqueira et al., 2013), zudem entstehen in den Epiphysen von Menschen, Ratten, Rennmäusen und einigen Vögeln Ablagerungen von Kalksalzen, die als Azervuli bezeichnet werden (Nickel et al., 1992a; Vigh et al., 1998; Kühnel, 2002). Diese sind in Form und Größe variabel und sind röntgenologisch darstellbar (Nickel et al., 1992a).

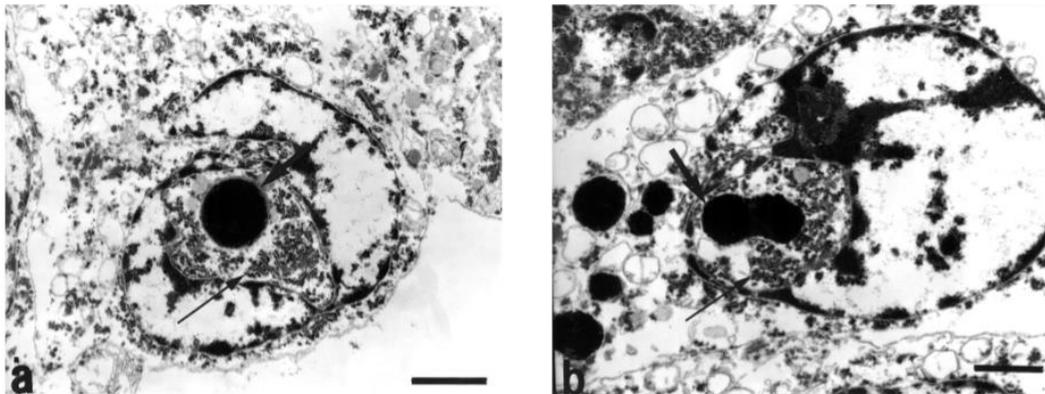


**Abbildung 2: Epiphyse, Pferd, S 265/10, HE-Färbung**

Die Pinealzellen, bzw. Pinealozyten sind rundlich bis polygonal und schwach basophil (Abbildung 3). Sie besitzen einen chromatinarmen, gelappten, unregelmäßigen Kern mit deutlichem Nucleolus (Kühnel, 2002; Junqueira et al., 2013). Elektronenmikroskopisch (Abbildung 4) weisen Pinealozyten zahlreiche Mikrovilli und freie Ribosomen, kleine zytoplasmatische Vesikel sowie ein ausgedehntes, glattes endoplasmatisches Retikulum auf (Junqueira et al., 2013). Sowohl die Mitochondrien als auch der Golgi-Apparat sind nicht vollständig entwickelt. Darüber hinaus fällt das lipochrome Pigment Lipofuscin auf. Anhand einer Imprägnierung mit Silbernitrat konnte histologisch gezeigt werden, dass die Pinealzellen lange Fortsätze haben, die bis an die Gefäße heranreichen (Junqueira et al., 2013).



**Abbildung 3: Epiphyse, Pferd, S 265/10, HE-Färbung, Pinealzellen, Melanozyte**



**Abbildung 4: Elektronenmikroskopisches Bild von Pinealzellen einer menschlichen Epiphyse, dünner Pfeil: faltige Kernmembran und endoplasmatisches Retikulum, dicker Pfeil: Pigment (Bildquelle: Al-Hussain et al., 2006)**

Charakteristisch für interstitielle Zellen sind die länglichen Zellkerne sowie die langen Zytoplasmfortsätze mit den vielen feinen Filamenten, wodurch sie sich leicht von den Pinealzellen unterscheiden lassen. Neben den Pinealozyten und den interstitiellen Zellen kommen Glia- und Mastzellen vor, letztere sind vermutlich für den hohen Histamingehalt der Epiphyse verantwortlich (Junqueira et al., 2013).

## 2.1.4 Physiologie

Die Epiphyse ist eine lichtsensitive Drüse, wobei die Lichtimpulse bei höheren Wirbeltieren indirekt über Neuronenketten in die Zirbeldrüse gelangen (Salomon et al., 2008). Die parakrinen Zellen der Epiphyse produzieren die im folgenden aufgeführten Gewebehormone (Junqueira et al., 2013).

### 2.1.4.1 Melatonin

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamin) ist in nahezu allen lebenden Organismen zu finden und gilt bei Wirbeltieren als das chemische Signal für Dunkelheit (Tan et al., 2010; Amaral und Cipolla-Neto, 2018; Tan et al., 2018). Melatonin wird in hohen Konzentrationen von den Mitochondrien der Pinealzellen aus Serotonin gebildet (Ramis et al., 2015). Serotonin wird unter dem Einfluss der Tryptophan-Hydroxylase und der Aminosäuredecarboxylase in den Pinealozyten aus Tryptophan gebildet, welches über den Blutstrom in die Epiphyse gelangt (Nickel et al., 1992a). Unter dem Einfluss des für die Zirbeldrüse spezifischen Enzyms Hydroxyindol-O-Methyltransferase entsteht durch N-Acetylierung und O-Methylierung aus Serotonin das Melatonin (Gusek, 1981; Junqueira et al., 2013). Melatonin wird ins Blut abgegeben und kann von allen Organen im Körper aufgenommen werden (Nickel et al., 1992a; Amaral und Cipolla-Neto, 2018). Neben der Epiphyse kann Melatonin auch von der Retina, dem Darm und dem Knochenmark gebildet werden (Macchi und Bruce, 2004). Neueste Studien zeigen, dass so gut wie alle Organe, sowie Gewebe und Zellen in der Lage sind, extrapineales Melatonin herzustellen (Tan et al., 2016; Tan et al., 2018). In diesen Geweben wirkt Melatonin auto- und parakrin als Antioxidans (Tan et al., 2018). Der Melatoningehalt ist beispielsweise im Gastrointestinaltrakt durch lokale Produktion zehn bis 100-fach höher als im Blut. Extrapineales Melatonin, das von enterochromaffinen Zellen der Mukosa im Darm produziert wird, gelangt über Blutgefäße oder Diffusion zur glatten Darmmuskulatur und wirkt dort relaxierend. Damit wirkt Melatonin antagonistisch zur kontraktile Wirkung von Serotonin (Acuna-Castroviejo et al., 2014). Das extrapineale Melatonin, das von den Granulosazellen im Ovar gebildet wird, führt auch hier zu einem höheren Melatoningehalt im Ovar als im Blut. Das extrapineale Melatonin schützt die Eizellen besonders während der Ovulation vor oxidativem Stress (Reiter et al., 2014). Das extrapineale Melatonin zeigt keinerlei Einfluss auf den zirkadianen Rhythmus (Hell-Dunkel-Rhythmus) und ersetzt daher nicht dessen

Funktion bei pinealektomierten Tieren (Pang und Ralph, 1975; Tan et al., 2018). Melatonin wird auch über Nahrung (unter anderem Gemüse, Obst, Eier, Fleisch, Fisch, Milch, Bier und Kaffee) aufgenommen (Lei et al., 2013; Tan et al., 2014; Byeon und Back, 2016; Tan et al., 2018). Dieser nahrungsbedingte Melatoninpeak kann dem mitternächtlichen Anstieg des Melatoningehalts der Epiphyse entsprechen, scheint allerdings keine Auswirkung auf den zirkadianen Rhythmus zu haben (Tan et al., 2018).

Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurde die vielfältige Wirkung des Melatonins auf den Körper erst nach und nach erforscht, wobei bis heute die genauen Wirkungsmechanismen auf andere Hormondrüsen und Stoffwechselprodukte zum Teil ungeklärt sind (Salomon et al., 2008). Auswirkungen von Melatonin auf Schlaf, den saisonalen endokrinen Rhythmus, Temperaturregulation, Reproduktion, Immunsystem, Kreislauf und Wachstum sowie auf psychische und neuronale Störungen wurden bereits gezeigt (Sivan et al., 2001; Macchi und Bruce, 2004; Dopico et al., 2015; Amaral und Cipolla-Neto, 2018; Arendt und Middleton, 2018). Viele Zellen des Immunsystems besitzen Rezeptoren für Melatonin und/oder produzieren extrapineales Melatonin. Humane Lymphozyten produzieren beispielsweise eine große Menge an extrapinealen Melatonin. Melatonin scheint eine Rolle bei der Aktivierung von Makrophagen und dem Schutz dessen vor Stickstoffmonoxid zu spielen. Unter anderem reguliert Melatonin die Aktivität von Mastzellen (Acuna-Castroviejo et al., 2014).

Durch den starken Einfluss der Epiphyse auf den endokrinen Rhythmus des Körpers wird sie auch als biologische Uhr bezeichnet (Junqueira et al., 2013). Die Melatoninbildung und -ausschüttung unterliegen einer zirkadianen Rhythmik, die dem Hell-Dunkel-Zyklus entspricht. Licht wirkt hemmend auf die Enzymaktivität der Hydroxyindol-O-Methyltransferase und damit auf die Melatoninbildung (Junqueira et al., 2013). Der nächtliche Melatoninpeak geht einher mit dem Absinken der Körpertemperatur und Zunahme der Müdigkeit, wobei der Blutmelatoninwert nachts auf das Zehnfache ansteigt (Moore, 1978; Gusek, 1981; Dollins et al., 1993; Cagnacci, 1996; Macchi und Bruce, 2004). Im Gegensatz dazu erreicht das Serotonin mittags die höchste Konzentration (Gusek, 1981). Anhand der Tageslichtlänge wird der saisonale Rhythmus gesteuert, damit nimmt die Epiphyse über die Wirkung des Melatonins auf die Hypophysen-Hypothalamus-Gonaden-Achse auch Einfluss auf die Fortpflanzungsorgane.

Sowohl am Hypothalamus als auch auf die Hypophyse hat Melatonin aus der Epiphyse eine dämpfende Wirkung auf die Hormonausschüttung (Ng et al., 2017). Durch die Bindung von Melatonin an der Hypophyse wird weniger luteinisierende Hormon produziert (Nickel et al., 1992a; Salomon et al., 2008; Salhab et al.; Ng et al., 2017). In einer Studie von Murphy et al. (2014) konnte durch zusätzliche Lichtbestrahlung die Zuchtsaison von April auf Mitte Februar vorverlegt werden. Dafür trugen die Stuten ab Anfang Dezember über drei Monate Masken die je ein Auge zwischen 16:30 und 23:00 mit Licht bestrahlte (Murphy et al., 2014). Melatonin bietet in den Ovarien eine Schutzfunktion vor oxidativem Stress (Tamura et al., 2008). Dabei ist die Melatoninkonzentration in großen Follikeln höher, als in den kleinen Follikeln (Salhab et al., 2013). Bei älteren Frauen spielt oxidativer Stress eine Hauptrolle im Alterungsprozess der Ovarien (Grondahl et al., 2010). Daher könnten Melatoningaben bei älteren Frauen am Ende ihrer reproduktiven Zeit von therapeutischem Nutzen sein, um eine gewünschte Schwangerschaft zu ermöglichen (Carlomagno et al., 2018). Studien zu Melatoningaben vor und während der Schwangerschaft zeigten eine höhere Schwangerschaftsrate (Rizzo et al., 2010). Während der Schwangerschaft spielt Melatonin, aufgrund der Plazentagängigkeit, eine wichtige Rolle für die fötale- und embryonale Entwicklung (Okatani et al., 1998; Carlomagno et al., 2018). Das maternale Melatonin hat Einfluss auf die Entwicklung des Nervensystems (Motta-Teixeira et al., 2018). Außerdem gelangt Melatonin durch die Plazenta in den fetalen Blutkreislauf und reguliert den Nucleus suprachiasmaticus und damit den zirkadianen Rhythmus des Fötus (Reiter et al., 2014). In vitro konnte gezeigt werden, dass Melatonin bei wachsenden Embryonen den oxidativen Stress und die Apoptoserate reduziert (Takahashi, 2012; Carlomagno et al., 2018).

Im Weiteren wird auch die körperliche Entwicklung in der Pubertät beeinflusst (Junqueira et al., 2013). Jugendliche, deren Epiphyse tumorös zerstört wurde, zeigen eine vorgezogene pubertäre Entwicklung sowie eine Keimdrüsenhypertrophie, da die hemmende Wirkung des Melatonins auf die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse fehlt (Junqueira et al., 2013). Ebenso zeigt sich nach der Entfernung der Gonaden eine gesteigerte Aktivität der Pinealozysten, was auf einen negativen Feedback Mechanismus der gonadalen Hormone schließen lässt (Gusek, 1981).

Der Einfluss des Melatonins auf den Kreislauf zeigt sich besonders in den frühen

Morgenstunden, in denen der Melatoninspiegel absinkt und mit einem gesteigerten Risiko für Myokardinfarkt und Schlaganfall einhergeht (Behar et al., 1993; Gallerani et al., 1993; Macchi und Bruce, 2004). Unter natürlichen Bedingungen senkt Melatonin den Blutdruck und die Herzschlagfrequenz (negativ chronotrope Wirkung) und unterstützt damit den Parasympathikus. Der blutdrucksenkende Effekt lässt sich zudem durch die Einnahme von Epiphysenextrakt bzw. Melatonin darstellen (Chuang et al., 1993; Macchi und Bruce, 2004).

Darüber hinaus beeinflussen sich Sympathikus und Epiphyse gegenseitig. Bei zunehmender Aktivität des Sympathikus wird Melatonin sezerniert, was wiederum im Sinne eines negativen Feedbacks eine hemmende Wirkung auf den Sympathikus bedingt (Junqueira et al., 2013).

Studien von Maestroni et al. (1993) an pinealektomierten Mäusen zeigen, dass die Unterdrückung des körpereigenen Melatonins zur Abnahme der primären Antikörperbildung, Milz- und Thymusaktivität führt; dieser Effekt konnte durch Melatoningaben rückgängig gemacht werden (Maestroni, 1993; Macchi und Bruce, 2004). Weitere zusätzliche Gaben von Melatonin bewirken eine Zunahme der T-Helferzellen und der Interleukin (IL)-2 Produktion (Caroleo et al., 1992; Macchi und Bruce, 2004). Endogenes Melatonin reguliert zudem die IL-1 Produktion und unterdrückt immunsuppressive Kortikosteroide über Melatoninrezeptoren in lymphatischen Organen (Poon und Pang, 1996; Garcia-Maurino et al., 1998; Macchi und Bruce, 2004). Andere Studien zeigen einen starken antioxidativen Effekt von Melatonin, der dem von Glutathion, Mannitol und Vitamin E überlegen ist (Reiter et al., 1995; Macchi und Bruce, 2004). Neben dem antioxidativen Effekt, wirkt Melatonin aus der Epiphyse entzündungshemmend und antiapoptotisch (Tan et al., 2018). Zudem gibt es Hinweise aus Tierversuchen über die Wirkung von Melatonin auf das Tumorstadium (Karasek und Pawlikowski, 1999; Macchi und Bruce, 2004). Pinealektomierte Ratten zeigen vermehrtes Tumorstadium, welches wiederum durch Melatoningaben verlangsamt werden kann (Nelson und Drazen, 1999; Macchi und Bruce, 2004). Der Gehalt von Melatonin im Blut ist bei PatientInnen mit malignem Melanom um das Vier- bis Fünffache erhöht und soll eine onkostatistische Funktion haben (Feuer und Kerenyi, 1989). Melatonin wirkt antiapoptotisch in gesunden Zellen und apoptotisch in entarteten Zellen (Sainz et

al., 2003). In einem Tierversuch wurden Epiphysen von jungen Mäusen in ältere Individuen transplantiert. Das hatte zur Folge, dass die Lebensspanne der älteren Tiere verlängert wurde. (Pierpaoli und Regelson, 1994).

#### **2.1.4.2 Andere biologisch aktive Substanzen in der Epiphyse**

In der Epiphyse werden neben Melatonin eine Vielzahl biologisch aktiver Polypeptide produziert und sezerniert, wie z.B. Vasopressin, Oxytozin, Vasoactive intestinal peptide (VIP), Neuropeptid Y (NPY), Peptide Histidine Isoleucine, Calcitonin gene-related peptide (CGRP), Substanz B und Somatostatin (Gusek, 1981; Srinivasan, 1989; Macchi und Bruce, 2004). Des Weiteren lassen sich Hormone des Hypothalamus und der Hypophyse, wie Gonadotropin-Releasing Hormone (GRH), Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) und Prolaktin (PRL) in der Epiphyse nachweisen (Macchi und Bruce, 2004).

Neben dem Melatonin wird auch 5-Methoxytryptophol in der Epiphyse gebildet, welches ebenfalls den Tagesrhythmus steuert. Zudem sind andere Peptide z.B. Arginine Vasotocin (AVT) in der Epiphyse gefunden worden, die zumeist in ihrer Funktion der Reproduktion zugeordnet werden (Mess et al., 1979; Macchi und Bruce, 2004).

#### **2.1.5 Altersbedingte und altersunabhängige Veränderungen**

Neure Untersuchungsergebnisse zeigen eine Aktivitätsabnahme der Epiphyse mit dem Alter und somit auch eine reduzierte Melatoninsekretion (Khavinson und Linkova, 2012). Obwohl die Epiphyse keiner altersbedingten starken Strukturveränderungen unterliegt, zeigt sich eine signifikante altersbedingte Funktionsänderung. Im fortgeschrittenen Alter sinkt der nächtliche Melatoninpeak, was einen starken Einfluss auf das endokrine System hat, sowohl auf die Reproduktionsorgane, auf das Immunsystem, Tumorneigung, Stresskompensation und auf den Schlafrhythmus (Reiter et al., 1995). Um altersbedingte Veränderung der menschlichen Epiphyse zu untersuchen, wurden 2700 Epiphysen von Babys bis zu 90 Jahre alten Menschen ausgewertet. Khavinson und Linkova (2012) kamen zu dem Ergebnis, dass beim Menschen keine morphologischen Veränderungen mit dem Alter aufgetreten. Der Bindegewebsanteil nimmt im Alter zu. Kalzifizierung ist dagegen altersunabhängig (Khavinson und Linkova, 2012).

### 2.1.5.1 Verkalkung/Azervuli/ Hirnsand

Wurtman et al. (1964) zeigten einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Azervuli und der Aktivität bzw. Funktion der Epiphyse (Wurtman et al., 1964).

Ob es sich bei der Kalzifizierung in der Epiphyse um ein Altersphänomen handelt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert und tritt sowohl beim Mensch als auch bei Ratten, Rennmäusen und einigen Vögeln auf (Nickel et al., 1992a; Vigh et al., 1998). Bereits Neugeborene und Kleinkinder können Azervuli (Hirnsand, Kalziumgranula) aufweisen, die allerdings röntgenologisch noch nicht sichtbar sind. In den ersten zehn Lebensjahren können röntgenologische sichtbare Azervuli auf einen Pinealtumor hinweisend sein (Gusek, 1981). Humanmedizinische Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen der Kalzifizierung der Epiphyse und Schizophrenie sowie der Alzheimer'schen Krankheit (Sandyk und Kay, 1992; Mahlberg et al., 2008; Tan et al., 2018). Der therapeutische Einsatz von Melatonin bei Alzheimer zeigte jedoch bis jetzt keinen signifikant therapeutischen Nutzen bei Menschen und im Tierversuch (Garcia et al., 2009; Gehrman et al., 2009). Bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson, Amyotropher Lateralsklerose (ALS), Multipler Sklerose (MS) und der Huntington-Krankheit wird der therapeutische Einsatz von Melatonin erforscht. Klinische Studien und Tierversuche zeigten positive Ergebnisse (Weishaupt et al., 2006; Wang et al., 2011; Sanchez-Barcelo et al., 2017).

Bei den histologischen Untersuchungen der Pferdeepiphysen von Bolat et al. (2018), Capucchio et al. (2010) und Cozzi und Ferrandi (1984) von Pferden im Alter von Null bis 23 Jahren konnten keine Azervuli gefunden werden (Cozzi und Ferrandi, 1984; Capucchio et al., 2010; Bolat et al., 2018).

Azervuli sind in der gesamten Epiphyse anzutreffen. Sowohl in der Umgebung von Pinealzellen als auch im Bindegewebe. Sie liegen den Parenchymzellen an, ohne sie zu komprimieren (Tapp und Huxley, 1972). Die Azervuli färben sich in der HE-Färbung basophil.

Die anorganischen Hauptbestandteile der Azervuli sind Kalziumphosphat und Hydroxylapatit. Zu den organischen Bestandteilen zählen Glykoproteine und Proteoglykane (Vigh et al., 1998).

### 2.1.5.2 Lipofuscin Pigment

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Epiphyse von Menschen zeigten, dass Lipofuscin Pigment in allen Altersstufen zu finden ist. Es tritt schon im jungen Alter auf und wird mit zunehmendem Alter mehr. Das Pigment findet sich im Zytoplasma der Pinealzellen und perivaskulär im Bindegewebe (Cozzi und Ferrandi, 1984; Galliani et al., 1989; Khavinson und Linkova, 2012). In der HE-Färbung behält es seine ockerfarbene Originalfarbe bei. In der PAS- (Periodic Acid Schiff) Reaktion ist es positiv und färbt sich kräftig pink an, die Alcian Färbung ist negativ. Es handelt sich um eine Art Lipidose und entsteht aus der Akkumulation von Residualkörpern (Hirano, 1983).

### 2.1.5.3 Melanin Pigment

Das in der Epiphyse von Pferden und Hunden nachgewiesene Melanin scheint dem Neuromelanin sehr ähnlich zu sein (Cozzi und Ferrandi, 1984; J. L. Calvo et al., 1992). Neuromelanin unterscheidet sich vom Lipofuscin in der HE-Färbung durch seine dunkelbraune Färbung, zudem ist Neuromelanin stark argyrophil. In den Spezialfärbungen ist das Melanin der Pferdeepiphysen PAS negativ und Alcianblau positiv. Die Lillie-Trichrom und Masson-Fontana-Färbung sind charakteristisch für Melanin (Hirano, 1983; Cozzi und Ferrandi, 1984). Melanin ist durch Kaliumferricyanid oxidierbar und bildet einen schwarzen Niederschlag. Um Artefakte zu verhindern, kann eine Bleichung mit Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) durchgeführt werden (Cozzi und Ferrandi, 1984).

Elektronenmikroskopisch ist Neuromelanin dem Lipofuscin sehr ähnlich, es enthält aber neben den feinen auch größere Granula (Hirano, 1983). Das Melanin ist sowohl im Zytoplasma der Parenchymzellen (Pinealzellen) als auch perivaskulär im Bindegewebe aufzufinden (Tapp und Huxley, 1972; Cozzi und Ferrandi, 1984; Koshy und Vettivel, 2001).

Es gibt Hinweise, dass der Neuromelaningehalt bei Menschen mit dem Melatoningehalt und einem Tumorwachstum zusammenhängt. Dabei zeigten Menschen mit erhöhtem Blutmelatoningehalt bei neoplastischen Erkrankungen (z.B. malignes Melanom) einen niedrigen Neuromelaningehalt in der Epiphyse (Feuer und Kerényi, 1989).

### 2.1.5.4 Hämosiderin

Hämosiderin ist ein Abbauprodukt von Hämoglobin aus zerstörten Erythrozyten, es enthält dreiwertiges Eisen (Lang, 2006).

Hämosiderin gleicht mit seiner bräunlichen Farbe in der HE-Färbung dem Melanin Pigment. Melanin und Hämosiderin können nur durch Spezialfärbung unterschieden werden. Hämosiderin zeigt in der Turnbull-Blau-Färbung eine blaue Farbe. Melanin kann in der Masson-Fontana-Färbung als schwarzer Niederschlag dargestellt werden und verschwindet durch Bleichung (Kempf et al., 2015).

**Tabelle 1: Spezialfärbungen zur Differenzierung von Pigment**

(+: positiv, -: negativ)

	Melanin	Hämosiderin	Lipofuscin
Turnbull-Blau	-	+	-
PAS	-	+	+
Fontana-Masson	+	-	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Bleichung	+	-	+

## 2.2 Pathologie der Epiphyse

### 2.2.1 Entzündung

Entzündungen der Epiphyse, Pinealiden, treten bei Menschen und Tieren (Ratten und Pferden) meist im Zusammenhang mit einer Uveoretinitis auf, die beim Pferd als Equine rezidivierende Uveitis bekannt ist. Die Epiphyse kann auch bei einer Leptomeningitis eine leukozytäre Infiltration aufweisen (Gusek, 1981).

#### 2.2.1.1 Uveitis assoziierte Pinealitis

Im Tierversuch konnte am Rattenmodell gezeigt werden, dass ein Drittel der Tiere bei denen eine Autoimmune Uveitis (EAU) induziert wurde, Entzündungszeichen in der Epiphyse aufwiesen (Mochizuki et al., 1983; La Perle und Capen, 2009). Kalsow et. al. (1993) beschrieben den Fall einer Stute mit Equiner rezidivierender Uveitis (ERU), die während eines akuten Uveitis-Schubs erblindete und deshalb

ethanasiert wurde. Die Pathohistologie zeigte eine entzündliche Infiltration der Epiphyse mit Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten (Kalsow et al., 1993). In einer weiteren Studie von Kalsow et. al. (1993) wurden zehn Epiphysen von Pferden mit ERU untersucht und 13 Epiphysen von Pferden ohne ERU. Neun der zehn Pferde mit ERU und acht von 13 ohne ERU wiesen T-Lymphozyten in der Epiphyse auf. Die zur Aktivierung der T-Zellen nötigen MHC-Klasse-II-Komplexe, die in Zusammenhang mit der Antigenpräsentation nötig sind, zeigten neun von zehn ERU-Pferde, im Gegensatz dazu aber nur sechs der 13 Uveitis freien Pferde. B-Lymphozyten wurden dagegen nur bei einem Pferd mit akutem ERU Schub diagnostiziert. Es wurde geschlussfolgert, dass das Auftreten von Lymphozyten in der Epiphyse auch durch andere Erkrankungen hervorgerufen werden kann und dass eine unspezifische Lymphozyteninfiltration von einem pathologisch vermehrten Auftreten von Lymphozyten differenziert werden muss (Kalsow et al., 1999).

#### **2.2.1.2 Borna-Enzephalitis**

Bei der Borna'schen Krankheit handelt es sich um eine, durch das Borna Virus (Borna Disease Virus, BDV) ausgelöste, Polioenzephalitis, die vermehrt in bestimmten geographischen Regionen auftritt. Erkrankte Pferde zeigen unter anderem Fieber, Fressunlust, Koliken, Bewegungsstörung bis hin zu schwerer Ataxie sowie Somnolenz bis Stupor. Im weiteren Verlauf kann es zu Krämpfen bis hin zur lähmungsartigen Schwäche kommen. Die Letalität liegt bei 80-90 % nach einer Krankheitsdauer von 1-3 Wochen, wobei auch ein perakuter Verlauf möglich ist (Gerber et al., 2016).

Der Nachweis erfolgt intra-vitam durch einen Antikörpernachweis im Serum und in der Zerebrospinalflüssigkeit. Auch gesunde Pferde können Antikörper im Serum haben, aber nicht in der Zerebrospinalflüssigkeit. Regional unterschiedlich haben 11,5 % bis 22,5 % der Pferde in Deutschland BDV spezifische Antikörper im Blut, wobei nur wenige Tiere erkranken (Long et al., 2014).

Post mortem erfolgt die Diagnostik der Borna-Enzephalitis beim Pferd mittels Histopathologie, Immunhistochemie (IHC), Western Plot und PCR. Für die IHC werden monoklonale oder polyklonale Antikörper für spezifische Bornavirus Proteine verwendet. Häufig werden monoklonale AK für nukleäre Proteine (p38/p39) und Phosphoproteine (p24) angewendet (Long et al., 2014).

Histologisch fallen eine nicht eitrige, hochgradige (hgr.) lymphohistiozytäre Meningoenzephalitis und Myelitis sowie hgr. perivaskuläre lymphoplasmazelluläre Infiltrate (T-Lymphozyten) in bestimmten Bereichen des ZNS (Thalamus, Hypothalamus, Zwischen- und Mittelhirn) und im Rückenmark auf. Diese multifokalen Läsionen sind allerdings unspezifisch und können auch bei anderen unspezifischen ZNS Erkrankungen auftreten. Pathognomonisch sind dagegen die intranukleären Joest-Degen-Bodies im Hippocampus (Herden et al., 1999; Long et al., 2014). BDV Antigene konnte bei Ratten auch im Hypophysenstiel und der Epiphyse nachgewiesen werden. Histologische Veränderungen gleichen denen des Gehirns mit exzessiven perivaskulären lymphoplasmazellulären Infiltraten (Gosztanyi und Ludwig, 1995).

## **2.2.2 Neoplasien und Zysten**

Sowohl bei Menschen als auch bei Tieren treten Tumore der Epiphyse nur selten auf. Die Neoplasien werden in drei Klassen unterteilt: anaplastische Pinealoblastome (PB), Pinealozytome (PC) und Mischtumoren (La Perle und Capen, 2009). Die WHO Klassifizierung von 2007 sieht vor Pinealozytome als Grad I, Mischtumoren als Grad II–III und Pinealoblastome als Grad IV zu klassifizieren (Louis et al., 2007). Die Gradierung ist abhängig von der Mitoserate, der Neurofilament Protein (NFP) Expression und von morphologischen Eigenschaften z.B. die Bildung pinealozytärer Rosetten der PC's und Pseudorosetten bei PB's. Bei Menschen machen Pinealtumoren und Pinealzysten ein Drittel der Läsionen an der Epiphyse aus. (Jouvet et al., 2015).

### **2.2.2.1 Tumore der Pinealparenchymzellen**

#### **2.2.2.1.1 Pinealozytome**

In der Humanmedizin werden Pinealozytome (PC) vor allem bei Erwachsenen zwischen dem dreißigsten und dem sechzigsten Lebensjahr diagnostiziert. PC's sind makroskopisch umschriebene, grau oder graubraune Tumoren, die eine homogene und meist feinkörnige Schnittfläche aufweisen, z.T. mit kleinen degenerativen zystenartigen Veränderungen (Jouvet et al., 2000; Jouvet et al., 2015).

Histologisch bestehen typische PC's aus gut differenzierten, einheitlichen Tumorzellen und wachsen in einem rosettenförmigem Muster. Diese großen

pinealozytären Rosetten sind das charakteristische Merkmal der PC's. Die Tumorzellen ähneln den Pinealozyten. Die Tumorzellen von PC's haben ein eosinophiles Zytoplasma, kurze Zellfortsätze und runde bis ovale Zellkerne mit feinem Chromatin und unauffälligen Nucleoli. Mikroverkalkungen können auftreten. Bei einigen Formen von PC's können große Ganglienzellen und/oder pleomorphe multinukeläre Riesenzellen vorkommen, Nekrosen sind dagegen sehr selten (Fevre-Montange et al., 2008; Jouvét et al., 2015).

Die Tumorzellen zeigen keine erhöhte Mitoserate aber eine hohe NFP Expression und sind immunhistochemisch positiv für Neuronen – spezifische Enolase (NSE), Synaptophysin (SYN) und z.T. für Chromogranin A (Coca et al., 1992; Fevre-Montange et al., 2008; Jouvét et al., 2015).

PC's haben eine gute Prognose, sie metastasieren nicht. Als geeignete Behandlungsmethode gilt die chirurgische Resektion. Nach der Therapie liegt die Fünfjahresüberlebensrate bei 86-91 % (Fauchon et al., 2000; Jouvét et al., 2015).

#### **2.2.2.1.2 Pinealoblastome**

Typischerweise treten Pinealoblastome (PB) bei Kindern auf. Sie sind makroskopisch schwer abgrenzbar, sind grau-rosa gefärbt und sind weich bis gallertartig. PB's zeichnen sich durch ihre hohe Tumorzelldichte und lokale vaskuläre Proliferationen aus und bestehen aus kleinen basophilen Zellen mit hyperchromatischen, runden bis ovalen Zellkernen. In PB's können neuroblastische Rosetten vom Homer Wright Typ (Pseudorosetten), retinoblastische Rosetten vom Flexner – Wintersteiner Typ oder Fleuretten durch Photorezeptor-Differenzierung auftreten (Jouvét et al., 2000; Jouvét et al., 2015).

PB Tumorzellen teilen sich schnell, produzieren keine oder nur geringe Mengen NFP und Chromogranin A und zeigen üblicherweise eine punktartige oder diffuse Immunreaktivität für SYN und NSE (Jouvét et al., 2000; Jouvét et al., 2015).

Aufgrund der hohen Mitoserate zerstören PB's die Epiphyse, zeigen regressive Veränderungen (hämorrhagische und/oder nekrotische Bereiche) und wölben sich in den dritten Ventrikel vor. Nekroseherde gehen manchmal mit Mikrokalzifizierungen einher. Bei seltenen Formen von PB's können die Tumorzellen Melaninpigment enthalten (Jouvét et al., 2015).

### **2.2.2.1.3 Mischtumore der Epiphyse**

Mischtumore (Pinealisparenchymtumor intermediärer Differenzierung, PPTID) der Epiphyse treten bei jungen erwachsenen Menschen zwischen dem 20sten und 40sten Lebensjahr auf. Makroskopisch wachsen Mischtumore umschrieben und zeigen eine graue oder graubraune Farbe sowie eine homogene und feinkörnige Schnittfläche auf. Histologisch zeigen Mischtumore ein lobuläres oder diffuses Wachstum. Das Zytoplasma ist klar mit einem rundlichen Kern. Differentialdiagnostisch müssen Neurozytome oder Oligodendrogliome in Betracht gezogen werden. Ein weiterer Phänotyp von Mischtumoren der Epiphyse, der als Übergangsvariante bezeichnet wird, besteht aus PC-ähnlichen Bereichen und Regionen mit lobulärem oder diffusem Wachstumsmuster. Andere Wachstumsformen weisen sowohl das rosettenartige Wachstum von PC's als auch Bereiche mit kleinen basophilen Zellen mit hyperchromatischen, runden bis ovalen Zellkernen von PB's auf. In Mischtumoren der Epiphyse können Nekroseherde und vaskuläre Proliferate auftreten (Jouvet et al., 2000; Jouvet et al., 2015).

Bei Mischtumoren ist die Mitoserate für Grad II weniger als sechs und für Grad III sechs oder mehr Mitosen pro 10 HPF (high power field). Immunhistochemisch färben sich Grad III Tumoren, im Gegensatz zu Grad II Tumoren, nur schwach mit Anti-NFP (Jouvet et al., 2015). Bei den Mischtumoren fällt die Expression von neuronalen Markern (SYN, NFP, Chromogranin A) unterschiedlich aus (Jouvet et al., 2000; Jouvet et al., 2015).

Die Prognose für PatientInnen von Grad II Tumoren ist besser als die für Grad III Tumore. Die Fünfjahresüberlebensrate liegt bei 74 % für Grad II und bei 42 % für Grad III Mischtumoren der Epiphyse (Jouvet et al., 2015).

### **2.2.2.1.4 Keimzelltumoren der Epiphyse / Germinome**

Primordiale Keimzellen migrieren aus dem Dottersack entlang der Mittellinie in die Region der Genitalleiste, wo sie sich zu Spermatozyten bzw. Eizellen differenzieren. Fehlwanderungen von Keimzellen und deren Persistenz in Organen der Mittellinie (Epiphyse, supraselläre Region) kann zur Entwicklung von Keimzelltumoren führen (Gusek, 1981; Nagasawa et al., 2017). Die Tumoren werden in zwei Gruppen unterteilt, die germinomatösen und die nicht-germinomatösen GCTs (Teratome, embryonale Karzinome, Yolk-Sac Tumore

und Chorionkarzinome). Diese seltenen Tumore (5 % der primären Gehirntumoren der westlichen Bevölkerung) treten bevorzugt im Kindes- und Jugendalter auf und betreffen vor allem die asiatische Bevölkerung (18 % der primären Gehirntumore). Es gibt eine Geschlechtsdisposition für Männer. Diese Geschwülste treten nur in der Mittellinie des Gehirns auf (Nagasawa et al., 2017).

Germinome wachsen infiltrativ und sind unscharf begrenzt, wodurch sie auch den dritten Ventrikel und andere benachbarte Regionen invadieren können. Tumorzellen zeigen eine hohe Mitoserate (Gusek, 1981). Teratome verhalten sich genau gegenteilig, sie zeichnen sich durch eine niedrige Mitoserate aus und sind gut abzugrenzen (Gusek, 1981; Nagasawa et al., 2017).

Histopathologisch bestehen Germinome aus Lymphozyten und undifferenzierten großen, rundlichen Zellen mit klarem Zytoplasma, runden Zellkernen und deutlichem Nukleolus. Teratome setzen sich aus den Bestandteilen aller drei Keimblätter zusammen (Nagasawa et al., 2017).

Keimzell-Karzinome bestehen aus epithelähnlichen Zellen mit großen Zellkernen und weisen Papillen- bzw. Drüsenarchitektur auf. Charakteristisch sind zudem die erhöhte Mitoserate und nekrotische Bereiche (Louis et al., 2007; Nagasawa et al., 2017).

Yolk-Sac (Dottersack) Tumore bestehen aus wenig differenzierten Epithelzellen, die oft netzartig miteinander verknüpft sind und Schiller-Duval Körper bilden können. Schiller-Duval Körper sind charakteristisch für Dottersacktumoren und organisieren sich um Blutgefäße in einem sinusförmigen Muster (Kiratli et al., 2008; Nagasawa et al., 2017). Tumorzellen von Dottersacktumoren weisen zudem eine variable Mitoserate auf (Louis et al., 2007; Nagasawa et al., 2017).

Chorionkarzinome zeigen die typische Struktur des Chorions aus einkernigen Zytotrophoblasten und mehrkernigen Synzytiotrophoblasten (Yamagami et al., 1983) (Bell et al., 2009; Nagasawa et al., 2017). Chorionkarzinome zeigen zudem regressive Veränderungen im Sinne von herdförmigen Einblutungen und Nekrosen (Nagasawa et al., 2017)

#### **2.2.2.2 Pinealiszysten**

Zysten in der Epiphyse sind häufig Zufallsbefunde bei MRT Untersuchungen. Zysten bis zu 5 mm Durchmesser treten bei 1,4 % bis 4,3 % bei gesunden

PatientInnen auf (Michielsen et al., 2002; Jouvét et al., 2015). Bei Autopsien zeigten 40 % der älteren Menschen Zysten, die größer als 2 mm sind (Hasegawa et al., 1987; Jouvét et al., 2015). Zudem ist eine höhere Inzidenz von Pinealiszysten bei Frauen beschrieben (Sawamura et al., 1995; Jouvét et al., 2015).

Die Zysten sind makroskopisch sichtbar und enthalten eine klare oder blassgelbe proteinreiche Flüssigkeit. Histologisch ist die innere Zystenwand aus fibrillären Gliafortsätzen, Rosenthal-Fasern (veränderte Astrozyten) und eosinophilen Granularkörperchen aufgebaut und kann Hämosiderin Ablagerungen enthalten (Abbauprodukt von Hämoglobin, Eisen-Protein-Komplex). Die Gliazellschicht ist vom Epiphysenparenchym und einer Bindegewebsschicht abgegrenzt. Das Epiphysengewebe ist scharf von der inneren Gliazellschicht abgegrenzt und kann durch chronische Kompression desorganisiert erscheinen (Jouvét et al., 2015).

Blutungen in die Zyste können plötzlich klinische Symptome auslösen (Pinealiszysten Apoplexie). Zysten können dysembryogenetischer Genese sein, sich aus einem Divertikel des dritten Ventrikels entwickeln oder in Folge von Blutungen und degenerativen Prozessen entstehen. (Jouvét et al., 2015).

## **3 MATERIAL UND METHODEN**

### **3.1 Tiere und Untersuchungsmaterial**

Die untersuchten Pferdeepiphysen wurden gemeinsam mit anderen endokrinen Organen zwischen Juli 2008 und Dezember 2012 am Institut für Tierpathologie entnommen. Insgesamt wurden im Zuge dessen 119 Pferdeepiphysen makroskopisch beurteilt und gewogen. Die gesammelten Epiphysen stammen von Pferden aller Geschlechter, Altersstufen, sowie von Großpferden und Ponys. Dokumentiert wurden Sektionsnummer, Saison des Todeszeitpunkts (Winter: November bis Februar, Frühjahr: März bis Mai, Sommer: Juni bis August und Herbst: September bis November), Alter, Geschlecht, Rasse, Todesart, Körpergewicht, Erhaltungszustand sowie die Gesamtdiagnose anhand der Sektionsbefunde (Anhang 11.5).

Alle Epiphysen wurden längs halbiert und eine Hälfte in Paraffin und die andere in Kunststoff eingebettet, routinemäßig mit Hämatoxylin-Eosin (HE)– und Giemsa – gefärbt und histologisch beurteilt. Zudem wurden die Pferdeepiphysen von Stuten und Wallachen, die älter als ein Jahr waren und von denen sowohl Körpergewicht als auch Epiphysengewicht bekannt waren, mittels quantitativ-stereologischer Methoden untersucht.

### **3.2 Fixierung und Vorbereitung**

Nach Entnahme der Epiphysen wurden diese mit einer Laborwaage (Analytic A 120 S, Sartorius, Göttingen) gewogen und anschließend für mindestens 24 Stunden in 4%iger Formaldehydlösung auf einem Taumler (Modell 4010, Köttermann, Hänigsen) fixiert.

### **3.3 Paraffineinbettung und Schnittherstellung**

Die gewonnen Epiphysen wurden mit Hilfe eines Autotechnikon (Histomaster 2050/DI, Bavimed, Birkenau) entwässert.

**Tabelle 2: Entwässerungsprozess Paraffineinbettung**

Vorgang	Zeit
Spülen mit Aqua dest.	30 Min.
Ethanol 70%	2 x 1,5 Stdn.
Ethanol 96%	2 x 1,5 Stdn.
Ethanol 100%	2 x 1,5 Stdn.
Xylol (Isomerengemisch, W. Gräen GmbH & Co. München)	2 x 30 Min.
Xylol	1 x 1,5 Stdn.
Paraffin bei 60°C (Sherwood Medical, St. Louis, USA)	1 x 2 Stdn.
Paraffin bei 60°C	1 x 3 Stdn.

Nach der Entwässerung und Durchtränkung mit Paraffin wurden die Epiphysen mit einer Ausgießstation in Blöcke verbracht (Tissue Tek II Tissue Embedding Center 4604, Miles Laboratories, Slough, England). Anschließend wurden mit einem Mikrotom (HM 315, Mikrom, Walldorf) nominell 1 µm dicke Schnitte angefertigt, in 40°C warmem Wasser (Daglef Patz, Wankendorf) gestreckt und auf einen Objektträger aufgezogen. Danach trocknen die Schnitte bei ca. 40°C in einem Wärmeschrank (Memmert, Schwabach). Für die Turnbull-Blau-Färbung und Immunhistochemie wurden die Schnitte auf spezielle Objektträger (Star Frost, Engelbrecht, Edermünde) aufgezogen.

### 3.4 Färbung der Paraffinschnitte

Die Entparaffinierung erfolgte zehn Minuten in Xylol (Isomerengemisch, W. Gräean GmbH & Co. München), anschließend wurden die Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe (100%iges, 96%iges und 70%iges Ethanol) gewässert und in Aqua destillata (dest.) überführt. Danach erfolgten die verschiedenen, im Folgenden beschriebenen Färbungen und eine erneute Entwässerung der Schnitte, die daraufhin wieder in Xylol verbracht und mit Histokitt/Coverquick eingedeckt wurden (Coverquick, Labonord, Mönchengladbach).

### 3.4.1 Hämalaun-Eosin-Färbung

**Tabelle 3: Vorgang der Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung der Paraffinschnitte**

Vorgang	Zeit
Mayers Hämalaun Lösung	4 Min.
Wässern unter fließendem warmen Leitungswasser	4 Min.
0,5 % HCl-Alkohol (Anhang 11.1.1.2) differenzieren (zwei- bis fünfmal eintauchen)	5 Sek.
Wässern unter fließendem warmen Leitungswasser	4 Min.
Eosin-Lösung 1%ig (Anhang 11.1.3)	2 Min.
Spülen in Aqua dest	1 Sek.
Ethanol 70%	2 Sek.
Ethanol 96%	2 Sek.
Ethanol 100%	2 Sek.
Xylol (Isomerengemisch, W. Gräen GmbH & Co. München)	1 Min.

### 3.4.2 Giemsa-Färbung

**Tabelle 4: Vorgang der Giemsa-Färbung der Paraffinschnitte**

Vorgang	Zeit
Giemsa-Gebrauchslösung (Anhang 11.1.2.2) in 65°C Wasserbad	1 Std.
Spülen in A. dest.	
Differenzieren in 0,5%iger Essigsäure (Anhang 11.1.2.3) (Farbumschlag blau zu rot)	1 Sek.
Ethanol 96%ig	2 Sek.
Ethanol 100%ig	2 Sek.

Xylol (Isomerengemisch, W. Graen GmbH & Co. München)	1 Min.
--	--------

### 3.4.3 Spezialfärbungen an Paraffinschnitten

Beispielhaft wurden Paraffinschnitte von zwei Epiphysen (S 600/09, S 642/09) mit folgenden Methoden angefärbt.

#### 3.4.3.1 Turnbull-Blau-Färbung

Mit der Turnbull-Blau-Färbung lässt sich freies zwei- und dreiwertiges Eisen nachweisen.

Tabelle 5 zeigt die Arbeitsschritte einer Turnbull-Blau-Färbung.

**Tabelle 5: Turnbull-Blau-Färbung nach Quinckes**

Vorgang	Zeitaufwand
Ammoniumsulfid 10%ig (Anhang 11.1.3.1)	1 Std.
Spülung mit Aqua dest.	2 Sek.
Kaliumhexacyanoferrat (III) 20%ig (Anhang 11.1.3.2)	10 Min.
Spülung mit Aqua dest.	2 Min.
Kernechtrot 0,1%ig (Anhang 11.1.3.4)	5 Min.
Spülung mit Aqua dest.	2 Min.
Ethanol 70%ig	2 Sek.
Ethanol 96%ig	2x2 Sek.
Ethanol 100%ig	2 Sek.
Xylol (Isomerengemisch, W. Graen GmbH & Co., München)	1 Min.

### 3.4.3.2 PAS-Reaktion

**Tabelle 6: PAS-Reaktion**

Vorgang	Zeitaufwand
Perjodsäure 1%ig (Anhang 11.1.4.1)	10 Min.
Wässerung mit fließendem, kaltem Wasser	10 Min.
Schiff'sches Reagenz (bei Raumtemperatur, im dunklen)	30 Min.
Wässerung mit fließendem, warmem Wasser	5 Min.
Mayer's Hämalaun	2 Min.
Bläuen mit fließendem, warmem Wasser	5 Min.
Differenzierung durch ca. 3- bis 4-maliges kurzes Eintauchen in HCl-Alkohol 0,5 % (Anhang 11.1.4.3)	
Wässerung mit fließendem, warmem Wasser	5 Min.
aufsteigende Alkoholreihe und Xylol	

### 3.4.3.3 Bleichung

Die Bleichung erfolgt vor der Färbung für zwölf bis 24 Stunden in 5%iger Bleichlösung (Anhang 11.1.5.1).

## 3.5 Kunststoffeinfbettung und Schnitttherstellung

Für die histologische Auswertung, wurden die Epiphysen nach der Methode von Hermanns et al. (1981) in Kunststoff eingebettet (Hermanns et al., 1981).

Zuerst durchliefen die Epiphysen einem Entwässerungsprozess in einem Einbettungsautomaten (Citadell 1000, Shandon GmbH, Frankfurt) nach folgendem Schema:

**Tabelle 7: Entwässerungsprozess Kunststoffeinbettung**

Vorgang	Zeitaufwand
Fixation in 4%iger Cacodylat-gepufferter Paraformaldehydlösung	24 Stdn.
Spülen in Spülflüssigkeit	3 Stdn.
Ethanol 30%	3 Stdn.
Ethanol 50%	5 Stdn.
Ethanol 70%	2 Stdn.
Ethanol 96%	2 Stdn.
Ethanol 96%	3 Stdn.

Im Anschluss wurden die entwässerten Epiphysen für 24 Stunden bei 4°C auf einem Taumler (Modell 4010, Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze-Hänigsen) in einer Lösung aus 50 % Glykoldimethacrylat (GMA, Fluka-Nr.: 64170, Buchs, Schweiz) und 50 % Methacrylsäuremethylester (MMA, Fluka-Nr.: 64200, Buchs, Schweiz) verbracht. Danach wurden die Proben in Einbettungsmedium A (siehe Anhang 11.1.2) für fünf Stunden bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden nun mit Lösung A mit 60 µl Dimethylanilin, als Starter der Polymerisation, in Polyethylengefäße verbracht und über 24 Stunden in 4°C kaltem Wasser unter Luftabschluss ausgehärtet. Anschließend konnten die fertigen Kunststoffblöcke mit einem Hartschnittmikrotom (Supercut 2050, Reichert-Jung, Cambridge Instruments GmbH, Nussloch) mit einer nominellen Dicke von 1,5 µm geschnitten werden. Bevor die Schnitte auf den Objektträger aufgezogen wurden, erfolgte eine Streckung in einem 55°C warmen Wasserbad. Auf einer 60°C warmen Heizplatte (Medite OT540 Medizintechnik, Burgdorf) wurden die Objektträger nachfolgend getrocknet.

### 3.6 Färbung der Kunststoffsnitte

Von jeder Epiphyse wurde je ein Schnitt mit Hämalaun-Eosin (HE)- und Giemsa gefärbt.

#### 3.6.1 Hämalaun-Eosin (HE)–Färbung an Kunststoffsnitten

**Tabelle 8: Vorgang der Hämalaun Eosin (HE)–Färbung der Kunststoffsnitte**

Vorgang	Zeitaufwand
Mayers Hämalaun sauer	5 Min.
Wässern unter fließendem Leitungswasser	10 Min.
Differenzieren in 1%igem HCl-Ethanol (Anhang 11.3.1)	ca. 2 Sec.
Wässern unter fließendem Leitungswasser	10 Min.
Trocknen zwischen Fließpapier, danach bei 60°C auf der Heizplatte (OTS 40, Medite Medizintechnik, Burgdorf)	ca. 2 Min.
Färben in Eosin–Phloxin-Gebrauchslösung (Anhang 11.3.1.2)	20 Min.
Spülen in Aqua dest.	2 x 2 Sec.
Trocknen zwischen Fließpapier, dann bei 60°C auf der Heizplatte	ca. 2 Min.
Xylol	ca. 2 Sec.
Eindecken in Coverquick (Labonord, Mönchengladbach)	

### 3.6.2 Giemsa-Färbung

**Tabelle 9: Vorgang zur Giemsa-Färbung der Kunststoffsschnitte**

Vorgang	Zeitaufwand
Giemsa-Gebrauchslösung (Anhang 11.3.2.1) bei 65°C im Wasserbad	90 Min.
Phosphat Puffer (Anhang 11.3.2.2)	2 Sec.
Differenzieren in 0,5%iger Essigsäure (Anhang 11.3.2.3)	2 Sec.
Spülen in Aqua dest.	2 Sec.
Trocken zwischen Fließpapier, dann bei 60°C auf der Heizplatte	ca. 2 Min.
Xylol	2 Sec.
Eindecken in Coverquick (Labonord, Mönchengladbach)	

### 3.7 Immunhistochemie Borna

Die Vorbereitung von Paraffinschnitten für den Immunhistochemischen Nachweis von Bornavirusantigen erfolgte wie bei den anderen Färbungen der Paraffinschnitte. Alle Färbeschritte erfolgten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur, sofern nicht anders erwähnt. Verdünnungen wurden mit tris-buffered saline (TBS) pH 7,6 angefertigt.

**Tabelle 10: Immunhistochemie Borna**

Vorgang	Zeitaufwand
100 ml Methanol + 3 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Anhang 11.4.1)	30 Min.
Spülen in TBS (Anhang 11.4.2)	10 Min.
Normal Goat Serum auftragen	30 Min.
Primärantikörper: Mouse Anti Borna, Verdünnung 1:1000 in TBS bei 4°C	17 Std.
Spülen in TBS	10 Min.
Sekundärantikörper: Goat Anti Mouse biotinyliert, Verdünnung 1:200 in TBS	50 Min.
Spülen in TBS	10 Min.
Chromogen: Diaminobenzidin (DAB)-Impact (Anhang 11.4.3)	5 Min.
Spülen in Aqua dest.	10 Min.
Hämalaun Lösung	1 Min.
In fließendem Leitungswasser bläuen	5 Min.
Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol	
Eindecken mit Coverquick	

## 3.8 Gruppenverteilung der Pferde

### 3.8.1 Demographische Daten der Pferde für qualitativ-histologische Auswertungen

Insgesamt wurden 119 Epiphysen von 25 Ponys und 88 Großpferden histologisch untersucht. Die Übersicht der Einzelbefunde findet sich im Anhang (11.5). Die Tabellen 13, 14 und 15 zeigen die Geschlechterverteilung und die Zuordnung Großpferd/Pony zu den vier Altersgruppen. Das mittlere Alter der Pferde betrug 13,5+7,4 Jahre.

**Tabelle 11: Zuordnung Großpferd/Pony in Bezug zur Geschlechterverteilung, n=119**

	Wallache	Stuten	Hengste
Großpferde	42	33	13
Ponys	8	13	4
unbekannt	3	1	2

**Tabelle 12: Geschlechterverteilung in Bezug zu den Altersgruppen, n=119**

	Wallache	Stuten	Hengste
< 1 Jahr	0	1	1
1 bis 10 Jahre	13	9	11
10 bis 17 Jahre	20	21	3
> 17 Jahre	20	15	4
unbekannt	0	1	0

**Tabelle 13: Zuordnung Großferd/Pony in Bezug zu den Altersgruppen, n=119**

	Großferde	Ponys	unbekannt
< 1 Jahr	1	0	1
1 bis 10 Jahre	26	6	1
10 bis 17 Jahre	33	10	1
> 17 Jahre	28	9	2
unbekannt	0	0	1

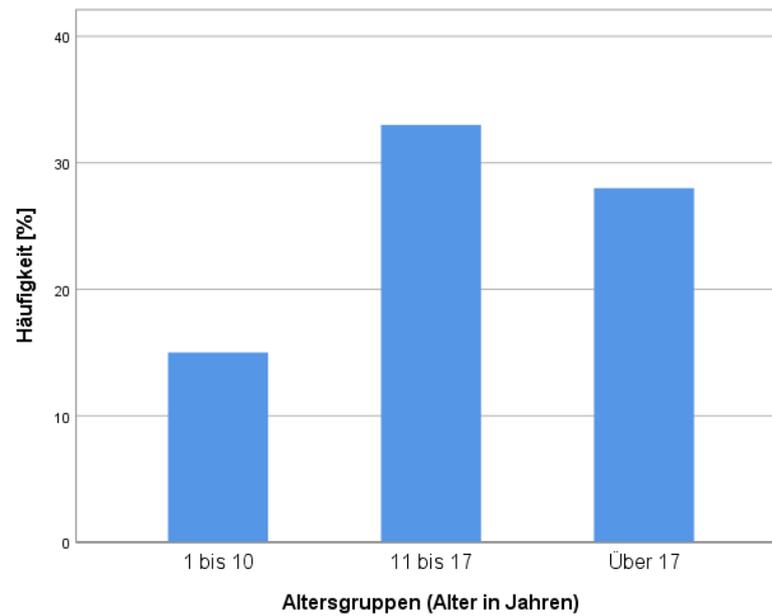
### 3.8.2 Demographische Daten der Pferde für quantitativ-stereologische Untersuchungen

Von der stereologischen Untersuchung wurden Hengste, Pferde unter einem Jahr, Tiere mit fehlenden Angaben zum Gewicht (Epiphysegewicht oder Körpergewicht) sowie schlecht erhaltene histologischen Präparate ausgenommen. Insgesamt verblieben 76 Epiphysen von 55 Großferden und 18 Ponys für die quantitativ-stereologischen Untersuchungen. Darunter befanden sich 32 Stuten und 44 Wallache. Die Geschlechterverteilung zwischen Großferden und Ponys ist in Tabelle 14 dargestellt.

**Tabelle 14: Geschlechterverteilung innerhalb der Ordnungsgruppe Großferd/Pony, n=76**

	Großferde	Ponys	unbekannt
Wallache	35	6	3
Stuten	20	12	0

Tabelle 14 zeigt die Zahl der Fälle von Stuten und Wallachen bei Großferden und Ponys. Fünfzehn Ponys und Pferde waren zwischen ein und zehn Jahren, 33 zwischen zehn und 17 Jahren und 28 über 17 Jahre alt (Abbildung 5). Tabelle 15 veranschaulicht die Geschlechterverteilung innerhalb der Altersgruppen sowie die Zuordnung Großferd bzw. Pony. Von drei Pferden ist keine Rasse bekannt (S 837/10, S 1078/09, S 597/09).



**Abbildung 5: Prozentualer Anteil der Tiere in drei Altersgruppen, n=76**

**Tabelle 15: Geschlechterverteilung und Zuordnung Großpferd/Pony in Bezug zu den Altersgruppen, n=76**

	1 bis 10 Jahre	11 bis 17 Jahre	Über 17 Jahre
Wallach	8	17	19
Stute	7	16	9
Großpferde	12	23	20
Ponys	3	9	6

Sechzehn Epiphysen (21%) wurden im Herbst (September-November), 21 (28%) im Winter (November-Februar), 23 (30%) im Frühjahr (März-Mai) und 16 (21%) im Sommer (Juni-August) gewonnen. Tabelle 16 veranschaulicht die Geschlechterverteilung innerhalb der Saisonen sowie die Zuordnung Großpferd bzw. Pony.

**Tabelle 16: Geschlechterverteilung und Zuordnung Großpferd/Pony in Bezug zu den Saisonen, n=76**

	Herbst	Winter	Frühjahr	Sommer
Wallach	11	9	16	8
Stute	5	12	7	8
Großpferd	12	14	17	12
Pony	3	7	5	3

### 3.9 Histologische Auswertung

Von jeder Pferdeepiphyse wurde je ein Kunststoff- oder Paraffinschnitt HE – gefärbt, bei Kunststoffschnitten erfolgte zudem routinemäßig eine Giemsa – Färbung. Neben den pathologischen Veränderungen wurden auch der Erhaltungszustand des Präparats sowie die postmortalen Veränderungen dokumentiert. Zu den postmortalen Veränderungen zählen freie Erythrozyten am Rand des Präparates und ein wabiges Muster sowie aufgelöste Zellgrenzen. Zudem wurde das Vorkommen von Pigmenten semiquantitativ bestimmt.

Die Zuordnung erfolgte in die folgende Grade:

**Tabelle 17: Befundgraduierung**

Grad 0	Ohne Befund
Grad 1	Geringgradig (ggr.)
Grad 2	Mittelgradig (mgr.)
Grad 3	Hochgradig (hgr.)

Folgende Befunde wurden bei der qualitativ-histologischen Auswertung im speziellen berücksichtigt:

**Tabelle 18: Befunde**

Postmortale Veränderungen
Hyperämie
Perivaskuläre lymphoplasmazelluläre Infiltration unter Beteiligung von Makrophagen
Pigmente (Lipofuszin, Melanin, Hämosiderin)
Verkalkungen (Azervuli, Hirnsand)
Neoplastische und zystische Veränderungen

### 3.10 Quantitativ-stereologische Auswertung

#### 3.10.1 Berechnung des spezifischen und relativen Gewichts der Epiphyse

Das Verhältnis zwischen dem Körpergewicht des Pferdes und dem Epiphysengewicht berechnet sich durch die Division von Epiphysengewicht durch Körpergewicht. Das spezifische Gewicht der Pferdeepiphysen wurde exemplarisch mit der Submersionsmethode nach Scherle bestimmt (Scherle, 1970). Dabei wurde zum einen die Volumenverdrängung exemplarisch für drei Epiphysen in 4 %iger Formaldehydlösung bestimmt und zum anderen das Gewicht der Epiphyse ermittelt. Die Messungen erfolgten jeweils mit einer Analysewaage (Sartorius BP 61 S, Göttingen). Um das Volumen zu ermitteln, wurden die Epiphysen an einer gebogenen 0,20x25 mm Akupunkturnadel fixiert und in ein mit 4 %iger Formaldehydlösung gefülltes Gefäß freischwebend eingetaucht, um die Volumenverdrängung durch die Gewichtszunahme auf der Präzisionswaage zu erfassen. Zwischen jeder Messung wurde die Waage neu tariert. Sowohl die Bestimmung des Volumens als auch die Gewichtsmessung wurden für drei Epiphysen dreimal wiederholt.

Das spezifische Gewicht berechnet sich aus dem Gewicht dividiert durch das Volumen in Gramm durch Kubikzentimeter. Das spezifische Gewicht der untersuchten Pferdeepiphysen betrug 1,06 g/cm<sup>3</sup> (min-max 1,03-1,09; SD 0,03, CV 2,44).

$$\text{Spezifisches Gewicht} = \text{Gewicht} / \text{Volumen} [\text{g}/\text{cm}^3]$$

Das relative Gewicht der Epiphyse zum Körpergewicht des Pferdes wird nach folgender Formel berechnet.

$$\text{Relatives Gewicht} = \text{absolutes Gewicht} / \text{Körpergewicht} * 100 [\%] * 1000$$

### 3.10.2 Quantitativ-stereologische Analysen

Die quantitativ-stereologischen Analysen wurden am Helmholtz Zentrum in Neuherberg, München (Abteilung: Immunopathology of Chronic obstructive pulmonary disease (COPD)) durchgeführt. Für die Messung wurde ein Bildanalyse-System verwendet, bestehend aus einem Lichtmikroskop (Orhoplan; Leitz, Deutschland) mit einer Farbvideokamera (CCTV WVCD132E; Matsushita, Japan).

Um die zu zählenden Punkte pro Schnitt/Tier zu ermitteln, wurde das Nomogram nach Weibel (Weibel, 1963) verwendet. Bei einer durchschnittlichen geschätzten Dichte der Pinealzellen von 60 % müssen, nach dem Nomogram von Weibel (Weibel, 1963), mindestens 400 Punkte pro Tier ausgezählt werden. Mit der „region of interest“ (ROI) Funktion der Stereologiesoftware NewCast (Visiopharm, Dänemark) wurden am Bildschirm die Umrisse der Epiphyse markiert. In der 200-fachen Vergrößerung wurden anschließend systematisch zufällig 20 % der Gesamtschnittfläche der Epiphyse ausgezählt. Es wurde unterschieden zwischen Pinealzellen, Bindegewebszellen, Gefäßen und Pigment.

### 3.10.3 Bestimmung der Volumendichte und des Gesamtvolumens der Pinealzellen

Die Volumendichte der Pinealzellen errechnet sich aus der Punktezahl (P) der Pinealzellen zur Summe aller gezählten Punkte. Das Gesamtvolumen der Pinealocyten errechnet sich aus der Volumendichte der Pinealzellen multipliziert mit dem Gesamtvolumen der Epiphyse.

$$\text{Volumendichte (V}_{V(\text{Pin/Epi})}) \text{ der Pinealzellen} = P (\text{Pinealzellen}) / P (\text{Gesamt})$$

$$P (\text{Gesamt}) = P (\text{Pinealzellen}) + P (\text{Bindegewebe}) + P (\text{Gefäße})$$

$$\text{Gesamtvolumen (V) der Pinealzellen} = V_{V(\text{Pin/Epi})} \text{ Pinealzellen} \times V \text{ Epiphyse}$$

### 3.11 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm SPSS 25.0 (SPSS GmbH Software, Deutschland). Die zu untersuchenden Daten wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest auf Normalverteilung untersucht. Alle Parameter erwiesen sich als normalverteilt: Alter in Jahren, Körpergewicht [kg], absolutes Epiphysengewicht [mg], relatives Epiphysengewicht [%\*1000], Gesamtvolumen der Epiphyse (V) [cm<sup>3</sup>] und Volumendichte ( $V_{V(Pin/Epi)}$ ) (Pinealzellen/Epiphyse). Für die Korrelationsanalyse wurde die Korrelationsanalyse nach Pearson für normalverteilte Parameter verwendet. Der Korrelationstest nach Kendall-Tau-b wurde für ordinalskalierte Daten (geringgradig, mittelgradig, hochgradig) verwendet. Für die weitere Untersuchung der stereologischen Daten wurden die parametrischen Daten mittels One-way Analysis of Variances (ANOVA)-Test analysiert mit anschließendem post-hoc LSD-Test (Least Significant Difference) verglichen. Als signifikant wurden Ergebnisse mit Werten von  $p < 0,05$  interpretiert.

## **4 ERGEBNISSE**

### **4.1 Histologische Untersuchung der Epiphyse**

#### **4.1.1 Postmortale Veränderungen**

Zu den postmortalen Veränderungen zählen in histologischen Schnitten randständige Erythrozytenansammlungen z.T. auch Lymphozyten und ein wabiges, irreguläres Gewebemuster. Bei den meisten Pferden lagen Anzeichen postmortaler Veränderungen vor (89 %). Eine ggr. Ansammlung von freien randständigen Erythrozyten fand sich bei 71 % der Epiphysen.

Bei der semiquantitativen histologischen Untersuchung (Anhang 11.6) wurden die Befunde in geringgradig (1, ggr.), mittelgradig (2, mgr.) und hochgradig (3, hgr.) bzw. kein Befund (0) eingeteilt.

#### **4.1.2 Pigment**

Von 119 Epiphysen wurden je ein HE und ein Giemsa gefärbter Schnitt histologisch untersucht. Von den 119 Epiphysen wurde eine Kendall-Tau-b Korrelation zwischen Alter und hellem ockerfarbigem Pigment (Lipofuscin) bzw. dunkelbräunlichem Pigment (Melanin/Hämosiderin) analysiert. Es wurde zwischen dem hellen ockerfarbigen Lipofuscin und dem dunkelbraunen Melanin/Hämosiderin in der HE-Färbung unterschieden. Melanin ist in der HE-Färbung schlecht von Hämosiderin zu unterscheiden.

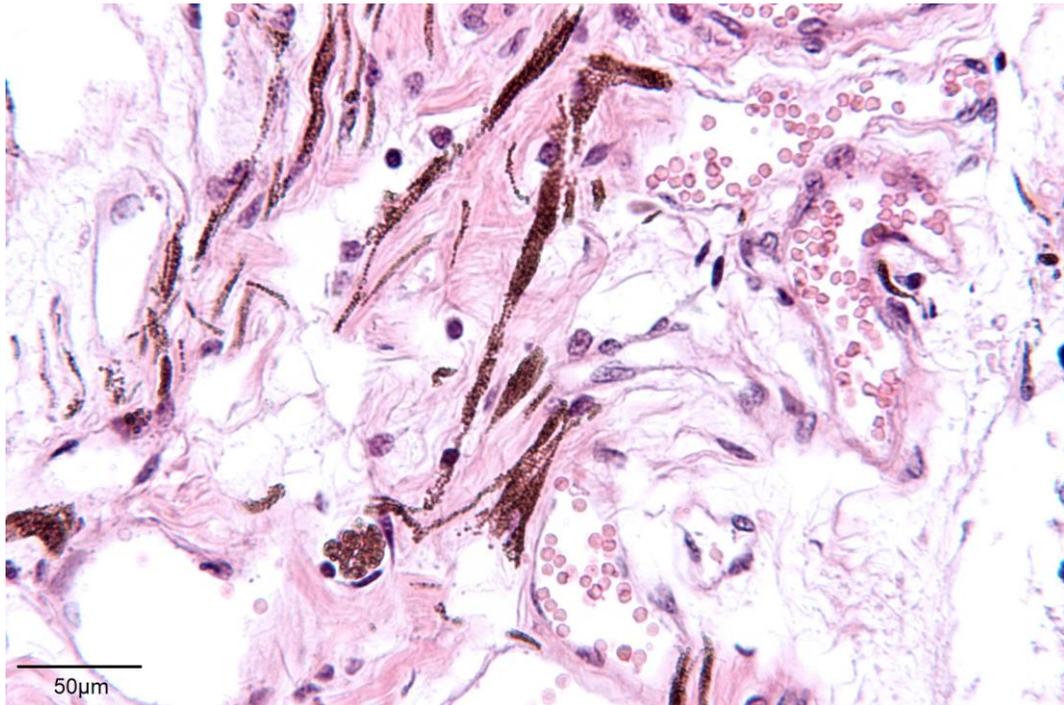
Die HE-Färbung zeigte langgestreckte, melaninhaltige Zellen mit feinkörnigem regulär angeordneten Melaningranula und einen großen Anschnitt einer rundlichen Zelle mit grobscholligerem braunem Pigment (Sidero-/Melanophage) (Abbildung 6, Abbildung 7).

Die gebleichte HE-Färbung ließ Melanin verschwinden, Siderophagen und Hämosiderin blieben sichtbar (Abbildung 8).

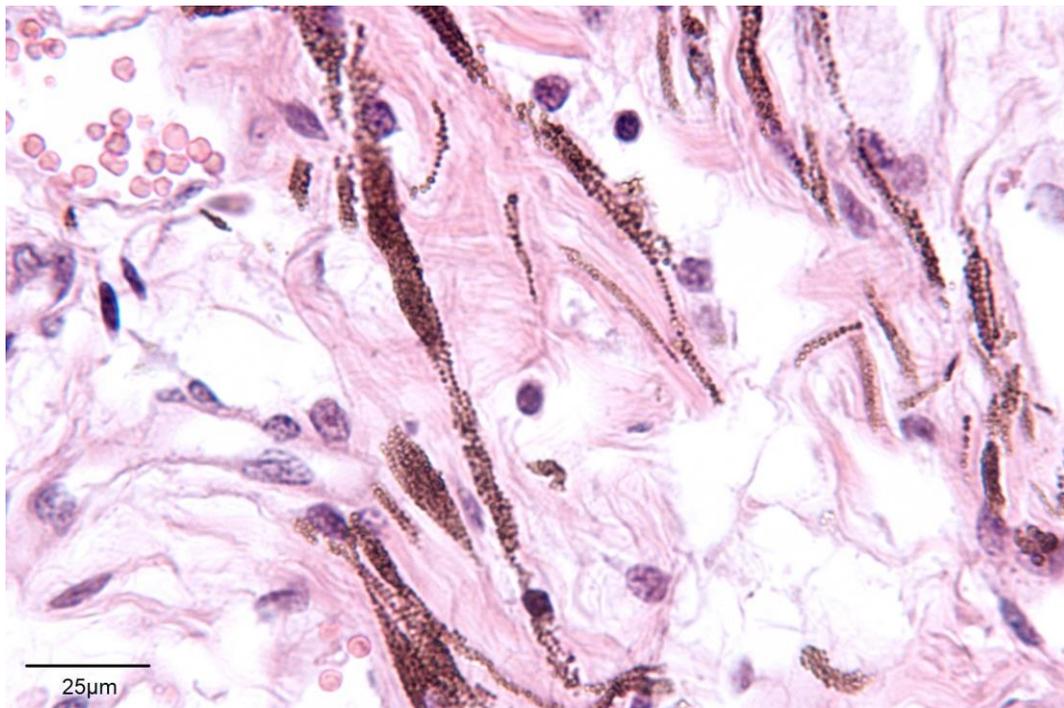
Hämosiderin glich mit seiner bräunlichen Farbe in der HE-Färbung dem Melanin. Beide Pigmente konnten nur durch Spezialfärbung unterschieden werden. Hämosiderin färbte sich in der Eisenfärbung (Turnbull-Blau-Färbung) dunkelblau. Melanin behält seine braune Farbe in der Turnbull-Blau-Färbung bei (Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 11, Abbildung 12). Abbildung 12 machte eine Zelle

sichtbar, die sowohl Hämosiderin als auch eisennegatives Melaninpigment enthielt. In der gebleichten Turnbull-Blau-Färbung verschwand Melanin, Hämosiderin blieb blau (Abbildung 13).

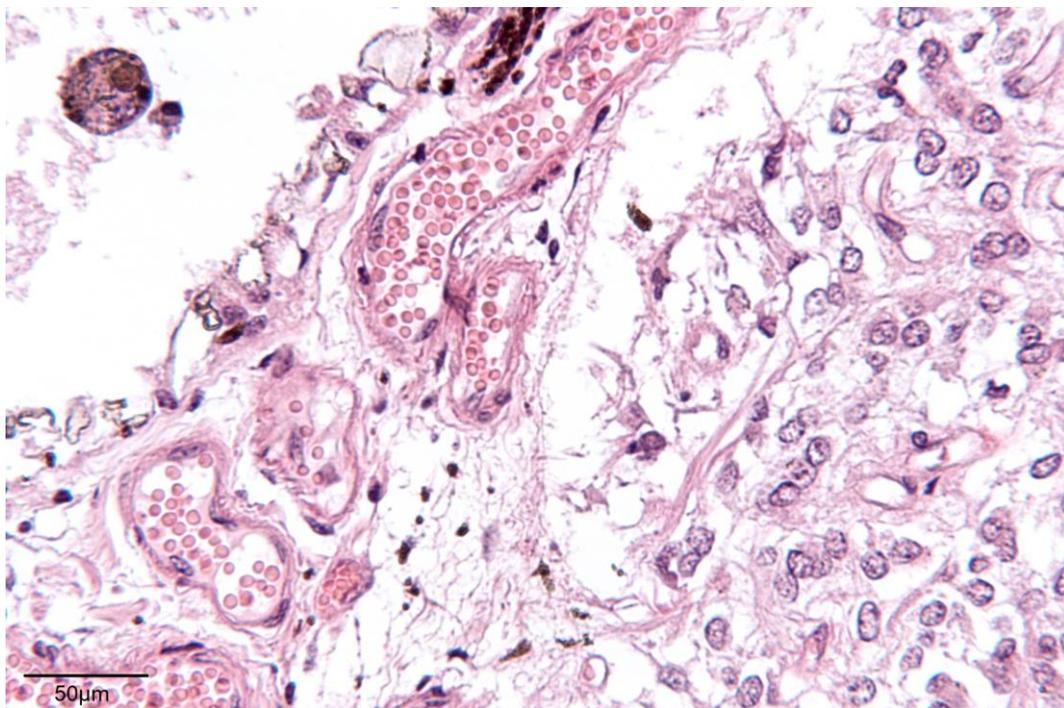
In der PAS Färbung reagierten Siderophagen PAS positiv, Melanin behält seine bräunliche Färbung bei (Abbildung 14, Abbildung 15). Bei der geblichenen PAS verschwand Melanin, Hämosiderin/Siderophagen ließen sich nicht bleichen (Abbildung 16, Abbildung 17).



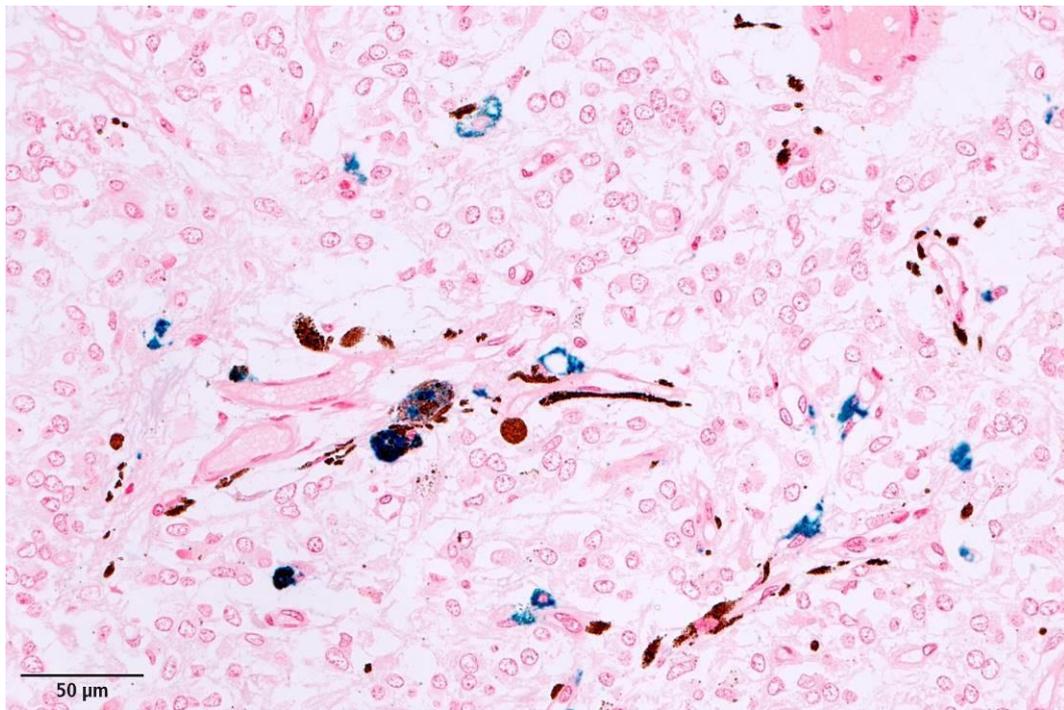
**Abbildung 6: Epiphyse, Pferd, S 642/09, 25x Vergrößerung, HE-Färbung, langgestreckte melaninhaltige Zellen, unteres Bilddrittel rechts Melano- oder Siderophage**



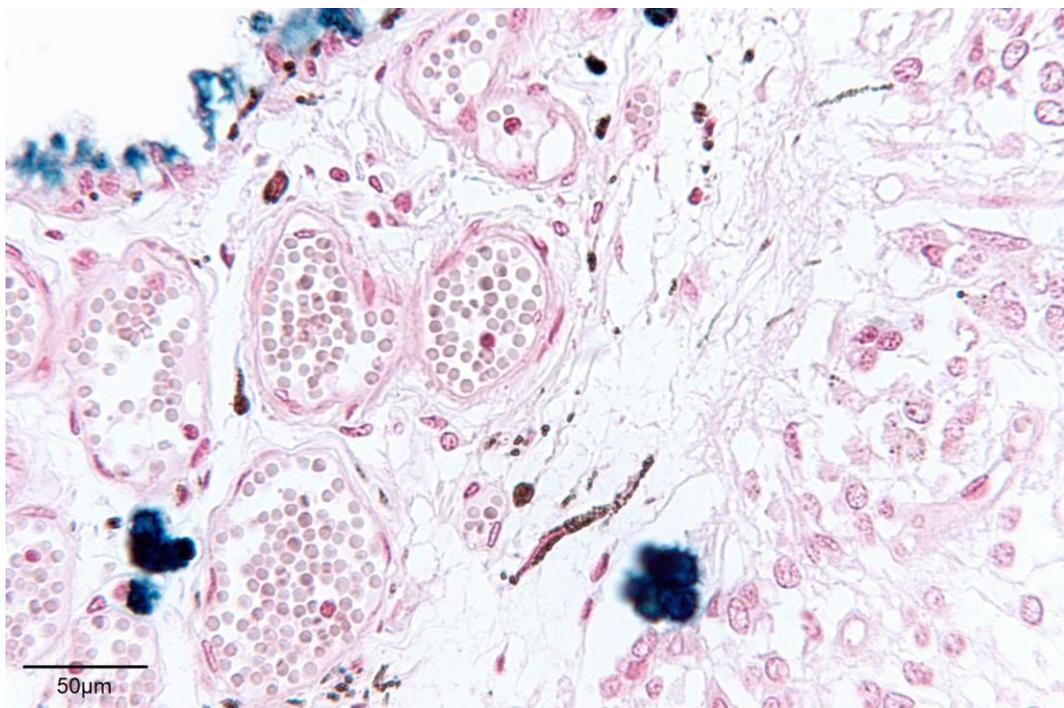
**Abbildung 7: Epiphyse, Pferd, S 642/09, 40x Vergrößerung, HE-Färbung, Melanin und Melano- oder Siderophage (unten am Bildrand)**



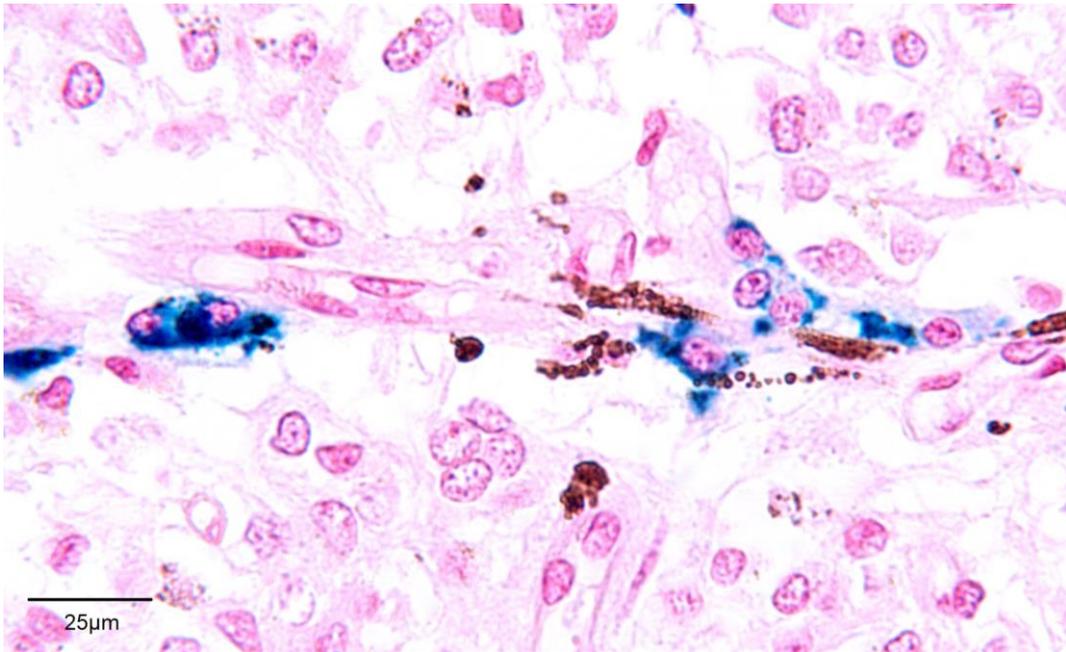
**Abbildung 8: Epiphyse, Pferd, S 642/09, 25x Vergrößerung, HE-gebleicht, oben links Siderophage im Gefäßlumen und Hämosiderin in der Gefäßwand (dunkelbraun). Keine melaninhaltigen Zellen**



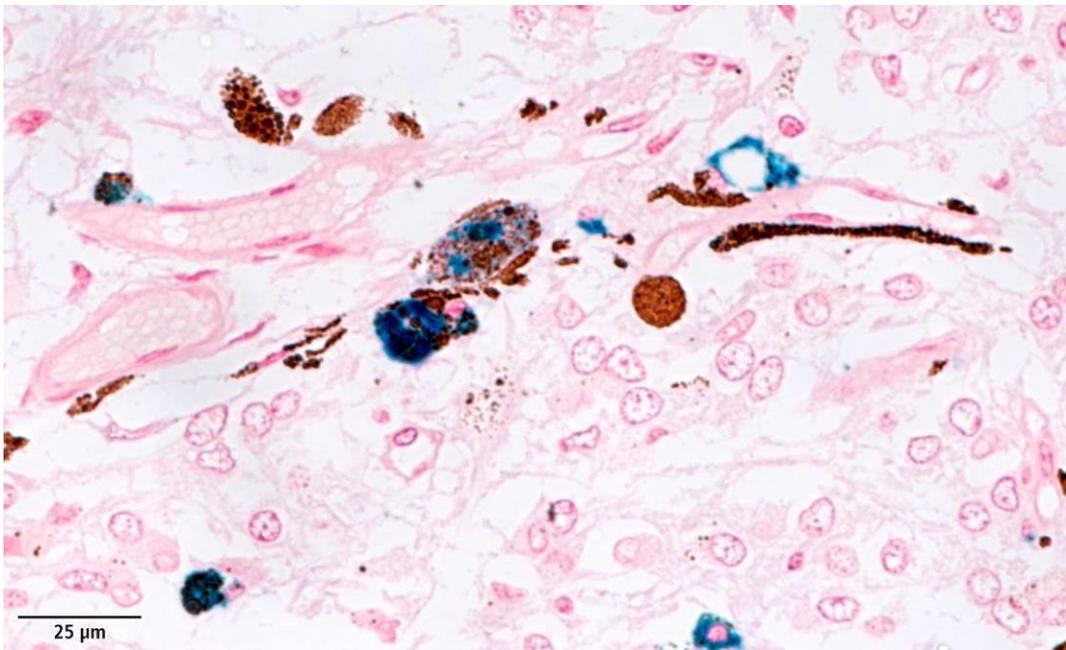
**Abbildung 9: Epiphyse, Pferd, S 642/09, 25x Vergrößerung, Turnbull-Blau-Färbung ungebleicht, Melanin (bräunlich) und Hämosiderin (blau)**



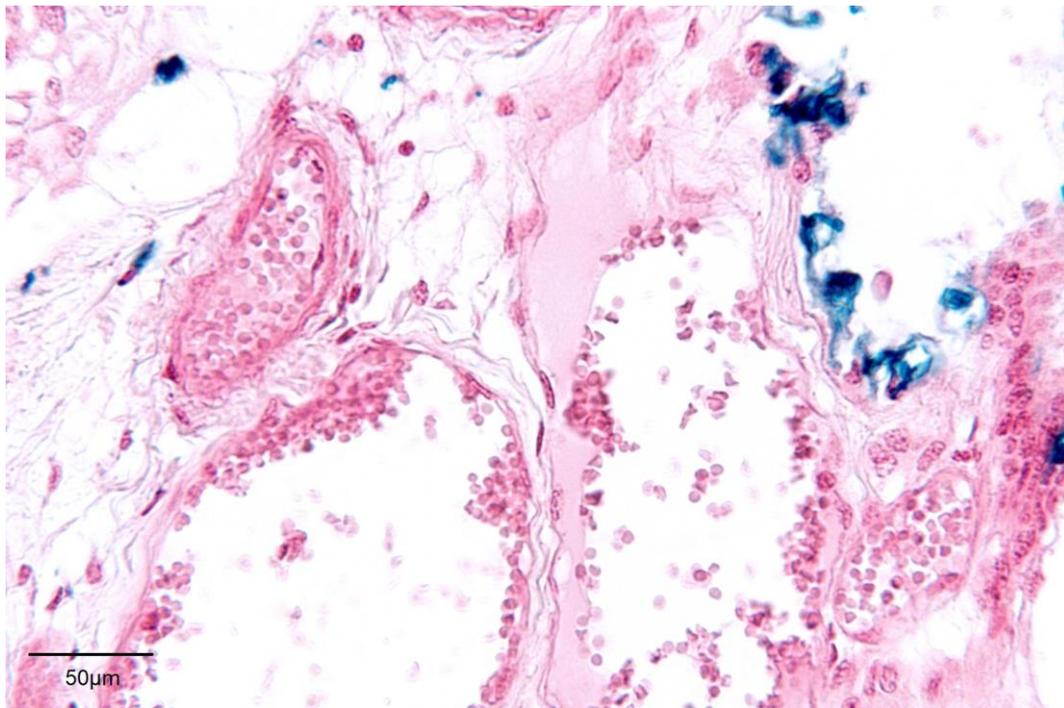
**Abbildung 10: Epiphyse, Pferd, S 642/09, 25x Vergrößerung, Turnbull-Blau-Färbung ungebleicht, Hämosiderin in Gefäßwand, Siderophagen und langgestreckte melaninhaltige, Turnbull-Blau negative Zellen**



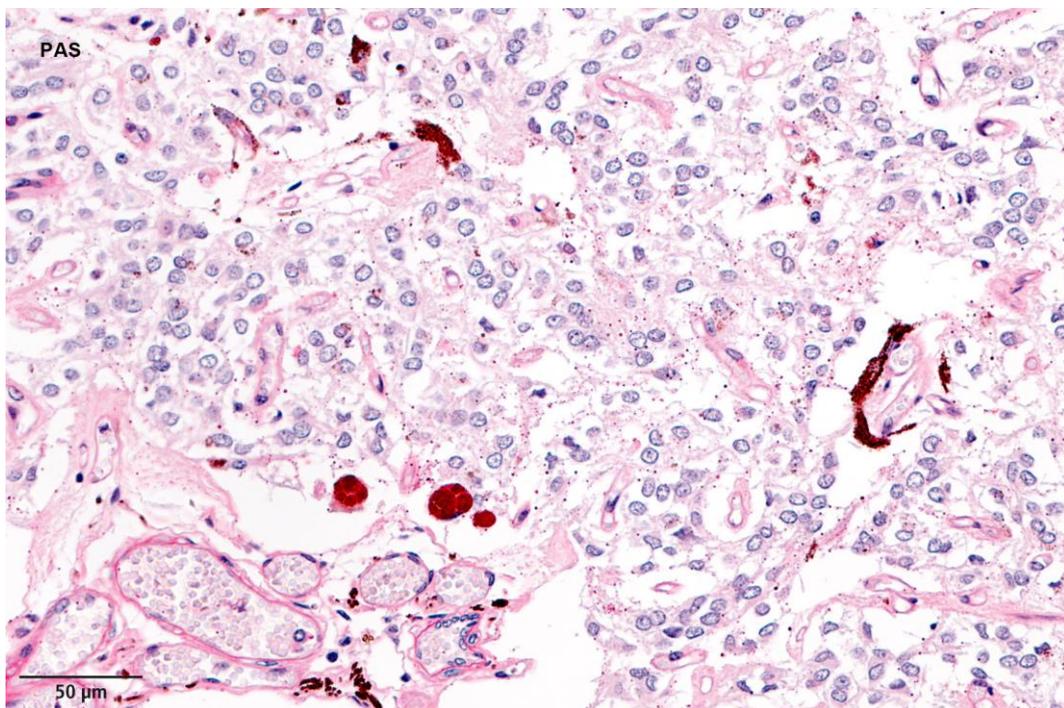
**Abbildung 11: Epiphyse, Pferd, S 642/09, 40x Vergrößerung, Turnbull-Blau-Färbung ungebleicht, melaninhaltige Zellausläufer neben Turnbull-Blau positivem Pigment in Pinealiszellen**



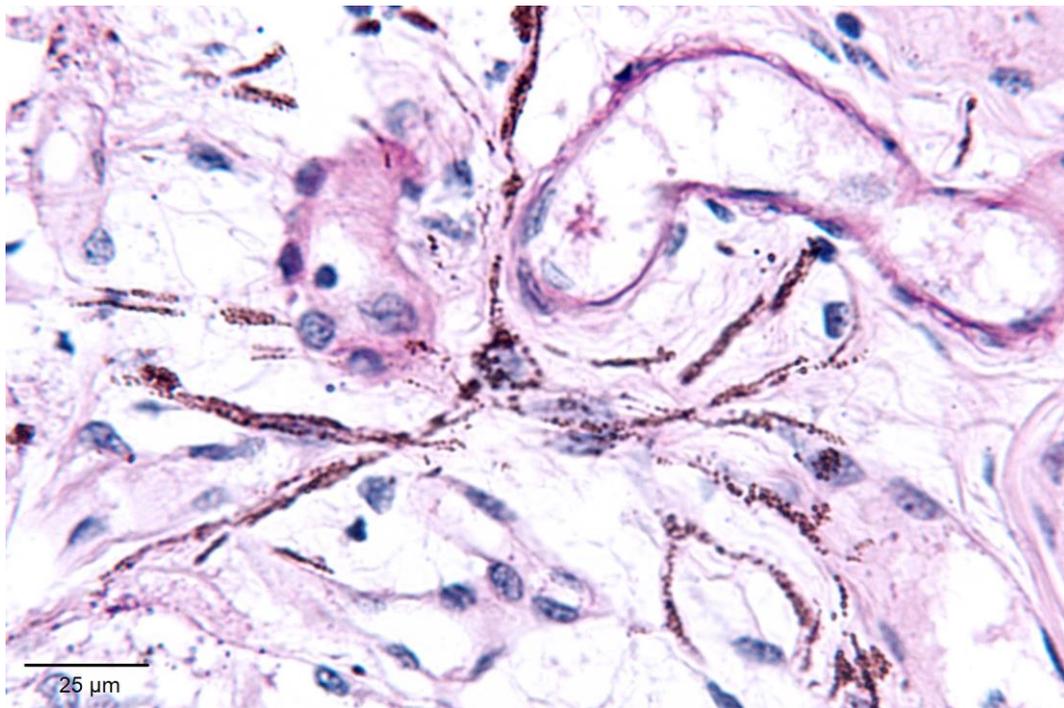
**Abbildung 12: Epiphyse, Pferd, S 642/09, 40x Vergrößerung, Turnbull-Blau-Färbung ungebleicht, Hemosiderin/Siderophagen (blau), neben teils langgestreckten melaninhaltigen Zellen (braun), ein Makrophage mit phagozytiertem Melanin und Hemosiderin**



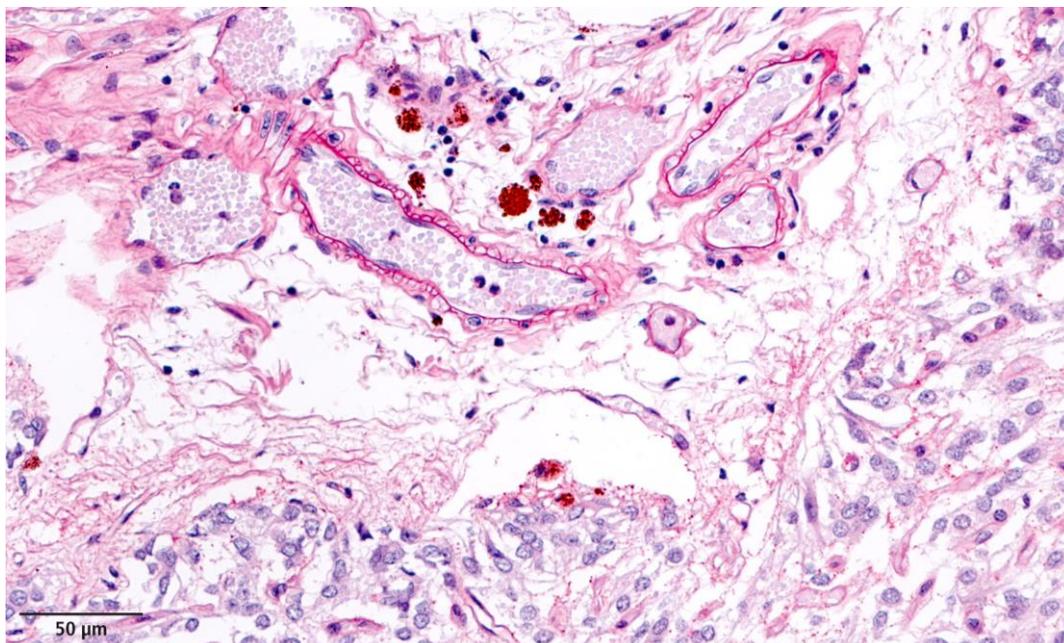
**Abbildung 13: Epiphyse, Pferd, S 642/09, 25x Vergrößerung, Turnbull-Blau-Färbung gebleicht, Hämosiderin in der Gefäßwand und im Interstitium**



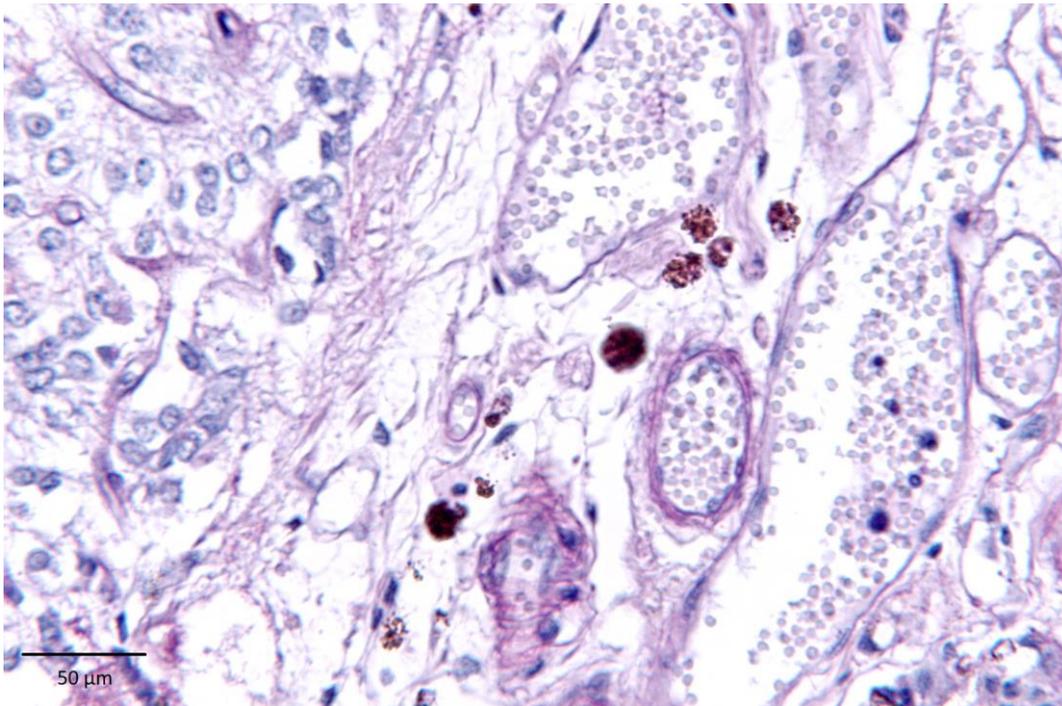
**Abbildung 14: Epiphyse, Pferd, S 600/09, 25x Vergrößerung, PAS ungebleicht, melaninhaltige Zellen im Bindegewebe, PAS positive Siderophagen**



**Abbildung 15: Epiphyse, Pferd, S 642/09, 40x Vergrößerung, PAS ungebleicht sternförmige melaninhaltige Zelle mit langen Zytoplasmaausläufern im Interstitium**



**Abbildung 16: Epiphyse, Pferd, S 600/09, 25x Vergrößerung, PAS gebleicht, Siderophagen, Ödem und einzelne Lymphozyten im gefäßführenden Bindegewebe, keine melaninhaltigen Zellen**

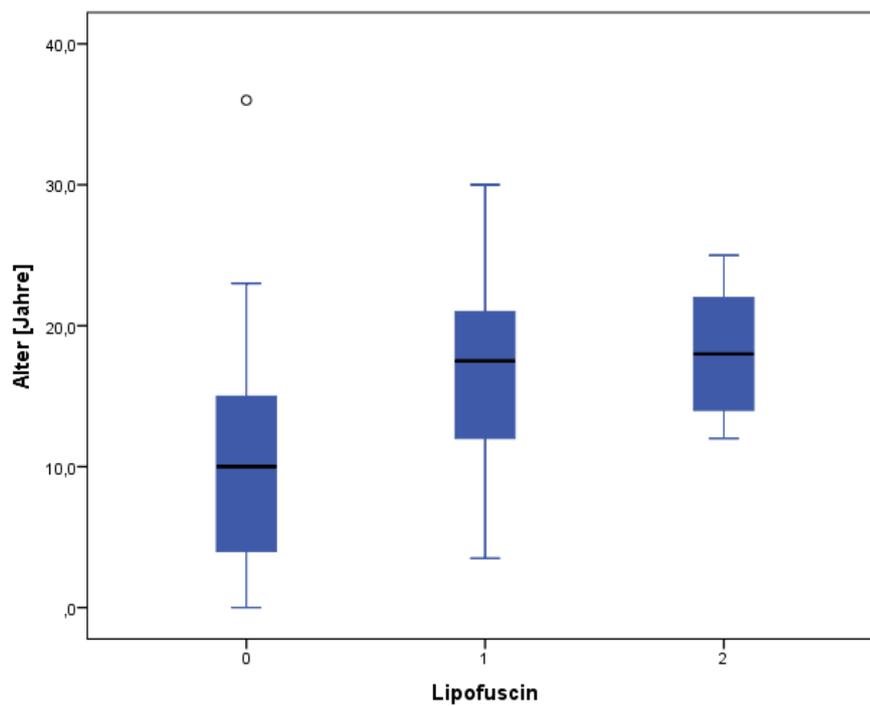


**Abbildung 17: Epiphyse, Pferd, S 642/09, 25x Vergrößerung, PAS gebleicht, Siderophagen/Hämosiderin, keine melaninhaltigen Zellen im Interstitium**

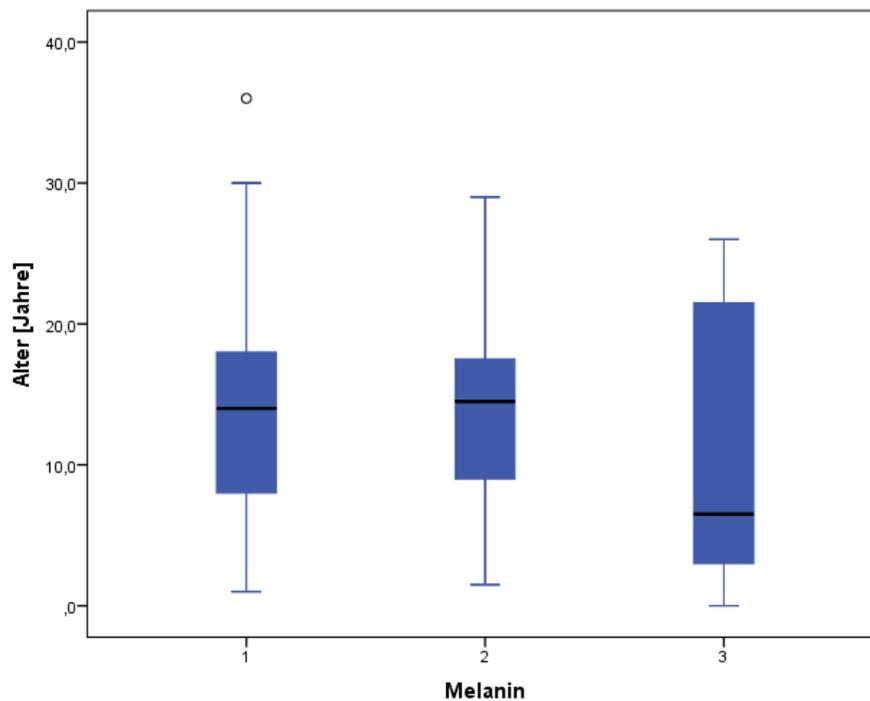
Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Vorkommen von hellem ockerfarbigem Pigment (Lipofuscin) und dem Alter der Pferde ( $r_k=0,401$ ,  $P<0,001$ ). Je älter die Pferde, desto mehr Lipofuscin befindet sich in den Pinealzellen der Epiphysen. Zwischen dem dunklen Pigment (Melanin/Hämosiderin) und dem Alter besteht keine signifikante Korrelation ( $r_k=-0,046$ ,  $P=0,541$ ) (Tabelle 19, Abbildung 18, Abbildung 19).

**Tabelle 19: Kendall-Tau-b Korrelation ( $r_k$ ) zwischen Alter und Pigment (Lipofuscin und Melanin), n=119**

		Lipofuscin	Melanin/ Hämosiderin
Alter	$r_k$	0,401	-0,046
	p	<0,001	0,541
n		63	119
	1 (geringgradig)	51	74
	2 (mittelgradig)	5	33
	3 (hochgradig)	0	12



**Abbildung 18: Korrelation von Alter und Lipofuscin (0: nicht enthalten, 1: geringgradig, 2: mittelgradig), n=119 ( $r_k=0,401$ ,  $P<0,001$ )**



**Abbildung 19: Korrelation von Alter und Melanin (1: geringgradig, 2: mittelgradig, 3: hochgradig), n=119 ( $r_k=-0,046$ ,  $P=0,541$ )**

#### 4.1.3 Verkalkung

Keine der 119 Epiphysen zeigten Verkalkungsstellen (Azervuli) bei der histologischen Untersuchung.

#### 4.1.4 Pinealitis

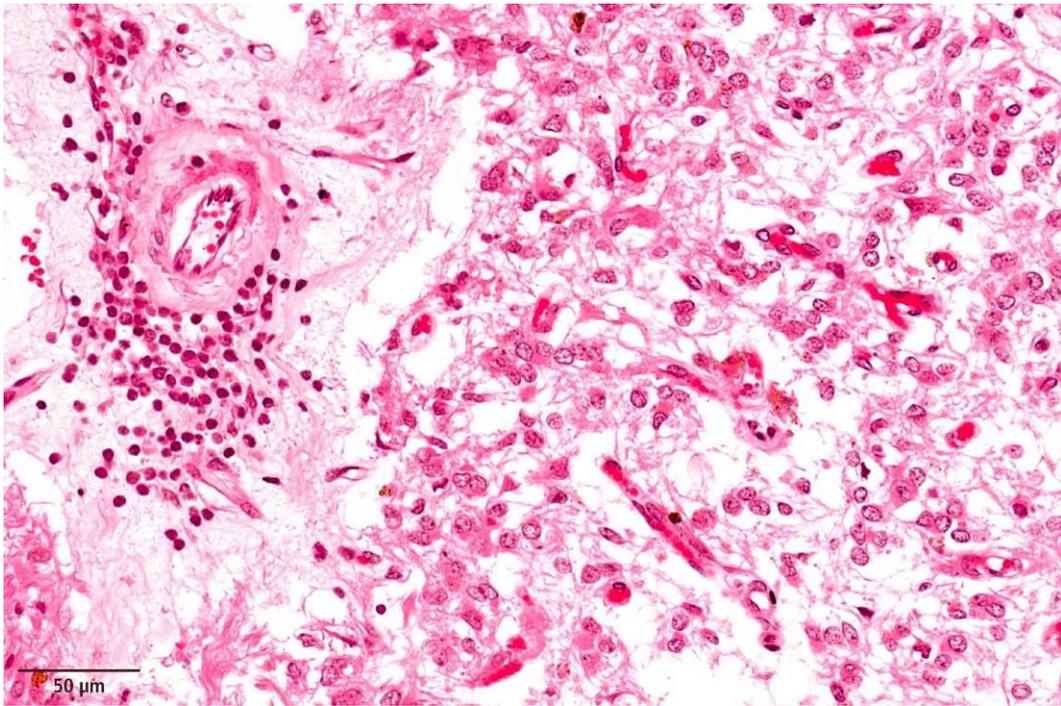
Die Epiphyse eines zweijährigen Haflingerwallachs zeigte eine hgr. Hyperämie und eine mgr. perivaskuläre lymphoplasmazelluläre Infiltration (S 80/10). Im Gehirn dieses Tieres wurden ischämisch/hypoxische Alterationen gesehen. Der Wallach starb an einer Herzinsuffizienz aufgrund einer komplexen Herzmissbildung. Die Epiphysen einer achtjährigen Appaloosa Stute (S 405/10) und eines vierjährigen Warmbluthengstes (S 1248/09) zeigten eine mgr. Hyperämie und hgr. perivaskuläre lymphoplasmazelluläre Infiltrate. Der Warmblut Hengst (S 1248/09) zeigte zudem eine eitrig-eitrige Pinealitis mit folgenden weiteren ZNS Befunden: hgr. diffuse, fibrinös-eitrig, teils nekrotisierende Meningoenzephalitis, Vaskulitis und Meningomyelitis. Bei weiterführenden bakteriologischen Untersuchungen konnten keine Erreger nachgewiesen werden. Die Appaloosa Stute (S 405/10) wurde BDV positiv getestet. Eine ggr. Hyperämie und eine ggr. bis mgr. perivaskulären lymphoplasmazelluläre Infiltration in

Epiphysen lag vier weiteren Tieren mit positiven BDV Nachweis (IHC) vor: eine sechsjährige Vollblut Stute (S 656/09), eine sechzehnjährige Pony Stute (S 785/09) (Abbildung 20, Abbildung 21), eine elfjährige Shetlandpony Stute (S 153/11) und ein 26jähriger Camargue Wallach (S 367/11). Insgesamt wurde bei fünf Pferden BDV nachgewiesen.

Bei einer Quarter Horse Stute mit einer Infektion mit equinem Herpesvirus (EHV-1) (785/10) lag eine pauzifokale Pinealitis mit mgr. perivaskulärer lymphoplasmazellulärer Infiltration sowie eine ggr. Hyperämie vor.



**Abbildung 20: Epiphyse, Pferd, S 785/09, perivaskuläres Ödem**



**Abbildung 21: Epiphyse, Pferd, S 785/09, 25x Vergrößerung, Pinealitis, perivaskuläres Ödem, perivaskuläre lymphoplasmazelluläre Infiltrate**

Das Auftreten von Hyperämie und perivaskulären lymphoplasmazellulären Infiltraten korrelierten miteinander ( $rk=0,790$ ,  $p<0,001$ ) (Tabelle 20).

Die Graduierung ggr. wurde gewählt, wenn einzelne Entzündungszellen in Kapillarnähe zu sehen waren, diese wurden als unspezifische reaktive Pinealitis bewertet.

Insgesamt zeigten 51 von 119 untersuchten Epiphysen eine Hyperämie. Eine perivaskulären lymphoplasmazelluläre Infiltration wurde bei 58 der 119 Epiphysen gefunden.

**Tabelle 20: Kendall-Tau-b Korrelation zwischen Hyperämie und der perivaskuläre lymphoplasmazelluläre Infiltration, n=119 ( $rk=0,790$ ,  $p<0,001$ )**

		perivaskulären lymphoplasmazelluläre Infiltration			
		ggr.	mgr.	hgr.	keine
Hyperämie	ggr.	31	8	0	3
	mgr.	5	0	2	0
	hgr.	1	1	0	0
	keine	6	0	0	62

#### 4.1.5 Zysten und Tumore

In keiner der 119 Pferdeepiphysen konnten Zysten oder Tumore gefunden werden.

### 4.2 Quantitativ-stereologische Untersuchung der Epiphyse

Mittels quantitativ-stereologischer Methoden wurden die Volumendichte der Pinealzellen in der Epiphyse ( $V_{V(\text{Pin}/\text{Epi})}$ ) und das Gesamtvolumen ( $V_{(\text{Pin}, \text{Epi})}$ ) der Pinealzellen berechnet (Tabelle 21, Anhang 11.7). Die gravimetrischen und volumetrischen Daten der Pinealzellen (Gesamtvolumen und Volumendichte) wurden im Hinblick auf Alter, Geschlecht, Saison, Körpergewicht und Zuordnung Großpferd/Pony analysiert. Zur besseren Verständlichkeit wurden alle Pferde, die nicht in die Kategorie Pony fallen, als Großpferde bezeichnet. Der Begriff Pferde inkludiert in dieser Arbeit Ponys und Großpferde.

**Tabelle 21: Epiphysenvolumen ( $V_{\text{Pin}}$ ), Volumendichte ( $V_{V(\text{Pin}/\text{Epi})}$ ) und Gesamtvolumen ( $V_{(\text{Pin}, \text{Epi})}$ ) der Pinealzellen in der Epiphyse, n=76**

	$V_{\text{Pin}}$	$V_{(\text{Pin}, \text{Epi})}$ [cm <sup>3</sup> ]	$V_{V(\text{Pin}/\text{Epi})}$ [%]
Mittelwert	168	0,11	67
Minimum	50	0,02	42
Maximum	400	0,26	86
Standardabweichung	68	0,04	8

#### 4.2.1 Körpergewicht, Epiphysengewicht und Epiphysenvolumen

Das Körpergewicht wurde bei den meisten Pferden von zwei bis drei unabhängigen Personen geschätzt (Präparator, Sekant, ggf. Schreibkraft). Bei den 76 stereologisch Untersuchten Pferden reichte das Gewicht von 100 kg (S 153/11) bis 800 kg (S 974/09, S 135/11). Bei zehn Pferden lagen die Werte einer tatsächlich gewogenen Gewichtsangabe vor (E 2857/08, E 558/09, S 604/09, S 642/09, S 714/09, S 1244/09, S 1283/09, S 140/10, S 913/10, S 251/11). Mit einer digitalen Waage wurde das Epiphysengewicht in mg bestimmt. Das relative Epiphysengewicht wurde in Bezug zum Körpergewicht berechnet und mit 1000 multipliziert.

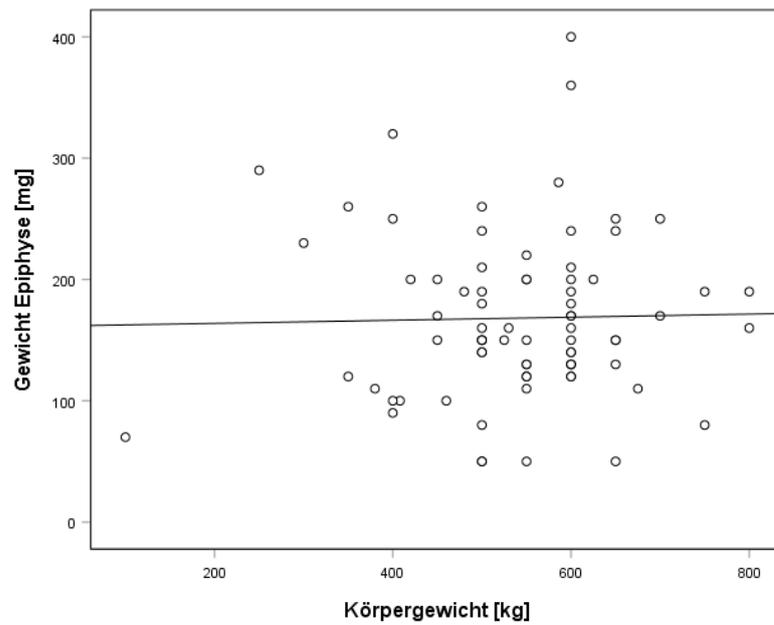
Mittelwert, Minimum und Maximum sowie die Standardabweichung von Körpergewicht, absoluten und relativen Epiphysengewicht sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

**Tabelle 22: Körpergewicht und Epiphysengewicht, n=76**

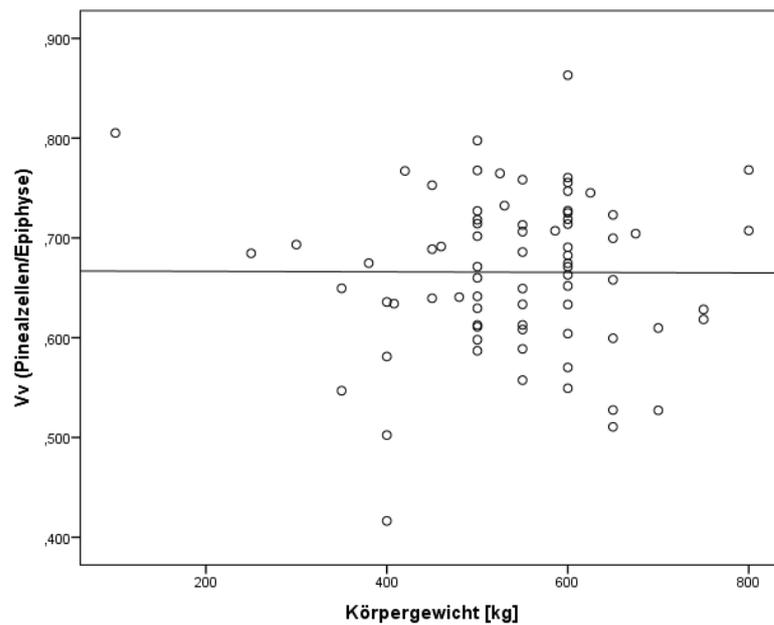
	Körpergewicht [kg]	Epiphysen- gewicht [mg]	Relatives Epiphysengewicht [%*1000]
Mittelwert	540	168	0,033
Minimum	100	50	0,008
Maximum	800	400	0,116
Standard- abweichung	117	68	0,018

#### 4.2.2 Korrelation der quantitativen Parameter mit dem Körpergewicht

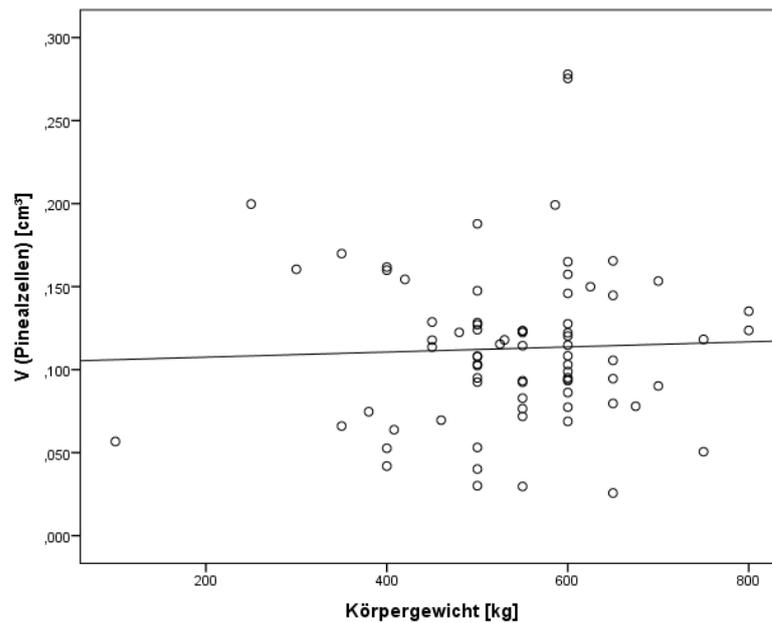
Weder das Epiphysengewicht, das Gesamtvolumen noch die Volumendichte der Pinealzellen in der Epiphyse wiesen eine signifikante Korrelation mit dem Körpergewicht auf (Abbildung 22, Abbildung 23, Abbildung 24).



**Abbildung 22: Korrelation zwischen Körpergewicht der Pferde und absolutem Epiphysengewicht.  $n=76$ , Alter=1-36 Jahre ( $r=0,022$ ,  $p=0,851$ ).**



**Abbildung 23: Korrelation zwischen Körpergewicht der Pferde und Volumendichte ( $V_V(\text{Pin}/\text{Epi})$ ) der Pinealzellen.  $n=76$ , Alter=1-36 Jahre ( $r=-0,004$ ,  $p=0,974$ ).**



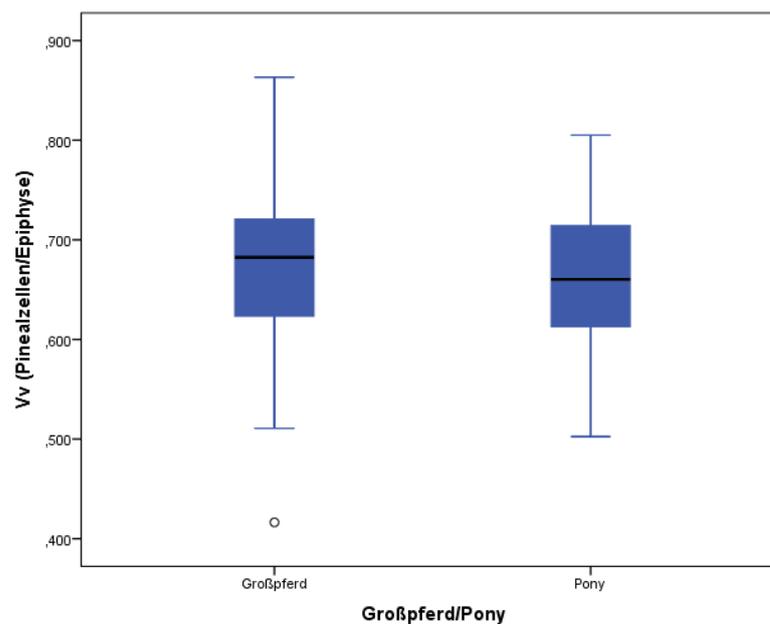
**Abbildung 24: Korrelation zwischen Körpergewicht der Pferde und Gesamtvolumen ( $V_{(Pin, Epi)}$ ) der Pinealzellen.  $n=76$ , Alter=1-36 Jahre ( $r=0,036$ ,  $p=0,744$ ).**

#### **4.2.3 Einfluss von Geschlecht und der Zuordnung Großferd/Pony auf Volumendichte und Gesamtvolumen der Pinealzellen in der Epiphyse**

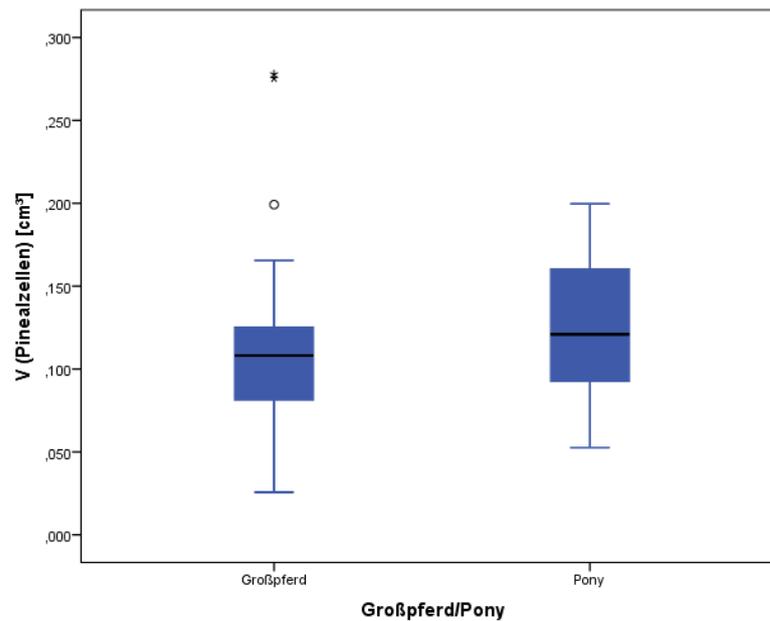
Volumendichte ( $V_{V(Pin/Epi)}$ ) und Gesamtvolumen ( $V_{(Pin, Epi)}$ ) der Pinealzellen von Großpferden und Ponys waren vergleichbar ( $V_{V(Pin/Epi)}$ :  $p=0,559$ ,  $V_{(Pin, Epi)}$ :  $p=0,404$ ). Darüber hinaus gab es keine Unterschiede zwischen Stuten und Wallachen ( $V_{V(Pin/Epi)}$ :  $p=0,420$ ,  $V_{(Pin, Epi)}$ :  $p=0,525$ ) (Abbildung 25, Abbildung 26, Abbildung 27, Abbildung 28, Tabelle 23, Tabelle 24).

**Tabelle 23: Mittelwert und Standardabweichung des Gesamtvolumens ( $V_{(Pin, Epi)}$ ) und der Volumendichte ( $Vv_{(Pin/Epi)}$ ) der Pinealzellen bei Großpferden und Ponys, n=73**

		n	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler MW
$Vv_{(Pin/Epi)}$	Großpferd	55	0,670	0,078	0,010
	Pony	18	0,657	0,075	0,018
$V_{(Pin, Epi)}$	Großpferd	55	0,111	0,049	0,007
	Pony	18	0,122	0,044	0,010



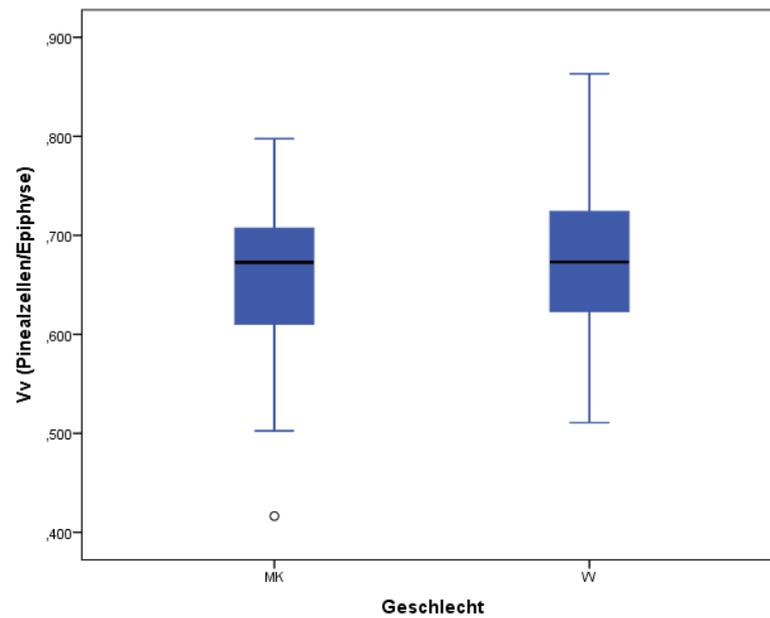
**Abbildung 25: Volumendichte ( $Vv_{(Pin/Epi)}$ ) der Pinealzellen in der Epiphyse von Groß- und Kleinpferden im Alter von 1-36 Jahren, Gesamtanzahl n=76, Großpferd=55, Pony=18, (p=0,559).**



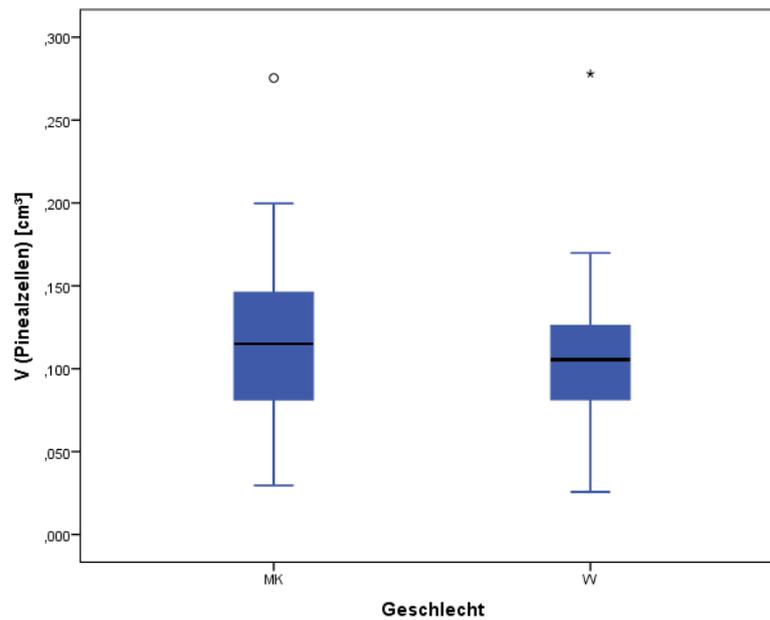
**Abbildung 26: Gesamtvolumen ( $V_{(Pin, Epi)}$ ) der Pinealzellen von Groß- und Kleinpferden im Alter von 1-36 Jahren,  $n=76$ , Großpferd=55, Pony=18, ( $p=0,404$ ).**

**Tabelle 24: Mittelwert und Standardabweichung des Gesamtvolumens ( $V_{(Pin, Epi)}$ ) und der Volumendichte ( $V_{V(Pin/Epi)}$ ) der Pinealzellen in der Epiphyse bei Wallachen und Stuten,  $n=76$**

		n	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler
$V_{V(Pin/Epi)}$	Wallache	44	0,659	0,081	0,012
	Stuten	32	0,674	0,076	0,013
$V_{(Pin, Epi)}$	Wallache	44	0,116	0,048	0,007
	Stuten	32	0,109	0,048	0,008



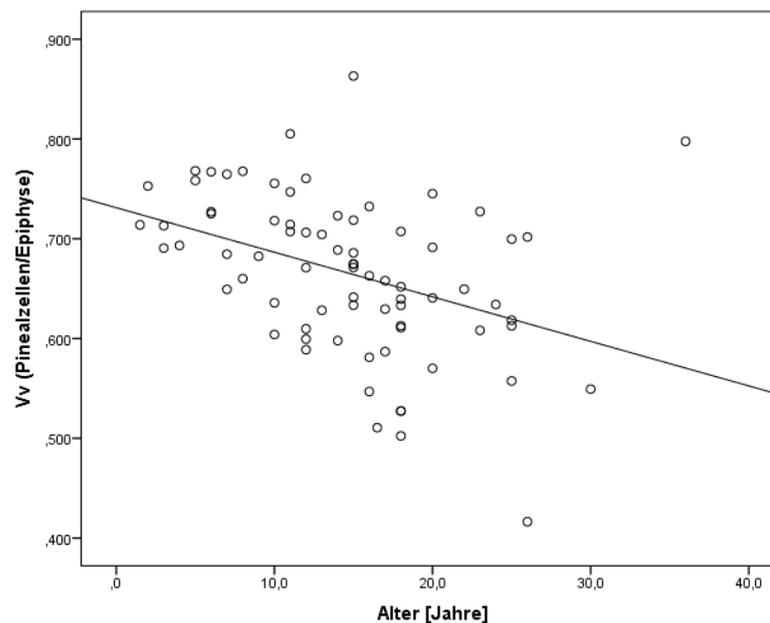
**Abbildung 27: Volumendichte  $V_V(\text{Pin}/\text{Epi})$  der Pinealzellen von Wallachen und Stuten im Alter von 1-36 Jahren,  $n=76$ , Wallache (Ortega et al.)=44, Stuten (W)=32**



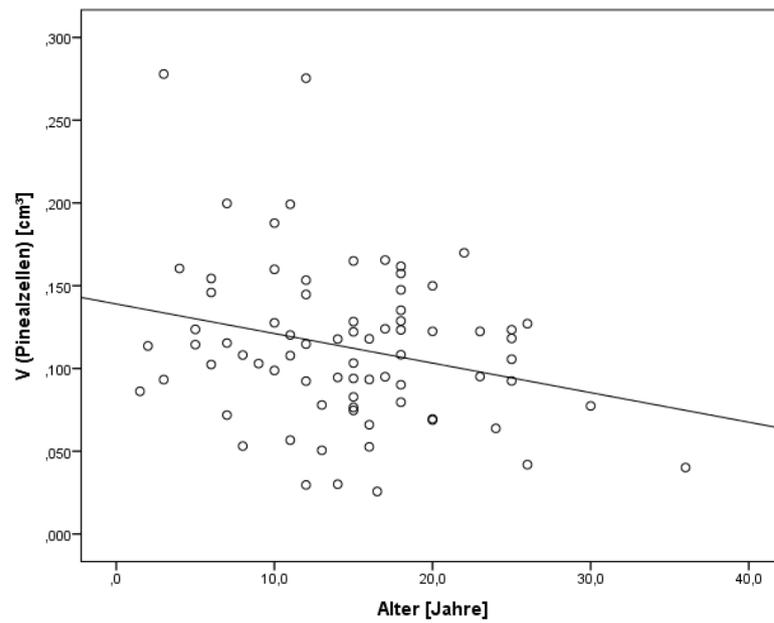
**Abbildung 28: Gesamtvolumen ( $V(\text{Pin}, \text{Epi})$ ) der Pinealzellen von Wallachen und Stuten im Alter von 1-36 Jahren,  $n=76$ , Wallache (Ortega et al.)=44, Stuten (W)=32 ( $p=0,525$ ).**

#### 4.2.4 Einfluss des Alters auf Volumendichte und Gesamtvolumen der Pinealzellen, Bindegewebe und Pigment in der Epiphyse

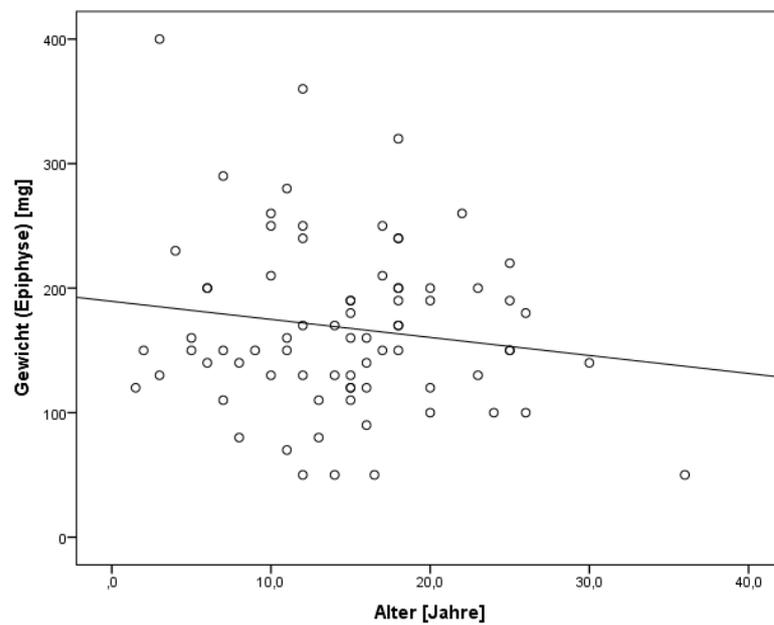
Das Alter korreliert signifikant negativ mit dem Gesamtvolumen ( $r=-0,257$ ,  $p=0,025$ ) der Pinealzellen und stark signifikant negativ mit deren Volumendichte der Pinealzellen in der Epiphyse ( $r=-0,388$ ,  $p=0,001$ ). Je jünger die Pferde, desto größer das Gesamtvolumen ( $r=-0,257$ ,  $p=0,025$ ) und die Volumendichte ( $r=-0,388$ ,  $p=0,001$ ) der Pinealzellen in der Epiphyse (Abbildung 29, Abbildung 30). Das Alter zeigt hingegen keinen signifikanten Einfluss auf das absolute ( $r=-0,145$ ,  $p=0,671$ ) und relative Gewicht ( $r=-0,184$ ,  $p=0,112$ ) bzw. das Volumen der Epiphyse (Abbildung 31, Abbildung 32). Je älter die Pferde waren, desto höher war der Anteil des Bindegewebes an der Epiphyse ( $V_{V(Bgw/Epi)}$ ;  $r=0,259$ ,  $p=0,024$ ) sowie des Pigments in der Epiphyse ( $V_{V(Pig/Epi)}$ ;  $r=0,272$ ,  $p=0,018$ ) in der Epiphyse (Abbildung 33, Abbildung 34). Zwischen dem Gesamtvolumen von Pigment und Bindegewebe in der Epiphyse bestand eine signifikante Korrelation ( $r=0,234$ ,  $p=0,042$ ).



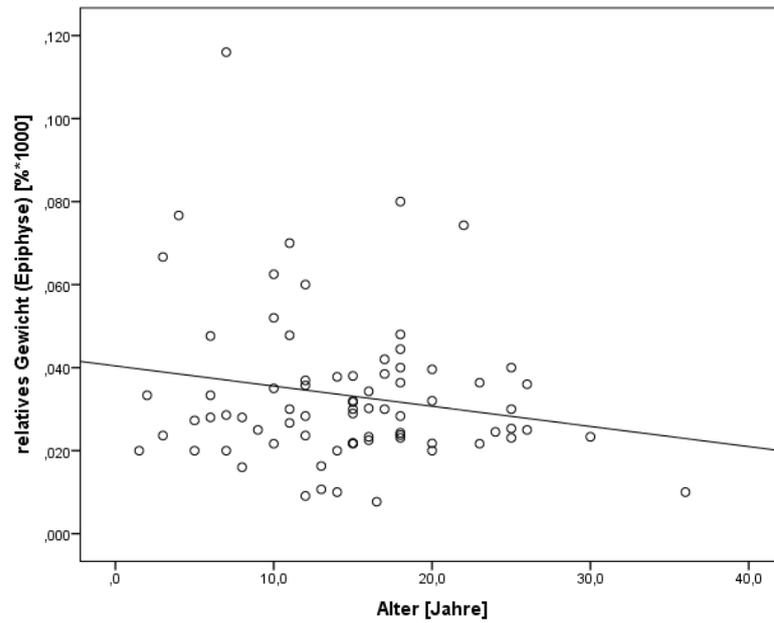
**Abbildung 29: Korrelation zwischen dem Alter der Pferde und Volumendichte ( $V_{V(Pin/Epi)}$ ) der Pinealzellen in der Epiphyse,  $n=76$ , Alter=1-36 Jahre ( $r=-0,388$ ,  $p=0,001$ ).**



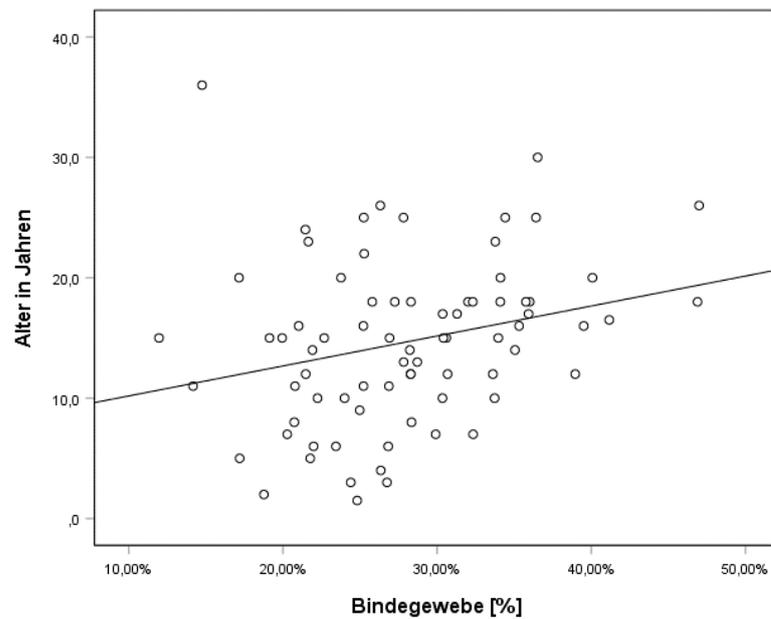
**Abbildung 30: Korrelation zwischen dem Alter der Pferde und Gesamtvolumen ( $V_{(Pin, Epi)}$ ) der Pinealzellen der Epiphyse,  $n=76$ , Alter=1-36 Jahre ( $r=-0,257$ ,  $p=0,025$ ).**



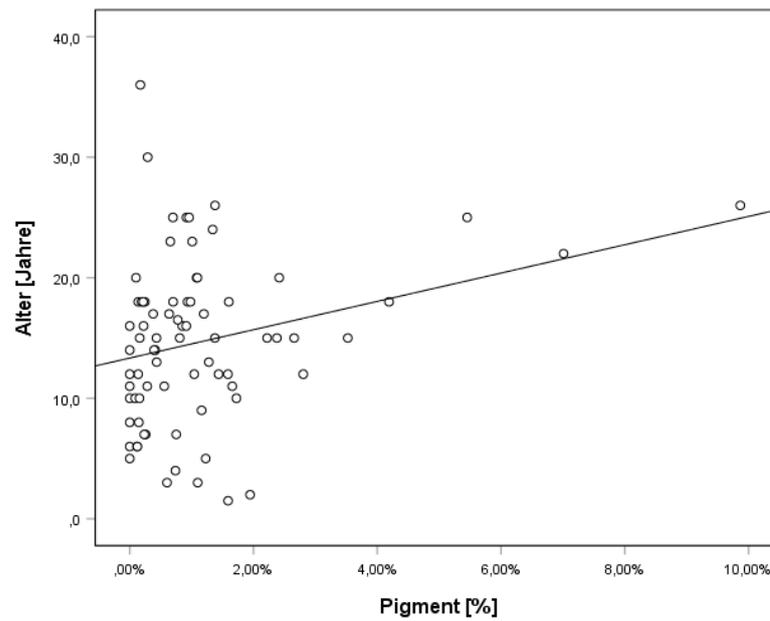
**Abbildung 31: Korrelation zwischen dem Alter der Pferde und dem absoluten Epiphysengewicht,  $n=76$ , Alter=1-36 Jahre ( $r=-0,145$ ,  $p=0,671$ ).**



**Abbildung 32: Korrelation zwischen dem Alter der Pferde und dem relativen Epiphysengewicht, n=76, Alter=1-36 Jahre ( $r=-0,184$ ,  $p=0,112$ ).**



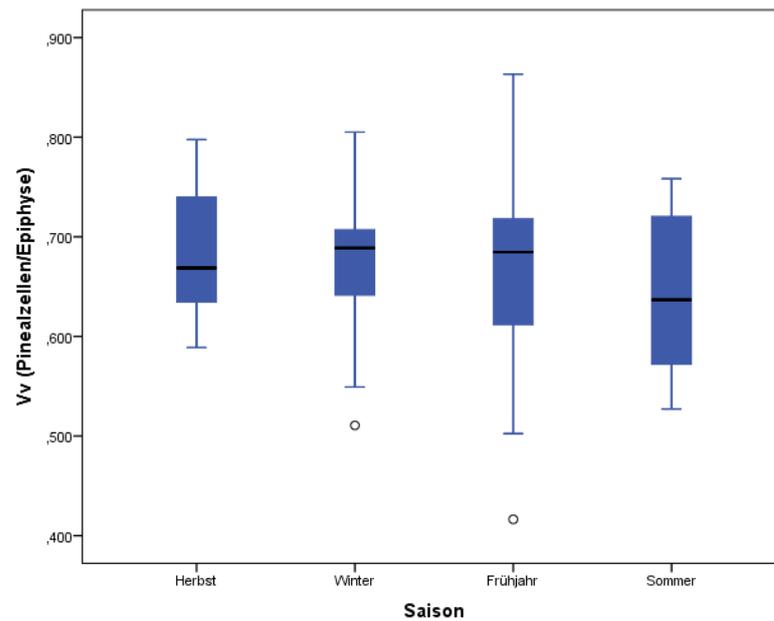
**Abbildung 33: Korrelation Alter zum Bindegewebsanteil in der Epiphyse ( $Vv(Bgw/Epi)$ ), n=76, Alter=1-36 Jahre ( $r=0,259$ ,  $p=0,024$ ).**



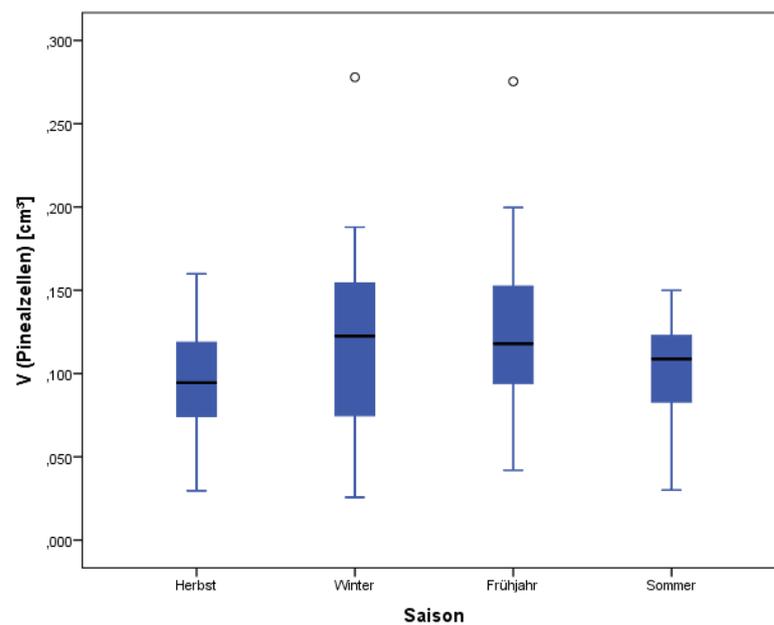
**Abbildung 34: Korrelation Alter zu Pigment in der Epiphyse ( $V_{V(\text{Pig}/\text{Epi})}$ ),  $n=76$ , Alter=1-36 Jahre ( $r=0,272$ ,  $p=0,018$ )**

#### **4.2.5 Einfluss der Saison auf Gesamtvolumen und Volumendichte der Pinealzellen in der Epiphyse**

Die einfache Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA) konnte keinen saisonalen Einfluss auf Epiphysengewicht, Gesamtvolumen und Volumendichte der Pinealzellen in der Epiphyse zeigen ( $V_{(\text{Pin}, \text{Epi})}$ :  $p=0,151$ ,  $V_{V(\text{Pin}/\text{Epi})}$ :  $p=0,450$ ) (Abbildung 35, Abbildung 36).



**Abbildung 35: Volumendichte ( $Vv_{(Pin/Epi)}$ ) der Pinealzellen in der Epiphyse zu den Saisonen,  $n=76$  (Herbst: 16, Winter: 21, Frühjahr: 23, Sommer: 16) ( $p=0,450$ ).**

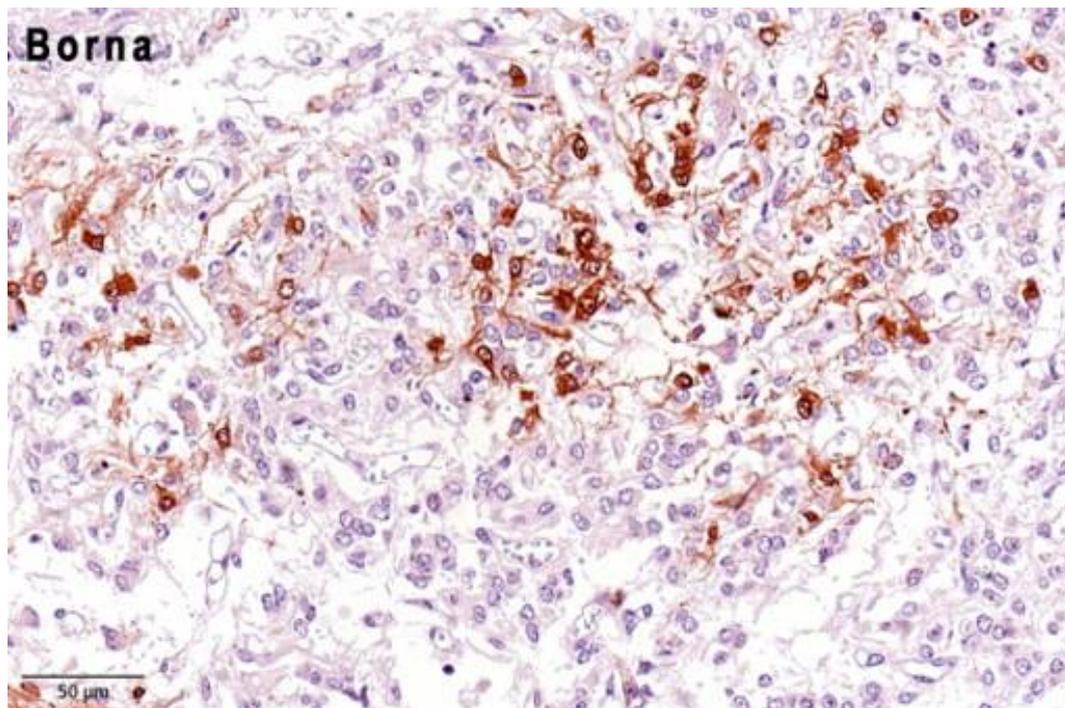


**Abbildung 36: Gesamtvolumen ( $V_{(Pin, Epi)}$ ) der Pinealzellen zu den Saisonen im Alter von 1-36 Jahren,  $n=76$  (Herbst: 16, Winter: 21, Frühjahr: 23, Sommer: 16), ( $p=0,151$ ).**

### 4.3 Immunhistochemie Borna

Durch die Anwesenheit des BDV Antigens in der Epiphyse kommt es zu einer Entzündungsreaktion unter Beteiligung von Lymphozyten, Plasmazellen und Histiozyten (Gosztonyi und Ludwig, 1995). Der Nachweis vom BDV Antigen in der Epiphyse in Verbindung mit einer entzündlichen, perivaskulären Infiltration wurde bei der Auswertung der Pferdeepiphysen am Institut für Tierpathologie der LMU München bestätigt.

Der immunhistochemische (IHC) Nachweis des Bornavirus in den Pinealozysten erfolgte bei fünf Pferden dieser Arbeit: eine sechsjährige Vollblut Stute (S 656/09), eine sechzehnjährige Pony Stute (S 785/09) (Abbildung 37), eine elfjährige Shetlandpony Stute (S 153/11) und ein sechundzwanzigjähriger Camargue Wallach (S 367/11).



**Abbildung 37: Epiphyse, Pferd, S 785/09, 25x Vergrößerung, IHC BDV, Gegenfärbung mit Hämalaun. Positiver Bornavirusantigen Nachweis (braun)**

## 5 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, das Spektrum möglicher pathohistologischer Veränderungen der Epiphyse von Pferden zu dokumentieren sowie Zusammenhänge zwischen Volumen der Epiphyse bzw. des Gesamtvolumens und der Volumendichte der Pinealzellen in der Epiphyse zu Alter, Geschlecht, Zuordnung Großferd/Pony und Saison zu untersuchen.

### 5.1 Histologische Untersuchung der Epiphyse

#### 5.1.1 Pigment

In der Epiphyse lassen sich drei Arten von Pigment unterscheiden: Lipofuscin, Melanin und Hämosiderin (Quay, 1974).

In der vorliegenden Untersuchung wurde eine Zunahme von ockerfarbenem Pigment in Pinealzellen älterer Pferde nachgewiesen ( $p < 0,001$ ), bei dem es sich am ehesten um das Alterspigment Lipofuszin handelt. Diese altersassoziierte Zunahme von lipofuszinhaltigen Zellen in der Epiphyse von Equiden wurde auch bei Cozzi und Ferrandi (1984) dokumentiert (Cozzi und Ferrandi, 1984).

Melaninhaltige Zellen in der Epiphyse waren bei den hier untersuchten Pferden in allen Altersstufen etwa gleichhäufig vertreten. Bei Bolat et al. (2018) wurde sowohl lichtmikroskopisch als auch elektronenmikroskopisch ebenfalls gezeigt, dass Melanin in allen untersuchten Altersstufen (0-13 Jahre) vorkommt (Bolat et al., 2018). Capucchio et al. (2010) konnten ebenfalls bei 60 untersuchten Pferden zwischen sieben und 23 Jahren keine altersassoziierten Zusammenhänge mit dem Auftreten melaninhaltiger Zellen nachweisen (Capucchio et al., 2010). Cozzi und Ferrandi (1984) dagegen berichten, dass melaninhaltige Zellen im Alter tendenziell seltener vorkommen (Cozzi und Ferrandi, 1984). Bei Menschen wird dagegen ein Anstieg der melaninhaltigen Zellen der Epiphyse mit dem Alter beschrieben (Koshy und Vettivel, 2001).

Die Verteilung der melaninhaltigen Zellen in der Epiphyse verändert sich mit dem Alter der Pferde. Während beim Fohlen die melaninhaltigen Zellen diffus über die ganze Epiphyse verteilt vorkommen, sind sie bei erwachsenen Pferden vor allem fokal im Bindegewebe und um Blutgefäße zu finden (Cozzi und Ferrandi, 1984; Bolat et al., 2018). In der vorliegenden Studie waren zu wenig Fohlen inkludiert,

daher kann keine eindeutige Aussage bezüglich der räumlichen Verteilung bei Pferden vs. Fohlen vorgenommen werden.

Hämosiderin ist in der HE-Färbung nicht sicher von Melanin zu unterscheiden, daher erfolgte exemplarisch der Eisennachweis mit Turnbull-Blau-Färbung. In der vorliegenden Arbeit war das Pigment Hämosiderin in allen untersuchten Schnitten nachweisbar, vor allem im Bindegewebe aber auch in Pinealzellen und in direkter Nachbarschaft zu Melanin. In der Literatur wird Hämosiderin in Zusammenhang mit Pinealiszysten beim Menschen beschrieben (Jouvet et al., 2015). In den Studien an Pferden wird es nicht erwähnt (Cozzi und Ferrandi, 1984; Bolat et al., 2018).

### **5.1.2 Kalzifizierung/Azervuli**

In den Pferdeepiphysen der vorliegenden Arbeit und anderen Untersuchungen wurden keine Verkalkungen gefunden (Cozzi und Ferrandi, 1984; Capucchio et al., 2010; Bolat et al., 2018).

Die in der Humanmedizin häufig beschriebene Kalzifizierung der Epiphyse tritt in jedem Alter auf (Wurtman et al., 1964; Ivanov, 2007). Ob es eine Korrelation zwischen Alter und Kalziumgehalt der Epiphyse gibt, wird in der Literatur diskutiert. Einige Autoren kommen zu dem Schluss, dass es bei den untersuchten menschlichen Epiphysen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Kalziumgehalt der Epiphyse und dem Alter gab (Wurtman et al., 1964; Khavinson und Linkova, 2012). Korkushko et al. (2006) fanden eine positive Korrelation zwischen dem Kalziumanteil der menschlichen Epiphyse und dem Alter und gleichzeitig eine negative Korrelation zwischen dem Kalziumgehalt und der nächtlichen Melatoninkonzentration (Korkushko et al., 2006). Zudem korrelierte der gesteigerte Kalziumgehalt mit der altersbedingten Aktivitätsabnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Khavinson und Golubev, 2002). Dieser Zusammenhang zwischen Kalziumgehalt und Aktivität der Epiphyse wurde hingegen in anderen Studien nicht bestätigt (Wurtman et al., 1964; Ivanov, 2007).

Die Verkalkung der Epiphyse scheint ein organisierter, regulierter Prozess zu sein und kein passives Alterungsphänomen. Die Einwanderung von Tryptase-haltigen Mastzellen, die biologisch aktive Substanzen freisetzen, verstärkt die Verkalkung in der Epiphyse beim Menschen (Maslinska et al., 2010; Tan et al., 2018).

In jüngster Zeit wurde der Zusammenhang zwischen der Abnahme des

Melatoningehaltes im Alter und der Zunahme des Kalziumgehalts in der Epiphyse mit neurodegenerativen Erkrankungen (Alzheimer, MS), Migräne, Schlafstörungen, Schlaganfällen und primären Gehirntumoren festgestellt (Sandyk und Kay, 1992; Kunz et al., 1998; Mahlberg et al., 2008; Kitkhuandee et al., 2014; Tuntapakul et al., 2016; Tan et al., 2018). Tuntapakul et al. (2016) zeigten den Zusammenhang zwischen primären Gehirntumoren und der Verkalkung der Epiphyse mit Hilfe von computertomographischen und histologischen Untersuchungen. Eine Verkalkung der Epiphyse war mit einem 2,8-fachen höheren Risiko für primäre Gehirntumoren verbunden (Tuntapakul et al., 2016). Mahlberg et al. (2008) zeigten, dass PatientInnen mit Alzheimer weniger unkalzifiziertes Epiphysengewebe aufweisen, als gesunde Personen und PatientInnen mit anderen Erkrankungen, wie Demenz oder Depressionen (Mahlberg et al., 2008). Zu den signifikanten Risikofaktoren die zu einem Schlaganfall führen können, zählen neben dem Alter (über 50 Jahre), Bluthochdruck, Diabetis, Fettleibigkeit auch die Verkalkung der Epiphyse (Odds Ratio von 1,35, 95% -Konfidenzintervall) (Kitkhuandee et al., 2014). Mit zunehmendem Grad der Verkalkung der Epiphyse und die daraus folgende Abnahme der Melatoninproduktion zeigten sich Störungen im Schlaf-Wach-Rhythmus und folglich Schlafstörungen sowie Tagesmüdigkeit (Kunz et al., 1998).

### 5.1.3 Pinealitis

Einige Epiphysen der hier untersuchten Pferdeepiphysen zeigten Entzündungszeichen (perivaskuläre lymphoplasmazelluläre Infiltration z. T. mit hyperämischen Bezirken). Wobei eine signifikante ( $p < 0,001$ ) Korrelation zwischen der Hyperämie und perivaskulären lymphoplasmazellulären Infiltraten vorlag.

Kleine Gruppen von Lymphozyten und Plasmazellen wurden auch in humanen Epiphysen gefunden, obwohl keine Erkrankung nachzuweisen war (Tapp und Huxley, 1972). Bei Pferden wurden lymphoplasmazellulären Infiltrationen der Epiphyse mit der Equinen rezidivierenden Uveitis (ERU) in Zusammenhang gebracht. In der Studie von Kalsowet et al. (1999) wurden die Epiphysen von zehn Pferden mit Uveitis und 13 ohne Uveitis untersucht. Neun der zehn Pferde mit Uveitis zeigten dabei T-Zellen in der Epiphyse, allerdings auch acht der 13 ohne Uveitis. B-Lymphozyten wurden dagegen nur bei einem Pferd

nachgewiesen. Dieses war zum Zeitpunkt der Euthanasie an einer akuten Uveitis erkrankt (Kalsow et al., 1999). Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass ein normaler Prozentsatz an Lymphozyten, in dieser Arbeit als ggr. unspezifische reaktive Pinealitis beschrieben, in der Epiphyse von einer pathologischen Veränderung zu differenzieren ist (Kalsow et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit zeigten fünf Pferde zwischen sechs und 26 Jahren mit der Diagnose Borna Enzephalitis auch eine Pinealitis (S 656/09, S 785/09, S 405/10, S 153/11, S 367/11). Dies ist meines Wissens nach die erste Beschreibung einer BDV-assoziierten Pinealitis beim Pferd. Der Zusammenhang zwischen BDV und Pinealitis bei Labortieren wurde bereits publiziert (Gosztonyi et al., 1993; Gosztonyi und Ludwig, 1995).

Darüber hinaus zeigte eine Quarter Horse Stute mit positivem Herpesvirus (EHV-1) Nachweis (S 785/10) und ein Warmblut Hengst mit einer hochgradigen diffusen, fibrinös-eitrigen, teils nekrotisierenden Meningoenzephalitis, Vaskulitis und Meningomyelitis (S 1248/09) perivaskuläre lymphoplasmazelluläre Infiltrate in der Epiphyse.

#### **5.1.4 Zysten und Tumore**

In der vorliegenden Arbeit und bei den Untersuchungen anderer Autoren an Pferdeepiphysen wurden bislang keine Tumore oder Zysten beschrieben (Cozzi und Ferrandi, 1984; Bolat et al., 2018). Im Buch Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals (Pathologie der Haustiere) wird beschrieben, dass Pinealtumore bei Haustieren sehr selten sind. Pineozytome und Pineoblastome wurden bei Pferden, Hunden und Rindern beschrieben, wobei die Zuordnung zur Epiphyse nicht histologisch, sondern makroskopisch, topografisch erfolgte. Dadurch könnten die Tumore auch von anderen Gehirnregionen ausgegangen sein (Rosol und Gröne, 2015). Holshuh und Howard (1982) veröffentlichten einen Fall, in dem ein Pinealoblastom bei einem Quarter Horse Hengst anhand der anatomischen Lage diagnostiziert wurde (Holshuh und Howard, 1982).

Die Angaben über die Häufigkeit von Zysten in der menschlichen Epiphyse schwankt zwischen 25 % und 40 % (Tapp und Huxley, 1972; Hasegawa et al., 1987). Neoplasien der Epiphyse machen unter 1 % der Gehirntumore bei Erwachsenen und 3-8 % bei Kindern aus. Germinome treten mit einem Anteil von 50 % am häufigsten in der Epiphysenregion auf (Solomou, 2017). Die Tumore der

Pinealparenchymzellen (PPT) machen beim Menschen 30 % der Epiphysentumore aus. Diese 30 % unterteilen sich wie folgt, 15-20 % PC's, PPTID's 20-60 % und PB's 30-40 % (Jouvet et al., 2015).

## 5.2 Quantitativ-stereologische Untersuchung der Epiphyse

Für die quantitativ-stereologischen Untersuchungen standen Epiphysen von 76 Pferden zur Verfügung. Anhand der erhobenen Daten konnte gezeigt werden, dass mit dem Alter der Pferde das Gesamtvolumen ( $p=0,025$ ) und die Volumendichte ( $p=0,001$ ) der Pinealzellen signifikant abnehmen. Untersuchungen an der menschlichen Epiphyse ergaben, dass die Zahl der Pinealzellen sowie das Volumen und die Größe der Nuclei der Pinealzellen in der Epiphyse mit dem Alter abnimmt (Petrov, 1984; Gusek und Meier, 1988; Korkushko et al., 2006).

Die vorliegende Arbeit ergab, dass der Bindegewebsanteil in den untersuchten Pferdeepiphysen mit dem Alter zunimmt ( $p=0,024$ ). Dies deckt sich mit Befunden von Cozzi und Ferrandi (1984) (Cozzi und Ferrandi, 1984). Bolat et al. (2018) hingegen kamen zu dem Schluss, dass sich der prozentuale Anteil von Pinealzellen und Volumen des Bindegewebes bei Fohlen zu adulten Pferden nicht unterscheidet, wobei das älteste Pferd dieser Studie nur 13 Jahre alt war (Bolat et al., 2018). In Studien der menschlichen Epiphyse wurde, wie bei den Pferden in dieser Arbeit, ein höherer Bindegewebsanteil mit zunehmenden Alter nachgewiesen (Khavinson und Linkova, 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde kein Zusammenhang zwischen dem Gesamtvolumen bzw. der Volumendichte der Pinealzellen und dem Geschlecht (Wallach, Stute) nachgewiesen. Des Weiteren gab es keinen Zusammenhang zwischen dem Gesamtvolumen bzw. der Volumendichte der Pinealzellen zum Körpergewicht und zur Zuordnung Großpferd/Pony. In früheren Studien wurde bereits beschrieben, dass altersabhängige morphologische Veränderungen an Epiphysen von Hunden (J. Calvo et al., 1990), Katzen (Boya et al., 1995), Menschen (Khavinson und Linkova, 2012) und Pferden (Cozzi und Ferrandi, 1984; Bolat et al., 2018) nicht genderspezifisch sind.

Obwohl Pferde einer saisonalen Fortpflanzung unterliegen, die funktionell stark von der Epiphyse abhängig ist (Grubaugh et al., 1982), konnte in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Zusammenhang zwischen Saison und dem

Gesamtvolumen bzw. der Volumendichte der Pinealzellen aufgezeigt werden.

In dieser Arbeit korrelierten weder das absolute noch das relative Epiphysengewicht signifikant mit dem Alter. Für das absolute Epiphysengewicht besteht auch keine signifikante Korrelation zum Körpergewicht. Dies entspricht den Befunden mehrerer Studien beim Menschen, bei denen keine signifikante Korrelation zwischen Epiphysengewicht und Alter festgestellt wurde (Tapp und Huxley, 1972; Hasegawa et al., 1987; Khavinson und Linkova, 2012). Bolat et al. (2018) dagegen wiesen ein höheres Epiphysengewicht bei adulten Pferden verglichen mit Fohlen nach (Bolat et al., 2018). Andere Autoren beschrieben beim Menschen eine Gewichtszunahme der Epiphyse mit dem Alter, dies wird durch eine Zunahme an Bindegewebe und Zysten im Epiphysenparenchym erklärt (Khavinson und Linkova, 2012).

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es die pathohistologischen Veränderungen der Epiphyse bei Pferden unterschiedlicher Lebensaltersstufen aufzuzeigen sowie quantitativ-stereologische Analysen durchzuführen, um die Einflüsse von Alter, Geschlecht, Zuordnung Großpferd/Pony und Saison auf das Volumen der Epiphyse, die Volumendichte und das Gesamtvolumen der Pinealzellen in der Epiphyse zu untersuchen. Alle untersuchten Pferdeepiphysen (119) wurden zwischen 2008 und 2012 aus dem Sektionsgut des Instituts für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München entnommen, entlang der Mittellinie halbiert und je eine Hälfte in Paraffin und Kunststoff eingebettet. Für die mikroskopischen Untersuchungen kamen neben der HE- und Giemsa-Färbung bei Bedarf und exemplarisch weitere Spezialfärbungen hinzu (Turnbull-Blau, PAS-Reaktion, Bleichung, Immunhistochemische Färbungen für Bornavirusantigen).

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung ergaben ein kleines Spektrum an pathologischen Veränderungen. Am häufigsten waren perivaskuläre lymphoplasmazelluläre Infiltrate (49%) zu erheben, die mit dem Vorhandensein einer Hyperämie positiv korrelierten ( $r=0,836$ ,  $p<0,001$ ). Die Ätiologie dieser Entzündungsreaktion blieb in den meisten Fällen fraglich und könnte eine unspezifisch-reaktive Entzündung darstellen. Bei fünf Pferden standen die entzündlichen Infiltrate mit einer Borna Disease Virus (BDV) Infektion im Zusammenhang und in allen Fällen wurde das Virus immunhistochemisch nachgewiesen. Bei einem Tier lag eine eitrige Pinealitis vor, vermutlich als Folge eines Übergreifens einer hochgradigen, diffusen, fibrinös-eitrigen, teils nekrotisierenden Meningoenzephalitis, Meningomyelitis und Vaskulitis auf die Epiphyse. Erreger konnten nicht nachgewiesen werden. Bei einer Quarter Horse Stute mit einer Infektion mit equinem Herpesvirus (EHV-1) lag eine pauzifokale Pinealitis mit mittelgradiger perivaskulärer lymphoplasmazellulärer Infiltration sowie eine geringgradige Hyperämie vor. Ein Zusammenhang mit der EHV-1 Infektion scheint wahrscheinlich, wurde jedoch nicht virologisch/immunhistochemisch abgeklärt.

Bei semiquantitativen histologischen Untersuchungen wurde zwischen hellem, ockerfarbigem Pigment (am ehesten Lipofuscin) und dunklem, bräunlichem

Pigment (Melanin/Hämosiderin) unterschieden. Dabei zeigte sich eine positive Korrelation zwischen dem Vorkommen von Lipofuscin und dem Alter der Pferde ( $r=0,489$ ,  $p<0,001$ ). Zwischen dem Vorkommen von Melanin und Hämosiderin in den Pinealzellen und Histozyten bestand keine signifikante altersabhängige Veränderung ( $r=-0,055$ ,  $p=0,552$ ).

Andere in der Humanmedizin häufig beschriebene Veränderungen wie Verkalkungen (Azervuli/Hirnsand), Zysten und Tumore in der Epiphyse konnten in keiner Pferdeepiphyse gefunden werden

Das Epiphysengewicht war unabhängig vom Körpergewicht der Pferde und weder das absolute noch das relative Epiphysengewicht veränderte sich mit dem Alter.

Mittels quantitativ-stereologischer Untersuchung der Epiphyse von 76 Pferden wurde gezeigt, dass mit dem Alter der Pferde das Gesamtvolumen ( $p=0,025$ ) und die Volumendichte ( $p=0,001$ ) der Pinealzellen in der Epiphyse signifikant abnimmt, wohingegen der Volumenanteil von Bindegewebe in der Epiphyse mit dem Alter zunimmt ( $p=0,024$ ). Zwischen dem Gesamtvolumen bzw. der Volumendichte der Pinealzellen in der Epiphyse und Geschlecht (Wallach, Stute), Körpergewicht, Saison und Zuordnung Großpferd/Pony war kein Zusammenhang erkennbar.

Die vorliegende Studie zeigt zum ersten Mal die Mitbeteiligung der Epiphyse bei Bornavirusenzephalitis des Pferdes. Darüber hinaus konnte eine altersabhängige Zunahme von Lipofuscin in der Epiphyse sowie die altersabhängige Zunahme der Volumendichte des Bindegewebes und Abnahme der Volumendichte und des Gesamtvolumens der Pinealzellen gezeigt werden.

## 7 SUMMARY

The aim of this study was to characterize changes of the pineal gland of horses of different age groups, using histological, semiquantitative and quantitative stereological analyses. Age-, gender-, race- and seasonal influences of the pineal gland volume and volume densities and total volumes of pineal cells, fibrous connective tissue and pigment deposits in the pineal gland were analysed.

All pineal glands (119) were collected at necropsy in the Institute of Veterinary Pathology of the Ludwig-Maximilians-University Munich, cut in halves along the longitudinal axis and one half was embedded in paraffin and the other in raisin. All sections were routinely stained with HE and Giemsa as well as exemplary for iron and bleaching of melanin. In horses with clinical symptoms of Borna disease and with Borna disease encephalitis, Borna virus antigen was also detected in the pineal glands of these animals, using immunohistochemistry with antibodies against Borna disease virus (BDV).

Qualitative histological analyses revealed a tight spectrum of pathological alterations, such as mainly perivascular infiltration with lymphocytes and plasma cells, which correlated with the degree of hyperaemia ( $r=0.836$ ;  $p=0.001$ ). In most cases, the aetiology of the inflammatory cell infiltration remained largely unknown and may be non-specific in nature. In five horses, Borna virus antigen was demonstrated by immunohistochemistry and the infection with BDV was therefore thought to be causative for the inflammatory reaction. One horse with Equine herpes virus – 1 Infection showed inflammatory infiltrates in the pineal gland, however, the virus was not determined in the pineal gland by virology or immunohistochemistry. One animal showed suppurative pinealitis which was thought to result from a massive, diffuse, fibrinous to suppurative meningoencephalitis, -myelitis and vasculitis.

Using semiquantitative analyses, pigment deposition (lipofuscin, melanin and hemosiderin) was quantified. The yellow-ochre most likely lipofuscin deposits increased in an age-related manner in cells of the pineal gland ( $r=0.489$ ;  $p<0.001$ ). Melanin and hemosiderin were not differentiated from one another and there was no age-related change in the frequencies of these dark-brown pigments in pineal gland cells or histiocytes.

Other changes of the pineal gland, that are well known in humans, were not observed in the horses of this study (calcification, cysts, tumours).

The pineal weight was independent of body weight and neither absolute nor relative pineal gland to body weight ratio changed with age.

Using quantitative stereological analyses, pineal glands of 76 horses were analysed, showing that the total volume ( $p=0.025$ ) and the volume density of pineal cells in the pineal gland ( $p=0.001$ ) drops with age whereas the volume fraction of fibrous connective tissue increased with age in the pineal gland ( $p=0.024$ ). Total volumes and volume fractions of pineal gland cells in the pineal gland were independent of gender, body weight, season and race.

The present study shows for the first time the presence of Borna virus antigen in the pineal gland of horses that showed Borna disease encephalitis. Furthermore, the study shows an age-related increase of lipofuscin in the pineal gland and the increase of the volume fraction of fibrous connective tissue and decrease of the volume fraction of pineal gland cells with age.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

Acuna-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Diaz-Casado, M. E., Lima-Cabello, E., Lopez, L. C., Rosales-Corral, S., Tan, D. X., Reiter, R. J. (2014): Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci* 71, 16, 2997-3025.

Amaral, F. G. D., Cipolla-Neto, J. (2018): A brief review about melatonin, a pineal hormone. *Arch Endocrinol Metab* 62, 4, 472-479.

Arendt, J., Middleton, B. (2018): Human seasonal and circadian studies in Antarctica (Halley, 75 degrees S). *Gen Comp Endocrinol* 258, 250-258.

Behar, S., Halabi, M., Reicher-Reiss, H., Zion, M., Kaplinsky, E., Mandelzweig, L., Goldbourt, U. (1993): Circadian variation and possible external triggers of onset of myocardial infarction. SPRINT Study Group. *Am J Med* 94, 4, 395-400.

Bell, D. M., Porras, G., Tortoledo, M. E., Luna, M. A. (2009): Primary sinonasal choriocarcinoma. *Ann Diagn Pathol* 13, 2, 96-100.

Bolat, A., Kürüm, D., Bahar, S., Karahan, S. (2018): Histomorphometric examination of the pineal gland in foals and adult horses. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 65, 2, 205-212.

Boya, J., Calvo, J. L., Rancano, D. (1995): Structure of the pineal gland in the adult cat. *J Pineal Res* 18, 2, 112-118.

Byeon, Y., Back, K. (2016): Low melatonin production by suppression of either serotonin N-acetyltransferase or N-acetylserotonin methyltransferase in rice causes seedling growth retardation with yield penalty, abiotic stress susceptibility, and enhanced coleoptile growth under anoxic conditions. *J Pineal Res* 60, 3, 348-359.

Cagnacci, A. (1996): Melatonin in relation to physiology in adult humans. *Journal of Pineal Research* 21, 4, 200-213.

Calvo, J., Boya, J., Garcia-Maurino, A., Lopez Carbonell, A. (1990): Postnatal development of the dog pineal gland. Light microscopy. *Histol Histopathol* 5, 1, 31-36.

Calvo, J. L., Boya, J., Garcia-Maurino, J. E., Rancano, D. (1992): Presence of melanin in the cat pineal gland. *Acta Anat (Basel)* 145, 1, 73-78.

Capucchio, M. T., Marquez, M., Pregel, P., Foradada, L., Bravo, M., Mattutino, G., Torre, C., Schiffer, D., Catalano, D., Valenza, F., Guarda, F., Pumarola, M. (2010): Parenchymal and vascular lesions in ageing equine brains: histological and immunohistochemical studies. *J Comp Pathol* 142, 1, 61-73.

Carlomagno, G., Minini, M., Tilotta, M., Unfer, V. (2018): From Implantation to Birth: Insight into Molecular Melatonin Functions. *Int J Mol Sci* 19, 9.

Caroleo, M. C., Frasca, D., Nistico, G., Doria, G. (1992): Melatonin as immunomodulator in immunodeficient mice. *Immunopharmacology* 23, 2, 81-89.

Chuang, J. I., Chen, S. S., Lin, M. T. (1993): Melatonin decreases brain serotonin release, arterial pressure and heart rate in rats. *Pharmacology* 47, 2, 91-97.

Coca, S., Vaquero, J., Escandon, J., Moreno, M., Peralba, J., Rodriguez, J. (1992): Immunohistochemical characterization of pineocytomas. *Clin Neuropathol* 11, 6, 298-303.

Cozzi, B., Ferrandi, B. (1984): The pineal gland of the horse. Morphological and histochemical results. (With notes on the donkey and mule pineal). *Basic Appl Histochem* 28, 1, 81-90.

Dollins, A. B., Lynch, H. J., Wurtman, R. J., Deng, M. H., Kischka, K. U.,

Gleason, R. E., Lieberman, H. R. (1993): Effect of pharmacological daytime doses of melatonin on human mood and performance. *Psychopharmacology (Berl)* 112, 4, 490-496.

Dopico, X. C., Evangelou, M., Ferreira, R. C., Guo, H., Pekalski, M. L., Smyth, D. J., Cooper, N., Burren, O. S., Fulford, A. J., Hennig, B. J., Prentice, A. M., Ziegler, A. G., Bonifacio, E., Wallace, C., Todd, J. A. (2015): Widespread seasonal gene expression reveals annual differences in human immunity and physiology. *Nat Commun* 6, 7000.

Fauchon, F., Jouvret, A., Paquis, P., Saint-Pierre, G., Mottolese, C., Ben Hassel, M., Chauveinc, L., Sichez, J. P., Philippon, J., Schlienger, M., Bouffet, E. (2000): Parenchymal pineal tumors: a clinicopathological study of 76 cases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 46, 4, 959-968.

Feuer, G. M., Kerényi, N. A. (1989): Role of the pineal gland in the development of malignant melanoma. *Neurochem Int* 14, 3, 265-273.

Fevre-Montange, M., Szathmari, A., Champier, J., Mokhtari, K., Chretien, F., Coulon, A., Figarella-Branger, D., Polivka, M., Varlet, P., Uro-Coste, E., Fauchon, F., Jouvret, A. (2008): Pineocytoma and pineal parenchymal tumors of intermediate differentiation presenting cytologic pleomorphism: a multicenter study. *Brain Pathol* 18, 3, 354-359.

Gallerani, M., Manfredini, R., Ricci, L., Cocurullo, A., Goldoni, C., Bigoni, M., Fersini, C. (1993): Chronobiological aspects of acute cerebrovascular diseases. *Acta Neurologica Scandinavica* 87, 6, 482-487.

Galliani, I., Frank, F., Gobbi, P., Giangaspero, F., Falcieri, E. (1989): Histochemical and ultrastructural study of the human pineal gland in the course of aging. *J Submicrosc Cytol Pathol* 21, 3, 571-578.

Garcia-Maurino, S., Gonzalez-Haba, M. G., Calvo, J. R., Goberna, R., Guerrero, J. M. (1998): Involvement of nuclear binding sites for melatonin in the regulation

of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells. *J Neuroimmunol* 92, 1-2, 76-84.

Garcia, T., Ribes, D., Colomina, M. T., Cabre, M., Domingo, J. L., Gomez, M. (2009): Evaluation of the protective role of melatonin on the behavioral effects of aluminum in a mouse model of Alzheimer's disease. *Toxicology* 265, 1-2, 49-55.

Gehrman, P. R., Connor, D. J., Martin, J. L., Shochat, T., Corey-Bloom, J., Ancoli-Israel, S. (2009): Melatonin fails to improve sleep or agitation in double-blind randomized placebo-controlled trial of institutionalized patients with Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry* 17, 2, 166-169.

Gerber, V., Zanoni, R., Straub, R. (2016): Virusinfektionen In V. Gerber & R. Straub (Hrsg.): *Pferdekrankheiten: Innere Medizin*. 2. Aufl. (510-511). Bern. UTB GmbH.

Goldman, H., Wurtman, R. J. (1964): Flow of blood to the pineal body of the rat. *Nature* 203, 87-88.

Gosztonyi, G., Dietzschold, B., Kao, M., Rupprecht, C. E., Ludwig, H., Koprowski, H. (1993): Rabies and borna disease. A comparative pathogenetic study of two neurovirulent agents. *Lab Invest* 68, 3, 285-295.

Gosztonyi, G., Ludwig, H. (1995): Borna disease--neuropathology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 190, 39-73.

Grondahl, M. L., Yding Andersen, C., Bogstad, J., Nielsen, F. C., Meinertz, H., Borup, R. (2010): Gene expression profiles of single human mature oocytes in relation to age. *Hum Reprod* 25, 4, 957-968.

Grosshans, M., Vollmert, C., Vollstaedt-Klein, S., Nolte, I., Schwarz, E., Wagner, X., Leweke, M., Mutschler, J., Kiefer, F., Bumb, J. M. (2016): The association of pineal gland volume and body mass in obese and normal weight individuals: a

pilot study. *Psychiatr Danub* 28, 3, 220-224.

Grubaugh, W., Sharp, D. C., Berglund, L. A., Mcdowell, K. J., Kilmer, D. M., Peck, L. S., Seamans, K. W. (1982): Effects of pinealectomy in Pony mares. *J Reprod Fertil Suppl* 32, 293-295.

Gusek, W. (1981): Epiphyse. In E. Altenähr, W. Böcker, G. Dhom, W. Gusek, P. U. Heitz, G. Klöppel, H. Lietz, H. Mitschke, W. Saeger, H.-J. Schäfer, J.-J. Staub & H. Steiner (Hrsg.): *Pathologie der endokrinen Organe. Spezielle pathologische Anatomie Band 14/I*. 1. Aufl. (227-293). Berlin. Springer.

Gusek, W., Meier, D. (1988): Size of the cell nucleus and nucleus-cytoplasm relations in pinealocytes in humans of middle and advanced age. *Z Gerontol* 21, 2, 79-82.

Hasegawa, A., Ohtsubo, K., Mori, W. (1987): Pineal gland in old age; quantitative and qualitative morphological study of 168 human autopsy cases. *Brain Res* 409, 2, 343-349.

Herden, C., Herzog, S., Wehner, T., Zink, C., Richt, J., Frese, K. (1999): Comparison of different methods of diagnosing Borna disease in horses post mortem. *Equine Infectious Diseases* 9, 286-290.

Hermanns, W., Liebig, K., Schulz, L.-C. (1981): Postembedding immunohistochemical demonstration of antigen in experimental polyarthritits using plastic embedded whole joints. *Histochemistry* 73, 3, 439-446.

Hirano, A. (1983): Neuropathologie auf zellläarer Ebene In A. Hirano & H. P. Schmitt (Hrsg.): *Praktischer Leitfaden der Neuropathologie*. 1. Aufl. (145-148). Berlin Heidelberg. Springer.

Holshuh, H. J., Howard, E. B. (1982): Pineoblastoma, a primitive neuroectodermal tumor in the brain of a horse. *Vet Pathol* 19, 5, 567-569.

Ivanov, S. V. (2007): [Age-dependent morphology of human pineal gland: supravital study]. *Adv Gerontol* 20, 2, 60-65.

Jouvet, A., Saint-Pierre, G., Fauchon, F., Privat, K., Bouffet, E., Ruchoux, M. M., Chauveinc, L., Fevre-Montange, M. (2000): Pineal parenchymal tumors: a correlation of histological features with prognosis in 66 cases. *Brain Pathol* 10, 1, 49-60.

Jouvet, A., Vasiljevic, A., Champier, J., Fevre Montange, M. (2015): Pineal parenchymal tumours and pineal cysts. *Neurochirurgie* 61, 2-3, 123-129.

Junqueira, L. C. U., Carneiro, J., Gratzl, M., Mayerhofer, A., Wurziger, L. J. (2013): *Endokrine Organe Histologie*, 4. Aufl. (389-391). Berlin Heidelberg. Springer

Kalsow, C. M., Dubielzig, R. R., Dwyer, A. E. (1999): Immunopathology of pineal glands from horses with uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 7, 1611-1615.

Kalsow, C. M., Dwyer, A. E., Smith, A. W., Nifong, T. P. (1993): Pinealitis accompanying equine recurrent uveitis. *Br J Ophthalmol* 77, 1, 46-48.

Karasek, M., Pawlikowski, M. (1999): Antiproliferative effects of melatonin and CGP 52608. *Biol Signals Recept* 8, 1-2, 75-78.

Kempf, W., Hantschke, M., Kutzner, H., Burgdorf, W. H. C. (2015): *Histologische Techniken*. In W. Kempf, M. Hantschke, H. Kutzner & W. H. C. Burgdorf (Hrsg.): *In Dermatopathologie - Histopathologische Techniken*. 3. Aufl. (10). Berlin Heidelberg. Springer

Khavinson, V., Golubev, A. G. (2002): Aging of the pineal gland. *Adv Gerontol* 9, 67-72.

Khavinson, V., Linkova, N. S. (2012): [Morphofunctional and molecular bases of pineal gland aging]. *Fiziol Cheloveka* 38, 1, 119-127.

Kiratli, H., Erkan Balci, K., Guler, G. (2008): Primary orbital endodermal sinus tumor (yolk sac tumor). *J aapos* 12, 6, 623-625.

Kitkhuandee, A., Sawanyawisuth, K., Johns, N. P., Kanpittaya, J., Johns, J. (2014): Pineal calcification is associated with symptomatic cerebral infarction. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 23, 2, 249-253.

König, H. E., Liebich, H. G. (2009): Endokrine Drüsen. In H. E. König & H. G. Liebich (Hrsg.): *Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis; Ausgabe in einem Band; mit 53 Tabellen. 4. Aufl. (558-559). Stuttgart. Schattauer.*

Korkushko, O. V., Khavinson, V. K., Shatilo, V. B. (2006): The Pineal Gland: Correction in Aging. St. Petersburg: Nauka, 119-127.

Koshy, S., Vettivel, S. (2001): Melanin pigments in human pineal gland. *Journal of the Anatomical Society of India* 50(2), 122-126.

Kühnel, W. (2002): Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. 11. Aufl. (256-259). Stuttgart. Thieme.

Kunz, D., Bes, F., Schlattmann, P., Herrmann, W. M. (1998): On pineal calcification and its relation to subjective sleep perception: a hypothesis-driven pilot study. *Psychiatry Res* 82, 3, 187-191.

La Perle, K. M. D., Capen, C. C. (2009): Endokrines System In D. M. McGavin & J. F. Zachary (Hrsg.): *Pathologie der Haustiere: allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie. 1. Aufl. (652-682). München. Elsevier, Urban & Fischer.*

Lang, G. (2006): Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik, 1. Aufl. (217). Wien. Springer.

Lei, Q., Wang, L., Tan, D. X., Zhao, Y., Zheng, X. D., Chen, H., Li, Q. T., Zuo, B. X., Kong, J. (2013): Identification of genes for melatonin synthetic enzymes in 'Red Fuji' apple (*Malus domestica* Borkh.cv.Red) and their expression and melatonin production during fruit development. *J Pineal Res* 55, 4, 443-451.

Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y. (1960): Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J Biol Chem* 235, 1992-1997.

Long, M. T., Richt, J. A., Grabner, A., Herzog, S., Garten, W., Herden, C. (2014): Chapter 22 - Borna Disease. In M. T. Long & D. C. Sellon (Hrsg.): *Equine Infectious Diseases (Second Edition)* (226-232). St. Louis. W.B. Saunders.

Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W., Kleihues, P. (2007): The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114, 2, 97-109.

Macchi, M. M., Bruce, J. N. (2004): Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol* 25, 3-4, 177-195.

Maestroni, G. J. (1993): The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J Pineal Res* 14, 1, 1-10.

Mahlberg, R., Walther, S., Kalus, P., Bohner, G., Haedel, S., Reischies, F. M., Kuhl, K. P., Hellweg, R., Kunz, D. (2008): Pineal calcification in Alzheimer's disease: an in vivo study using computed tomography. *Neurobiol Aging* 29, 2, 203-209.

Maslinska, D., Laure-Kamionowska, M., Deregowski, K., Maslinski, S. (2010): Association of mast cells with calcification in the human pineal gland. *Folia*

Neuropathol 48, 4, 276-282.

Mccord, C., Allen, F. (1917): Evidence associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J Exp Zool.* 23, 207–224.

Mess, B., Trentini, G. P., Ruzsas, C., De Gaetani, C. F. (1979): Some endocrine effects of the pineal gland and melatonin with special reference to reproduction. *Prog Brain Res* 52, 329-340.

Michielsen, G., Benoit, Y., Baert, E., Meire, F., Caemaert, J. (2002): Symptomatic pineal cysts: clinical manifestations and management. *Acta Neurochir (Wien)* 144, 3, 233-242.

Mochizuki, M., Charley, J., Kuwabara, T., Nussenblatt, R. B., Gery, I. (1983): Involvement of the pineal gland in rats with experimental autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24, 10, 1333-1338.

Moore, R. Y. (1978): Neural control of pineal function in mammals and birds. *J Neural Transm Suppl*, 13, 47-58.

Motta-Teixeira, L. C., Machado-Nils, A. V., Battagello, D. S., Diniz, G. B., Andrade-Silva, J., Silva, S., Jr., Matos, R. A., Do Amaral, F. G., Xavier, G. F., Bittencourt, J. C., Reiter, R. J., Lucassen, P. J., Korosi, A., Cipolla-Neto, J. (2018): The absence of maternal pineal melatonin rhythm during pregnancy and lactation impairs offspring physical growth, neurodevelopment, and behavior. *Horm Behav* 105, 146-156.

Murphy, B. A., Walsh, C. M., Woodward, E. M., Prendergast, R. L., Ryle, J. P., Fallon, L. H., Troedsson, M. H. (2014): Blue light from individual light masks directed at a single eye advances the breeding season in mares. *Equine Vet J* 46, 5, 601-605.

Nagasawa, D. T., Lagman, C., Sun, M., Yew, A., Chung, L. K., Lee, S. J., Bui, T.

T., Ooi, Y. C., Robison, R. A., Zada, G., Yang, I. (2017): Pineal germ cell tumors: Two cases with review of histopathologies and biomarkers. *J Clin Neurosci* 38, 23-31.

Nelson, R. J., Drazen, D. L. (1999): Melatonin mediates seasonal adjustments in immune function. *Reprod Nutr Dev* 39, 3, 383-398.

Ng, K. Y., Leong, M. K., Liang, H., Paxinos, G. (2017): Melatonin receptors: distribution in mammalian brain and their respective putative functions. *Brain Struct Funct* 222, 7, 2921-2939.

Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E., Von Seiferle, E. (1992a): Endokrine Drüse Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band IV. 3. Aufl. (499-501). Berlin Parey.

Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E., Von Seiferle, E. (1992b): Zentralnervensystem Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band IV. 3. Aufl. (126-131). Berlin Parey.

Okatani, Y., Okamoto, K., Hayashi, K., Wakatsuki, A., Tamura, S., Sagara, Y. (1998): Maternal-fetal transfer of melatonin in pregnant women near term. *J Pineal Res* 25, 3, 129-134.

Ortega, P., Malamud, N., Shimkin, M. B. (1951): Metastasis to the pineal body. *AMA Arch Pathol* 52, 6, 518-528.

Pang, S. F., Ralph, C. L. (1975): Pineal and serum melatonin at midday and midnight following pinealectomy or castration in male rats. *J Exp Zool* 193, 3, 275-280.

Petrov, S. V. (1984): Morphofunctional Characteristic of the Pineal Gland in Tumor of Different localization,. *Vopr. Onkol.* 30, 9, 29.

Pierpaoli, W., Regelson, W. (1994): Pineal control of aging: effect of melatonin

and pineal grafting on aging mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2, 787-791.

Poon, A. M. S., Pang, S. F. (1996): Pineal melatonin-immune system interaction. *Frontiers of Hormone Research* 21, 71.

Quay, W. B. (1974): Pineal Chemistry. In *Cellular and Physiological Mechanisms*. Charles Thomas, Springfield, 317-320.

Ralph, C. L. (1975): The pineal gland and geographical distribution of animals. *Int J Biometeorol* 19, 4, 289-303.

Ramis, M. R., Esteban, S., Miralles, A., Tan, D. X., Reiter, R. J. (2015): Protective Effects of Melatonin and Mitochondria-targeted Antioxidants Against Oxidative Stress: A Review. *Curr Med Chem* 22, 22, 2690-2711.

Reiter, R. J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., Ortiz, G. G., Acuna-Castroviejo, D. (1995): A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 18, 1, 1-11.

Reiter, R. J., Tamura, H., Tan, D. X., Xu, X. Y. (2014): Melatonin and the circadian system: contributions to successful female reproduction. *Fertil Steril* 102, 2, 321-328.

Rizzo, P., Raffone, E., Benedetto, V. (2010): Effect of the treatment with myo-inositol plus folic acid plus melatonin in comparison with a treatment with myo-inositol plus folic acid on oocyte quality and pregnancy outcome in IVF cycles. A prospective, clinical trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 14, 6, 555-561.

Rodin, A. E., Overall, J. (1967): Statistical relationships of weight of the human pineal to age and malignancy. *Cancer* 20, 8, 1203-1214.

Rosol, F. R., Gröne, A. (2015): Endocrine Glands. In G. Maxie (Hrsg.), Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals. 3. Aufl. (269-359). St.

Louis. Elsevier Health Sciences.

Sainz, R. M., Mayo, J. C., Rodriguez, C., Tan, D. X., Lopez-Burillo, S., Reiter, R. J. (2003): Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol Life Sci* 60, 7, 1407-1426.

Salhab, M., Dhome-Pollet, S., Auclair, S., Guyader-Joly, C., Brisard, D., Dalbies-Tran, R., Dupont, J., Ponsart, C., Mermillod, P., Uzbekova, S. (2013): In vitro maturation of oocytes alters gene expression and signaling pathways in bovine cumulus cells. *Mol Reprod Dev* 80, 2, 166-182.

Salomon, F. V., Cerny, H., Gille, U. (2008): Endokrine Drüsen. In F. V. Salomon, H. Geyer & U. Gille (Hrsg.): *Anatomie für die Tiermedizin*. 2. Aufl. (626). Stuttgart. Enke.

Sanchez-Barcelo, E. J., Rueda, N., Mediavilla, M. D., Martinez-Cue, C., Reiter, R. J. (2017): Clinical Uses of Melatonin in Neurological Diseases and Mental and Behavioural Disorders. *Curr Med Chem* 24, 35, 3851-3878.

Sandyk, R., Kay, S. R. (1992): Abnormal EEG and calcification of the pineal gland in schizophrenia. *Int J Neurosci* 62, 1-2, 107-111.

Sawamura, Y., Ikeda, J., Ozawa, M., Minoshima, Y., Saito, H., Abe, H. (1995): Magnetic resonance images reveal a high incidence of asymptomatic pineal cysts in young women. *Neurosurgery* 37, 1, 11-15; discussion 15-16.

Scherle, W. (1970): A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie* 26, 1, 57-60.

Schnorr, B., Kressin, M. (2006): Entwicklung der Organe. In B. Schnorr & M. Kressin (Hrsg.): *Embryologie der Haustiere*. 5. Aufl. (133-141). Stuttgart. Enke.

Sivan, Y., Laudon, M., Tauman, R., Zisapel, N. (2001): Melatonin production in

healthy infants: evidence for seasonal variations. *Pediatr Res* 49, 1, 63-68.

Sobotta, J., Welsch, U. (2005): *Atlas Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie; 15 Tabellen. 7. Aufl. (200).* München Elsevier, Urban und Fischer.

Solomou, A. G. (2017): Magnetic resonance imaging of pineal tumors and drop metastases: a review approach. *Rare Tumors* 9, 3, 6715.

Srinivasan, V. (1989): The pineal gland: its physiological and pharmacological role. *Indian J Physiol Pharmacol* 33, 4, 263-272.

Takahashi, M. (2012): Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. *J Reprod Dev* 58, 1, 1-9.

Tamura, H., Takasaki, A., Miwa, I., Taniguchi, K., Maekawa, R., Asada, H., Taketani, T., Matsuoka, A., Yamagata, Y., Shimamura, K., Morioka, H., Ishikawa, H., Reiter, R. J., Sugino, N. (2008): Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res* 44, 3, 280-287.

Tan, D. X., Hardeland, R., Back, K., Manchester, L. C., Alatorre-Jimenez, M. A., Reiter, R. J. (2016): On the significance of an alternate pathway of melatonin synthesis via 5-methoxytryptamine: comparisons across species. *J Pineal Res* 61, 1, 27-40.

Tan, D. X., Hardeland, R., Manchester, L. C., Paredes, S. D., Korkmaz, A., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Fuentes-Broto, L., Reiter, R. J. (2010): The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol Rev Camb Philos Soc* 85, 3, 607-623.

Tan, D. X., Xu, B., Zhou, X., Reiter, R. J. (2018): Pineal Calcification, Melatonin Production, Aging, Associated Health Consequences and Rejuvenation of the

Pineal Gland. *Molecules* 23, 2.

Tan, D. X., Zanghi, B. M., Manchester, L. C., Reiter, R. J. (2014): Melatonin identified in meats and other food stuffs: potentially nutritional impact. *J Pineal Res* 57, 2, 213-218.

Tapp, E., Huxley, M. (1972): The histological appearance of the human pineal gland from puberty to old age. *J Pathol* 108, 2, 137-144.

Tuntapakul, S., Kitkhuandee, A., Kanpittaya, J., Johns, J., Johns, N. P. (2016): Pineal calcification is associated with pediatric primary brain tumor. *Asia Pac J Clin Oncol* 12, 4, e405-e410.

Vigh, B., Szel, A., Debreceni, K., Fejer, Z., Manzano E Silva, M. J., Vigh-Teichmann, I. (1998): Comparative histology of pineal calcification. *Histol Histopathol* 13, 3, 851–870.

Wang, X., Sirianni, A., Pei, Z., Cormier, K., Smith, K., Jiang, J., Zhou, S., Wang, H., Zhao, R., Yano, H., Kim, J. E., Li, W., Kristal, B. S., Ferrante, R. J., Friedlander, R. M. (2011): The melatonin MT1 receptor axis modulates mutant Huntingtin-mediated toxicity. *J Neurosci* 31, 41, 14496-14507.

Weibel, E. R. (1963): Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest* 12, 131-155.

Weishaupt, J. H., Bartels, C., Polking, E., Dietrich, J., Rohde, G., Poeggeler, B., Mertens, N., Sperling, S., Bohn, M., Huther, G., Schneider, A., Bach, A., Siren, A. L., Hardeland, R., Bahr, M., Nave, K. A., Ehrenreich, H. (2006): Reduced oxidative damage in ALS by high-dose enteral melatonin treatment. *J Pineal Res* 41, 4, 313-323.

Wurtman, R. J., Axelrod, J., Barchas, J. D. (1964): Age and enzyme activity in the human pineal *J Clin Endocrinol Metab* 24, 299-301.

Yamagami, T., Handa, H., Takeuchi, J., Nijima, K., Furukawa, F. (1983): Choriocarcinoma arising from the pituitary fossa with extracranial metastasis: a review of the literature. *Surg Neurol* 19, 5, 469-480.

## 9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Epiphyse, Pferd, S 1283/09</i> .....	4
<i>Abbildung 2: Epiphyse, Pferd, S 265/10, HE-Färbung</i> .....	6
<i>Abbildung 3: Epiphyse, Pferd, S 265/10, HE-Färbung, Pinealzellen, Melanozyte</i> 7	
<i>Abbildung 4: Elektronenmikroskopisches Bild von Pinealzellen einer menschlichen Epiphyse, dünner Pfeil: faltige Kernmembran und endoplasmatisches Retikulum, dicker Pfeil: Pigment (Bildquelle: Al-Hussain et al., 2006)</i> .....	7
<i>Abbildung 5: Prozentualer Anteil der Tiere in drei Altersgruppen, n=76</i> .....	33
<i>Abbildung 6: Epiphyse, Pferd, S 642/09, 25x Vergrößerung, HE-Färbung, langgestreckte melaninhaltige Zellen, unteres Bilddrittel rechts Melano- oder Siderophage</i> .....	39
<i>Abbildung 7: Epiphyse, Pferd, S 642/09, 40x Vergrößerung, HE-Färbung, Melanin und Melano- oder Siderophage (unten am Bildrand)</i> .....	40
<i>Abbildung 8: Epiphyse, Pferd, S 642/09, 25x Vergrößerung, HE-gebleicht, oben links Siderophage im Gefäßlumen und Hämosiderin in der Gefäßwand (dunkelbraun). Keine melaninhaltigen Zellen</i> .....	40
<i>Abbildung 9: Epiphyse, Pferd, S 642/09, 25x Vergrößerung, Turnbull-Blau-Färbung ungebleicht, Melanin (bräunlich) und Hämosiderin (blau)</i> .....	41
<i>Abbildung 10: Epiphyse, Pferd, S 642/09, 25x Vergrößerung, Turnbull-Blau-Färbung ungebleicht, Hämosiderin in Gefäßwand, Siderophagen und langgestreckte melaninhaltige, Turnbull-Blau negative Zellen</i> .....	41
<i>Abbildung 11: Epiphyse, Pferd, S 642/09, 40x Vergrößerung, Turnbull-Blau-Färbung ungebleicht, melaninhaltige Zellausläufer neben Turnbull-Blau positivem Pigment in Pinealiszellen</i> .....	42
<i>Abbildung 12: Epiphyse, Pferd, S 642/09, 40x Vergrößerung, Turnbull-Blau-Färbung ungebleicht, Hämosiderin/Siderophagen (blau), neben teils langgestreckten melaninhaltigen Zellen (braun), ein Makrophage mit phagozytiertem Melanin und Hämosiderin</i> .....	42
<i>Abbildung 13: Epiphyse, Pferd, S 642/09, 25x Vergrößerung, Turnbull-Blau-Färbung gebleicht, Hämosiderin in der Gefäßwand und im Interstitium</i> .....	43
<i>Abbildung 14: Epiphyse, Pferd, S 600/09, 25x Vergrößerung, PAS ungebleicht, melaninhaltige Zellen im Bindegewebe, PAS positive Siderophagen</i> .....	43

<i>Abbildung 15: Epiphyse, Pferd, S 642/09, 40x Vergrößerung, PAS ungebleicht sternförmige melaninhaltige Zelle mit langen Zytoplasmaausläufern im Interstitium</i> .....	44
<i>Abbildung 16: Epiphyse, Pferd, S 600/09, 25x Vergrößerung, PAS gebleicht, Siderophagen, Ödem und einzelne Lymphozyten im gefäßführenden Bindegewebe, keine melaninhaltigen Zellen</i> .....	44
<i>Abbildung 17: Epiphyse, Pferd, S 642/09, 25x Vergrößerung, PAS gebleicht, Siderophagen/Hämosiderin, keine melaninhaltigen Zellen im Interstitium</i> .....	45
<i>Abbildung 18: Korrelation von Alter und Lipofuscin (0: nicht enthalten, 1: geringgradig, 2: mittelgradig), n=119 (<math>r_k=0,401</math>, <math>P&lt;0,001</math>)</i> .....	46
<i>Abbildung 19: Korrelation von Alter und Melanin (1: geringgradig, 2: mittelgradig, 3: hochgradig), n=119 (<math>r_k=-0,046</math>, <math>P=0,541</math>)</i> .....	47
<i>Abbildung 20: Epiphyse, Pferd, S 785/09, perivaskuläres Ödem</i> .....	48
<i>Abbildung 21: Epiphyse, Pferd, S 785/09, 25x Vergrößerung, Pinealitis, perivaskuläres Ödem, perivaskuläre lymphoplasmazelluläre Infiltrate</i> .....	49
<i>Abbildung 22: Korrelation zwischen Körpergewicht der Pferde und absolutem Epiphysengewicht. n=76, Alter=1-36 Jahre (<math>r=0,022</math>, <math>p=0,851</math>)</i> .....	52
<i>Abbildung 23: Korrelation zwischen Körpergewicht der Pferde und Volumendichte (<math>V_{V(Pin/Epi)}</math>) der Pinealzellen. n=76, Alter=1-36 Jahre (<math>r=-0,004</math>, <math>p=0,974</math>)</i> .....	52
<i>Abbildung 24: Korrelation zwischen Körpergewicht der Pferde und Gesamtvolumen (<math>V_{(Pin, Epi)}</math>) der Pinealzellen. n=76, Alter=1-36 Jahre (<math>r=0,036</math>, <math>p=0,744</math>)</i> .....	53
<i>Abbildung 25: Volumendichte (<math>V_{V(Pin/Epi)}</math>) der Pinealzellen in der Epiphyse von Groß- und Kleinpferden im Alter von 1-36 Jahren, Gesamtanzahl n=76, Großpferd=55, Pony=18, (<math>p=0,559</math>)</i> .....	54
<i>Abbildung 26: Gesamtvolumen (<math>V_{(Pin, Epi)}</math>) der Pinealzellen von Groß- und Kleinpferden im Alter von 1-36 Jahren, n=76, Großpferd=55, Pony=18, (<math>p=0,404</math>)</i> .....	55
<i>Abbildung 27: Volumendichte <math>V_{V(Pin/Epi)}</math> der Pinealzellen von Wallachen und Stuten im Alter von 1-36 Jahren, n=76, Wallache (Ortega et al.)=44, Stuten (W)=32</i> .....	56
<i>Abbildung 28: Gesamtvolumen (<math>V_{(Pin, Epi)}</math>) der Pinealzellen von Wallachen und Stuten im Alter von 1-36 Jahren, n=76, Wallache (Ortega et al.)=44, Stuten (W)=32 (<math>p=0,525</math>)</i> .....	56

<i>Abbildung 29: Korrelation zwischen dem Alter der Pferde und Volumendichte (<math>V_V(\text{Pin}/\text{Epi})</math>) der Pinealzellen in der Epiphyse, <math>n=76</math>, Alter=1-36 Jahre (<math>r=-0,388</math>, <math>p=0,001</math>).....</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 30: Korrelation zwischen dem Alter der Pferde und Gesamtvolumen (<math>V_{(\text{Pin}, \text{Epi})}</math>) der Pinealzellen der Epiphyse, <math>n=76</math>, Alter=1-36 Jahre (<math>r=-0,257</math>, <math>p=0,025</math>).....</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 31: Korrelation zwischen dem Alter der Pferde und dem absoluten Epiphysengewicht, <math>n=76</math>, Alter=1-36 Jahre (<math>r=-0,145</math>, <math>p=0,671</math>).....</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 32: Korrelation zwischen dem Alter der Pferde und dem relativen Epiphysengewicht, <math>n=76</math>, Alter=1-36 Jahre (<math>r=-0,184</math>, <math>p=0,112</math>).....</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 33: Korrelation Alter zum Bindegewebsanteil in der Epiphyse (<math>V_V(\text{Bgw}/\text{Epi})</math>), <math>n=76</math>, Alter=1-36 Jahre (<math>r=0,259</math>, <math>p=0,024</math>) .....</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 34: Korrelation Alter zu Pigment in der Epiphyse (<math>V_V(\text{Pig}/\text{Epi})</math>), <math>n=76</math>, Alter=1-36 Jahre (<math>r=0,272</math>, <math>p=0,018</math>).....</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 35: Volumendichte (<math>V_V(\text{Pin}/\text{Epi})</math>) der Pinealzellen in der Epiphyse zu den Saisonen, <math>n=76</math> (Herbst: 16, Winter: 21, Frühjahr: 23, Sommer: 16) (<math>p=0,450</math>).<i>61</i></i>	
<i>Abbildung 36: Gesamtvolumen (<math>V_{(\text{Pin}, \text{Epi})}</math>) der Pinealzellen zu den Saisonen im Alter von 1-36 Jahren, <math>n=76</math> (Herbst: 16, Winter: 21, Frühjahr: 23, Sommer: 16), (<math>p=0,151</math>). .....</i>	<i>61</i>
<i>Abbildung 37: Epiphyse, Pferd, S 785/09, 25x Vergrößerung, IHC BDV, Gegenfärbung mit Hämalan. Positiver Bornavirusantigen Nachweis (braun) ..</i>	<i>62</i>

## 10 TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Spezialfärbungen zur Differenzierung von Pigment.....</i>	15
<i>Tabelle 2: Entwässerungsprozess Paraffineinbettung.....</i>	23
<i>Tabelle 3: Vorgang der Hämalaun-Eosin (HE)–Färbung der Paraffinschnitte... </i>	24
<i>Tabelle 4: Vorgang der Giemsa–Färbung der Paraffinschnitte.....</i>	24
<i>Tabelle 5: Turnbull-Blau-Färbung nach Quinckes .....</i>	25
<i>Tabelle 6: PAS-Reaktion.....</i>	26
<i>Tabelle 7: Entwässerungsprozess Kunststoffeinbettung .....</i>	27
<i>Tabelle 8: Vorgang der Hämalaun Eosin (HE)–Färbung der Kunststoffschritte</i>	28
<i>Tabelle 9: Vorgang zur Giemsa–Färbung der Kunststoffschritte .....</i>	29
<i>Tabelle 10: Immunhistochemie Borna .....</i>	30
<i>Tabelle 11: Zuordnung Großpferd/Pony in Bezug zur Geschlechterverteilung, n=119.....</i>	31
<i>Tabelle 12: Geschlechterverteilung in Bezug zu den Altersgruppen, n=119 .....</i>	31
<i>Tabelle 13: Zuordnung Großpferd/Pony in Bezug zu den Altersgruppen, n=119</i>	32
<i>Tabelle 14: Geschlechterverteilung innerhalb der Ordnungsgruppe Großpferd/Pony, n=76.....</i>	32
<i>Tabelle 15: Geschlechterverteilung und Zuordnung Großpferd/Pony in Bezug zu den Altersgruppen, n=76 .....</i>	33
<i>Tabelle 16: Geschlechterverteilung und Zuordnung Großpferd/Pony in Bezug zu den Saisonen, n=76.....</i>	34
<i>Tabelle 17: Befundgraduierung .....</i>	34
<i>Tabelle 18: Befunde .....</i>	35
<i>Tabelle 19: Kendall-Tau-b Korrelation (<math>r_k</math>) zwischen Alter und Pigment (Lipofuscin und Melanin), n=119 .....</i>	46
<i>Tabelle 20: Kendall-Tau-b Korrelation zwischen Hyperämie und der perivaskuläre lymphoplasmazelluläre Infiltration, n=119 (<math>r_k=0,790</math>, <math>p&lt;0,001</math>). </i>	49
<i>Tabelle 21: Epiphysenvolumen (<math>V_{Pin}</math>), Volumendichte (<math>V_{V(Pin/Epi)}</math>) und Gesamtvolumen (<math>V_{(Pin, Epi)}</math>) der Pinealzellen in der Epiphyse, n=76 .....</i>	50
<i>Tabelle 22: Körpergewicht und Epiphysengewicht, n=76.....</i>	51
<i>Tabelle 23: Mittelwert und Standardabweichung des Gesamtvolumens (<math>V_{(Pin, Epi)}</math>) und der Volumendichte (<math>V_{V(Pin/Epi)}</math>) der Pinealzellen bei Großpferden und Ponys, n=73.....</i>	54

---

<i>Tabelle 24: Mittelwert und Standardabweichung des Gesamtvolumens (<math>V_{(Pin, Epi)}</math>) und der Volumendichte (<math>V_{V(Pin/Epi)}</math>) der Pinealzellen in der Epiphyse bei Wallachen und Stuten, <math>n=76</math>.....</i>	<i>55</i>
---	-----------

## 11 ANHANG

### 11.1 Verwendete Materialien für Paraffinschnitte

#### 11.1.1 Hämalaun-Eosin-Färbung

##### 11.1.1.1 HCl-Alkohol-Stammlösung 1%ig

96%iger Alkohol	7000 ml
Aqua dest.	2500 ml
25%ige Salzsäure	100 ml

##### 11.1.1.2 HCl-Alkohol-Gebrauchslösung 0,5%ig

HCl-Alkohol-Stammlösung	100 ml
70%iger Alkohol	100 ml

##### 11.1.1.3 Eosin-Lösung 1%ig

Eosin	10 g
Aqua dest. (heiß, um Eosin zu lösen, dann abkühlen lassen)	1000 ml
Eisessig	1,5 ml

#### 11.1.2 Giemsa-Färbung

##### 11.1.2.1 Phosphatpuffer 0,1 Mol

<b>Lösung A</b>	Kaliumdihydrogenphosphat	13,61 g
	Aqua dest.	1000 ml
<b>Lösung B</b>	Dinatriumhydrogenphosphat	3,55 g
	Aqua dest.	250 ml

**11.1.2.2 Giemsa-Gebrauchslösung 7%ig**

Phosphatpuffer Lösung A	390 ml
Phosphatpuffer Lösung B	10 ml
Mischen und erwärmen (ca. 70-80 °C)	
Giemsa-Stammlösung	28 ml
Lösung auf pH 5 einstellen und filtrieren (ca. 3 Tropfen Salzsäure)	

**11.1.2.3 Essigsäure 0,5%ig**

Aqua dest.	50 ml
Essigsäure 1%ig	50 ml

**11.1.3 Turnbull-Blau-Färbung****11.1.3.1 Ammoniumsulfidlösung 10%ig**

Ammoniumsulfid	50 ml
Aqua dest.	50 ml

**11.1.3.2 Kaliumhexacyanoferrat (III) 20%ig**

Kaliumhexacyanoferrat (III)	5 g
0,5 %ige Salzsäure	50 ml

**11.1.3.3 Salzsäure 1%ig**

Salzsäure 25%ig	400 ml
Aqua dest.	9400 ml

**11.1.3.4 Kernechtrot 0,1%ig**

Aluminiumsulfat (Merck, Darmstadt, Nr. 1102)	50 g
Aqua dest.	1000 ml
Kernechtrot (Merck, Darmstadt, Nr. 15939)	1 g

**11.1.4 PAS-Reaktion****11.1.4.1 Perjodsäure 1 %**

<b>Lösung A</b>	Perjodsäure	10 g
	Aqua dest.	1000 ml
<b>Lösung B</b>	Natriumacetat	1,6 g
	Aqua dest.	100 ml
Getrenntes Ansetzen der Lösungen, anschließend Mischung und Aufbewahrung im Kühlschrank		

**11.1.4.2 HCl-Alkohol-Stammlösung 1%ig**

96%iger Alkohol	7000 ml
Aqua dest.	2500 ml
25%ige Salzsäure	100 ml

**11.1.4.3 HCl-Alkohol-Gebrauchslösung 0,5%ig**

HCl-Alkohol-Stammlösung	100 ml
70%iger Alkohol	100 ml

**11.1.5 Bleichung****11.1.5.1 Bleichlösung 5%ig**

Wasserstoffperoxid 5%ig	15 ml
-------------------------	-------

Aqua dest.	75 ml
------------	-------

## 11.2 Verwendete Materialien für die Kunststoffeinfettung

### 11.2.1 Spülflüssigkeit

Saccharose	70 g
Kalziumchlorid-Dihydrat	0,735 g
Cacodylatpuffer (vgl. 11.1.1)	1000 ml

PH-Wert auf 7,2 einstellen.

### 11.2.2 Cacodylatpuffer

Dimethylarsinsäure Natriumsalz-Trihydrat	10,7 g
Aqua dest.	500 ml
Salzsäure 1N	4,15 ml
PH – Wert auf 7,2 durch Zugabe von 0,1 N HCl, bzw. 0,1 N NaOH	
Aqua dest. (80°C)	500 ml

### 11.2.3 Einbettungsmedium (Lösung A)

Methacrylsäure-2-hydroxyethylester	70 g
Methacrylsäure-methylester (MMA)	20 ml
Butylglykol (Ethylenglykolmonobutylether)	16 ml
Polyethylenglykol 400 (Weichmacher)	2 ml
Benzolperoxid (Katalysator, mit 25% Wasser)	338 mg

### 11.2.4 Einbettungsmedium (Lösung B)

N-N-Dimethylanilin	60 µl
--------------------	-------

Einbettungsmedium (Lösung A)	40 ml
------------------------------	-------

### 11.3 Verwendete Materialien für Färbung der Kunststoffsnitte

#### 11.3.1 HE – Färbung

##### 11.3.1.1 HCl – Ethanol 1%ig

Salzsäure 25%ig	10 ml
Ethanol 96%ig	700 ml
Aqua dest.	250 ml

##### 11.3.1.2 Eosin – Phloxin – Gebrauchslösung

Ethanol 96%ig	468 ml
Stammlösung Eosin	30 ml
Stammlösung Phloxin	3 ml
Essigsäure 96%ig	2,4 ml

##### 11.3.1.3 Stammlösung Eosin

Eosin gelblich	1 g
Aqua dest.	1000 ml

##### 11.3.1.4 Stammlösung Phloxin

Phloxin	1 g
Aqua dest.	1000 ml

### 11.3.2 Giemsa – Färbung

#### 11.3.2.1 Giemsa – Gebrauchslösung

Phosphat-Puffer	200 ml
Giemsa-Stammlösung	14 ml
Den pH-Wert mit Hilfe von 0,1 N HCl, bzw. 0,1 N Natronlauge auf 6,7 einstellen	

#### 11.3.2.2 Phosphat-Puffer 0,067M

Di-Kaliumdihydrogenphosphat 9,12 g/l	200 ml
Di-Natriumhydrogenphosphatdihydrat 11,93 g/l	160 ml
Den pH-Wert mit Hilfe von 0,1 N HCl, bzw. 0,1 N Natronlauge auf 6,7 einstellen.	

#### 11.3.2.3 Essigsäure 0,5%ig

Aqua dest.	1000 ml
Eisessig	5 ml

## 11.4 Immunhistochemie Borna

### 11.4.1 Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 1 %

Wasserstoffperoxid 30%ig	6 ml
Aqua dest.	174 ml

### 11.4.2 Tris buffered saline (TBS) pH-Wert 7,6

Für 2000 ml Stammlösung für TBS-Puffer pH-Wert 7,6:

TRIS lösen in 1900ml Aqua dest.	121 g
NaCl	90 g
Einstellung des pH-Werts auf pH 7,6 mit HCL 25 %	
auffüllen auf 2000 ml	

Für Gebrauchslösung: Verdünnung der Stammlösung 1:10 mit Aqua dest.

#### 11.4.3 DAB pH-Wert 7,0

diaminobenzidine tetrahydrochlorid dihydrat (DAB)	1 Tablette
In Aqua dest. Auflösen (1 Std)	10 ml
hinzufügen von 1 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 % pro 1 ml	

## 11.5 Allgemeine Daten der untersuchten Pferde

(Bayr.: Bayrisches, BWS: Brustwirbelsäule, chron.: chronisch, E: Euthanasie, F: Frühjahr, Franz: Französisches, GP: Großpferd, H: Herbst, HWS: Halswirbelsäule, KB: Kaltblut, m: männlich/Hengst, mk: männlich kastriert/Wallach, n.b.: nicht bekannt, nekr.: nekrotisch, Öster.: Österreichisches, S: Sommer, Süddt.: Süddeutsches, T: Tod, VB: Vollblut, W: Winter, w: weiblich/Stute, W: Winter, WB: Warmblut)

Sektionsnummer	Saison	Alter in Jahren	Geschlecht	Rasse	Todesart	Ordnung	Körpergewicht [kg]	Epiphysengewicht [mg]	Epiphysengewicht *10 <sup>-3</sup> [%]	Diagnose
S 859/08	S	14	W	Bayr. WB	T	GP	550	n.b.		metastasierendes Adenokarzinom
S 957/08	H	25	mk	WB	E	Pony	550	220	0,04	Femurfraktur, chron.-ulzerierende Keratitis, Hyperplasie/Adenom Nierenbecken, Harnblasenzyste
S 990/08	W	7	mk	WB	E	GP	550	110	0,02	chron.-arthrotische Veränderungen HWS
S 1095/08	W	12	mk	WB	E	GP	550	50	0,01	Kolitis X, Melanom, Hepatitis
S 1133/08	F	4	mk	Haflinger	E	Pony	300	230	0,08	Myokardfibrose

Sektionsnummer	Saison	Alter in Jahren	Geschlecht	Rasse	Todesart	Ordnung	Körpergewicht [kg]	Epiphysengewicht [mg]	Epiphysengewicht *10 <sup>-3</sup> [%]	Diagnose
E 2857/08	F	15	w	Haflinger/ Islandpferd Mix	n.b.	Pony	380	110	0,03	Hypophyse vergrößert, Epilepsie, Cushing
S 424/09	S	15	mk	WB	E	GP	550	120	0,02	Malignes Lymphom
S 505/09	S	7	mk	Islandpferd	E	Pony	250	290	0,12	Trümmerfraktur Kronbein linke Vordergliedmaße
E 558/09	S	11	mk	WB	n.b.	GP	586	280	0,05	n.b.
S 580/09	S	18	mk	WB	T	GP	600	170	0,03	Kardiomyopathie, Schilddrüsenadenome
S 597/09	S	10	mk	n.b.	E	n.b.	600	210	0,04	Entzündliche Alterationen Oberkiefer, Septikämie
S 600/09	S	12	mk	Bay. WB	E	GP	600	360	0,06	Inkarzerierung Dünndarm, Magenruptur

Sektionsnummer	Saison	Alter in Jahren	Geschlecht	Rasse	Todesart	Ordnung	Körpergewicht [kg]	Epiphysengewicht [mg]	Epiphysengewicht *10 <sup>-3</sup> [%]	Diagnose
E 603/09	S	12	mk	WB	E	GP	650	240	0,04	Fraktur Fesselbein
S 604/09	S	13	mk	WB	E	GP	675	110	0,02	Malignes Lymphom
S 608/09	S	18	mk	WB	E	GP	600	240	0,04	Glaukom, Beckenfraktur, Struma parenchymatosa diffusa
S 642/09	H	20	mk	Franz. WB	T	GP	625	200	0,03	Tumor linke Niere
S 656/09	H	6	w	VB	E	GP	500	140	0,03	Bornavirusinfektion
S 706/09	H	9	m	Süddt. Kaltblut	T	GP	805	120	0,02	Ileumruptur mit diffuser Peritonitis als Folge parasitären Geschehens
S 707/09	H	12	m	Islandpferd	E	Pony	300	150	0,05	Augenprobleme
S 714/09	H	24	w	Arabisches VB	E	GP	408	100	0,03	Hydrocephalus internus, Plexuscholesteatom, Parasitengranulom Leber

Sektionsnummer	Saison	Alter in Jahren	Geschlecht	Rasse	Todesart	Ordnung	Körpergewicht [kg]	Epiphysengewicht [mg]	Epiphysengewicht *10 <sup>-3</sup> [%]	Diagnose
S 765/09	H	25	m	VB	T	GP	500	120	0,02	Endokarditis (bakteriell-toxisch), Adenome in NN, Schilddrüse und Hypophyse; Equine Sarkoide
S 776/09	H	0	w	Arabisches VB	E	GP	90	70	0,08	hgr. Osteomyelitis mit Nachweis Rhodococcus equi, interstitielle Pneumonie
S 785/09	H	16	w	Dt. Reitpony	T	Pony	350	120	0,03	Bornavirusinfektion
S 800/09	H	14	w	Ungar. WB	E	GP	500	50	0,01	Nephropathie mit interstitieller Fibrose
S 822/09	H	23	w	Ungar. WB	E	GP	550	200	0,04	Perforation Zäkum mit Peritonitis, chron. Myokarditis; Adenome in Hypophyse, Schilddrüse und NN

Sektionsnummer	Saison	Alter in Jahren	Geschlecht	Rasse	Todesart	Ordnung	Körpergewicht [kg]	Epiphysengewicht [mg]	Epiphysengewicht *10 <sup>-3</sup> [%]	Diagnose
S 840/09	H	11	mk	Oldenburger WB	E	GP	600	160	0,03	hämorrhagische Infarzierung Darm
S 874/09	H	12	mk	Öster. WB	E	GP	600	170	0,03	hgr. intestitielle Pneumonie
S 885/09	H	17	w	Haflinger	E	Pony	500	210	0,04	chron. Hufrehe
S 897/09	H	18	w	Haflinger	E	Pony	450	200	0,04	hgr. Spondylarthrose BWS
S 898/09	W	23	m	Przewalskipferd	E	Pony	263	110	0,04	Knorpelverlust im Tarsalgelenk, Gefäßverkalkung
S 971/09	W	15	m	Quarter Horse	E	GP	500	250	0,05	Hämolyse in Leber, axonale Sphäroide im Hals- & Brustmark
S 974/09	W	5	mk	Süddt. KB	E	GP	800	160	0,02	Magenruptur, Magenulzera, Kolitis X
S 1078/09	W	36	mk	n.b.	E	n.b.	500	50	0,01	hgr. Arthrose Hüftgelenk, COPD
S 1088/09	W	16	mk	Bay. WB	n.b.	GP	600	140	0,02	hgr. chron. fibrosierende Nephritis

Sektionsnummer	Saison	Alter in Jahren	Geschlecht	Rasse	Todesart	Ordnung	Körpergewicht [kg]	Epiphysengewicht [mg]	Epiphysengewicht *10 <sup>-3</sup> [%]	Diagnose
S 1099/09	W	23	w	Hannoveraner WB	n.b.	GP	600	130	0,02	Torsio coli, Magenüberladung, chron. Zystitis, chron. Nephritis, Ovaratrophie
S 1124/09	W	17	mk	Haflinger	E	Pony	500	150	0,03	Spondylarthropathie
S 1128/09	W	15	mk	Bay. WB	E	GP	600	180	0,03	Fibroelastose & Verkalkung des Endokards
S 1137/09	W	15	w	Traber	T	GP	600	130	0,02	nekrot. Enteritis mit Nachweis von Clostridien
S 1142/09	W	21	m	Arabisches VB	n.b.	GP	500	70	0,01	Beckentrümmerfraktur, chron. interstitielle Nephritis
S 1143/09	W	10	w	Islandpferd	T	Pony	400	250	0,06	Ileus, Peritonitis
S 1204/09	W	2	w	Haflinger	E	Pony	450	150	0,03	atypische Myoglobinurie/Myopathie
S 1205/09	W	15	w	Traber	E	GP	550	120	0,02	Mikroadenome der Hypophyse

Sektionsnummer	Saison	Alter in Jahren	Geschlecht	Rasse	Todesart	Ordnung	Körpergewicht [kg]	Epiphysengewicht [mg]	Epiphysengewicht *10 <sup>-3</sup> [%]	Diagnose
S 1219/09	W	12	mk	WB	E	GP	550	130	0,02	Netzhautablösung
S 1241/09	F	13	mk	WB	T	GP	600	130	0,02	anaphylaktischer Schock, Tendinitis tiefe Beugesehne, ggr. Synovialitis
S 1244/09	F	20	w	Quarter Horse	E	GP	480	190	0,04	Augenprobleme
S 1248/09	F	4	m	WB	E	GP	600	100	0,02	hgr. eitrig, nekrotisierende Meningoenzephalitis, Ventrikulitis, Meningomyelitis
S 1277/09	F	3	w	WB	E	GP	600	400	0,07	Knochenzysten Krongelenk
S 1283/09	F	20	mk	Argentino-Polopferd	E	GP	460	100	0,02	Herzinsuffizienz
S 1299/09	F	14	mk	Gelderländer	T	GP	650	70	0,01	Metastasierendes Hämangiosarkom
S 2/10	F	4	m	Friese	T	GP	650	200	0,03	Herz-/Kreislaufversagen, Rhodococcus equi Infektion, Alopecia areata

Sektionsnummer	Saison	Alter in Jahren	Geschlecht	Rasse	Todesart	Ordnung	Körpergewicht [kg]	Epiphysengewicht [mg]	Epiphysengewicht *10 <sup>-3</sup> [%]	Diagnose
S 18/10	F	16,5	w	Knabstrupper	E	GP	650	50	0,01	hgr. chron. Rhinitis
S 77/10	F	17	mk	Oldenburger WB	n.b.	GP	650	250	0,04	Kardiomyopathie, Endokardfibrose
S 80/10	F	2	mk	Haflinger	T	Pony	400	80	0,02	Herzmissbildung, Herzinsuffizienz
S 107/10	F	13	mk	Friese	E	GP	750	80	0,01	Ösophagusdivertikel mit Perforation
S 140/10	F	6	w	Paint	E	GP	420	200	0,05	Kolonobstipation, chron. Magenulzera
S 158/10	F	22	w	Islandpferd	E	Pony	350	260	0,07	nichteitrige Meningoenzephalitis, Schultergelenksarthrosen
S 159/10	F	15	w	Tinker	E	GP	500	160	0,03	Lipoma pendulans
S 160/10	F	20	mk	WB	E	GP	600	120	0,02	Kolonruptur
S 168/10	F	30	mk	WB	T	GP	600	140	0,02	chron. Nephritis, Haemomelasma ilei

Sektionsnummer	Saison	Alter in Jahren	Geschlecht	Rasse	Todesart	Ordnung	Körpergewicht [kg]	Epiphysengewicht [mg]	Epiphysengewicht *10 <sup>-3</sup> [%]	Diagnose
S 204/10	S	25	mk	WB	E	GP	750	190	0,03	hgr. Hämorrhagische. Infarzierung Dünndarm
S 219/10	S	17	m	Friese	T	GP	550	120	0,02	Magenruptur; akutes Nierenversagen, Hodenatrophie, Leydigzelltumor chron Gastritis
S 220/10	S	18	mk	WB	E	GP	500	240	0,05	Malignes Lymphom
S 265/10	S	3	w	Appaloosa	E	GP	550	130	0,02	Uveitis, ERU, Fraktur Humerus,
S 275/10	S	18	mk	Islandpferd	E	Pony	400	320	0,08	Malignes Lymphom um Aorta, Herz, Dickdarm, Nebenniere
S 287/10	S	22	w	Islandpferd /Haflinger Mix	E	Pony	430	230	0,05	Hämorrhagische Infarzierung Darm, Lipoma pendulans

Sektionsnummer	Saison	Alter in Jahren	Geschlecht	Rasse	Todesart	Ordnung	Körpergewicht [kg]	Epiphysengewicht [mg]	Epiphysengewicht *10 <sup>-3</sup> [%]	Diagnose
S 296/10	S	25	w	Haflinger	E	Pony	500	150	0,03	Enteritis, Kolitis X, Kardiomyopathie
S 303/10	S	0	m	n.b.	n.b.	n.b.	45	10	0,02	Infektion Magen-Darm-Trakt, Nabel
S 304/10	S	7	m	Islandpferd	E	Pony	400	220	0,06	Hepatoenzephalisches Syndrom
S 321/10	S	15	w	Hannoveraner WB	E	GP	600	190	0,03	Mitralklappenfibrose/-Stenose
S 329/10	S	18	w	Bay. WB	E	GP	550	200	0,04	Hämorrhag.-nekrot. Enteritis, Peritonitis, Leberzellnekrose
S 330/10	S	7	m	Sächs. WB	T	GP	650	110	0,02	Peritonitis
S 367/10	S	16	w	Haflinger	E	Pony	400	90	0,02	Kolitis X, Plexuscholesteatom
S 405/10	S	8	w	Appaloosa	E	GP	500	140	0,03	Bornavirusinfektion, Nephropathie
S 410/10	S	15	w	WB	E	GP	650	100	0,02	Arthritis Fesselgelenk

Sektionsnummer	Saison	Alter in Jahren	Geschlecht	Rasse	Todesart	Ordnung	Körpergewicht [kg]	Epiphysengewicht [mg]	Epiphysengewicht *10 <sup>-3</sup> [%]	Diagnose
S 411/10	S	14	w	WB	E	GP	650	130	0,02	Caecum/ Kolonverlagerung
S 425/10	S	25	mk	Rheinländer	E	GP	650	150	0,02	Rektales Plattenepithelkarzinom, hgr. chron. fibröse Nephritis
S 463/10	H	16	w	Shagya-Araber	E	GP	450	30	0,01	Chron. Nephritis, Papillome u. Adenome Magen
S 546/10	H	21	w	Traber	E	GP	570	150	0,03	präzirrhotische Leber, Magenzulzera
S 655/10	H	17	w	Appaloosa		GP	496	150	0,03	Glaukom beidseitig
S 673/10	H	18	mk	WB	E	GP	650	150	0,02	n.b.
S 699/10	H	5	mk	Andalusier	E	GP	550	150	0,03	n.b.
S 722/10	H	29	w	WB	E	GP	550	n.b.		Chron. interst. Nephritis, Mikroadenome Hypophyse
S 735/10	H	9	mk	WB	E	GP	650	n.b.		Hufrolle

Sektionsnummer	Saison	Alter in Jahren	Geschlecht	Rasse	Todesart	Ordnung	Körpergewicht [kg]	Epiphysengewicht [mg]	Epiphysengewicht *10 <sup>-3</sup> [%]	Diagnose
S 785/10	H	1,5	w	Quarter Horse	T	GP	600	120	0,02	Equines Herpesvirus 1
S 805/10	H	9	mk	Andalusier	T	GP	600	150	0,03	Gefäßperforation
S 837/10	H	18	mk	n.b.	T	n.b.	700	170	0,02	Ersticken unklarer Ätiologie
S 913/10	W	7	mk	Shagya-Araber	T	GP	525	150	0,03	Fibrosarkom
S 993/10	W	8	mk	Engl. VB	E	GP	500	80	0,02	Equine multinoduläre pulmonale Fibrose, Herpesvirusinfektion, Leberzirrhose
S 1089/10	W	12	mk	Bay. WB	E	GP	700	250	0,04	Hgr. ankylosierende Arthrose
S 1210/10	W	12	w	Süddt. KB	T	GP	700	320	0,05	myokardiale Muskelzelldegeneration, -nekrose

Sektionsnummer	Saison	Alter in Jahren	Geschlecht	Rasse	Todesart	Ordnung	Körpergewicht [kg]	Epiphysengewicht [mg]	Epiphysengewicht *10 <sup>-3</sup> [%]	Diagnose
S 1281/10	F	19	mk	Haflinger	E	Pony	500	170	0,03	Malignes Lymphom
S 1287/10	F	26	mk	Engl. VB		GP	500	180	0,04	metastasierendes Hämangiosarkom; Adenome in Schilddrüse, NN, Hypophyse
E2153/10	F	8	mk	Oldenburger WB	n.b.	GP	n.b.	160		obB
S 4/11	W	11	w	Welsh B-Pony	E	Pony	500	150	0,03	Neuritis
S 6/11	W	1	m	Pura Raza Espagnola	E	GP	500	100	0,02	eitrige Nephritis, Thrombusbildung in Bereich Endaufzweigung Bauchorta
S 13/11	W	15	w	Haflinger	E	Pony	500	190	0,04	Malignes Lymphom in Leber, Milz, Dickdarm, Lnn., Konjunktiva, Waldeyer-Rachenring
S 28/11	W	4	m	n.b.	T	n.b.	n.b.	140	0,03	Chron. Kardiomyopathie, akute hypoxische Nervenzelluntergänge

Sektionsnummer	Saison	Alter in Jahren	Geschlecht	Rasse	Todesart	Ordnung	Körpergewicht [kg]	Epiphysengewicht [mg]	Epiphysengewicht *10 <sup>-3</sup> [%]	Diagnose
S 93/11	W	10	mk	Isländer	T	Pony	500	260	0,05	Kolitis X, Glomerulonephritis, Niereninfarkt
S 108/11	W	1	m	Süddt. KB	E	GP	250	90	0,04	Dilat. Ösophagus, schlaffe Lähmung Ohr u. Schweif
S 135/11	W	18	mk	Westfäl. WB	n.b.	GP	800	190	0,02	Lymphom
S 152/11	W	12	m	Friese	E	GP	600	120	0,020	Metastasierendes Seminom, multiple Nervenzelldegeneration der Großhirnrinde
S 153/11	W	11	w	Shetlandpony	E	Pony	100	70	0,07	Meningoenzephalitis, Borna
S 164/11	W	14	w	Argent. Paso Fino	E	GP	450	170	0,04	Nervenzelldegenerationen
S 186/11	W	6	w	Hannoveraner WB	E	GP	600	200	0,03	Degeneration motorische Bahnen
S 191/11	W	3,5	mk	WB	n.b.	GP	n.b.	210		Meningitis, Vaskulitis

Sektionsnummer	Saison	Alter in Jahren	Geschlecht	Rasse	Todesart	Ordnung	Körpergewicht [kg]	Epiphysengewicht [mg]	Epiphysengewicht *10 <sup>-3</sup> [%]	Diagnose
S 197/11	W	20	w	WB	E	GP	550	220	0,04	Hufrehe hi.li., Cushing, Nervenzelldegeneration Großhirnrinde
S 198/11	W	8	w	Friese		GP	650	n.b.		Multinoduläre pulmonale Fibrose, Hautveränderungen, malignes Lymphom
S 251/11	W	16	mk	Haflinger	E	Pony	530	160	0,03	Beugesehnenentzündung
S 273/11	F	1	m	Haflinger	E	Pony	350	120	0,03	Hgr. hämorr. Myelomalazie, chron. Magenulzera, interst. Pneumonie
S 274/11	F	15	mk	Tinker	T	GP	n.b.	230		HerzKreislaufversagen, Vergiftung mit Monensin
S 367/11	F	26	mk	Camargue	E	GP	400	100	0,03	Bornavirusinfektion
S 390/11	F	10	mk	WB	E	GP	600	130	0,02	entz. Veränderungen Darm & Peritoneum
S 458/11	F	1	m	Shire Horse	T	GP	690	n.b.		Chron. equine Dysautonomie (Grass Sickness)

Sektionsnummer	Saison	Alter in Jahren	Geschlecht	Rasse	Todesart	Ordnung	Körpergewicht [kg]	Epiphysengewicht [mg]	Epiphysengewicht *10 <sup>-3</sup> [%]	Diagnose
S 593/11	S	n.b.	w	n.b.		GP	480	n.b.		HerzKreislaufversagen, Kieferhöhlenentzündung
S 619/11	S	12	w	Quarter Horse	T	GP	550	n.b.		Zwerchfellhernie mit Dünndarminkarzeration
S 941/11	H	6	mk	Oldenb. WB	E	GP	550	n.b.		hgr. Enteritis, nekr. Typhlokolitis
S 84/12	W	3	m	Friese	T	GP	650	n.b.		Aortenabriss
S 87/12	W	24	w	KB Mix	n.b.	GP	480	n.b.		Metastasierendes Mamma- Adenokarzinom
S 97/12	W	6	W	Lipizzaner	E	n.b.	300	n.b.		Enteritis, chron. Gastritis, multiple Magenulzera, chron. Peritonitis

## 11.6 Ergebnisse der histologischen Untersuchung

(0: ohne Befund, 1: geringgradig, 2: mittelgradig, 3: hochgradig)

Sektionsnummer	Postmortale Veränderungen		Pigment		Entzündungszeichen		
	frei Lymphozyten am Rand	freie Erythrozyten am Rand	Helles Pigment (Lipofuscin)	Dunkles Pigment (Melanin/Hämosiderin)	Hyperämie	betont perivaskuläre lymphoplasmazelluläre Infiltration	unter Beteiligung von Makrophagen
S 859/08	1	3	0	1	1	2	0
S 957/08	0	1	1	1	1	1	0
S 990/08	0	1	0	1	0	0	0
S 1095/08	0	1	0	1	0	0	0
S 1133/08	0	1	0	3	1	1	0
E 2857/08	1	1	1	1	1	2	1
S 424/09	0	1	1	1	0	0	0
S 505/09	0	0	0	2	0	0	0
E 558/09	0	1	1	1	1	1	0
S 580/09	0	1	1	1	0	0	0
S 597/09	0	2	0	1	0	0	0
S 600/09	1	1	2	1	1	2	0
E603/09	1	1	0	1	0	0	0
S 604/09	0	0	0	1	0	0	0

Sektionsnummer	Postmortale Veränderungen		Pigment		Entzündungszeichen		
	frei Lymphozyten am Rand	freie Erythrozyten am Rand	Helles Pigment (Lipofuscin)	Dunkles Pigment (Melanin/Hämosiderin)	Hyperämie	betont perivaskuläre lymphoplasmazelluläre Infiltration	unter Beteiligung von Makrophagen
S 608/09	1	1	1	1	0	0	0
S 642/09	1	1	0	1	0	0	0
S 656/09	3	1	0	1	1	1	0
S 706/09	1	2	0	2	1	1	0
S 707/09	1	1	0	1	0	0	0
S 714/09	1	1	1	1	1	1	0
S 765/09	0	1	1	1	0	0	0
S 776/09	1	3	0	3	0	1	0
S 785/09	2	1	2	1	1	2	1
S 800/09	1	1	1	1	0	0	0
S 822/09	1	1	1	2	2	1	0
S 840/09	0	1	1	1	0	0	0
S 874/09	0	2	0	2	0	0	0
S 885/09	0	1	1	2	0	0	0
S 897/09	0	1	1	1	1	1	0
S 898/09	0	1	0	3	0	0	0

Sektionsnummer	Postmortale Veränderungen		Pigment		Entzündungszeichen		
	frei Lymphozyten am Rand	freie Erythrozyten am Rand	Helles Pigment (Lipofuscin)	Dunkles Pigment (Melanin/Hämosiderin)	Hyperämie	betont perivaskuläre lymphoplasmazelluläre Infiltration	unter Beteiligung von Makrophagen
S 971/09	0	1	0	1	0	0	0
S 974/09	0	1	0	2	1	1	0
S 1078/09	0	0	0	1	1	1	0
S 1088/09	0	1	0	1	0	0	0
S 1099/09	1	1	0	1	0	0	0
S 1124/09	0	2	0	1	0	0	0
S 1128/09	0	1	0	3	1	1	0
S 1137/09	0	1	0	2	0	0	0
S 1142/09	2	2	1	1	1	2	1
S 1143/09	0	1	0	2	2	1	0
S 1204/09	0	0	0	3	1	1	0
S 1205/09	0	1	0	2	0	0	0
S 1219/09	0	0	0	1	1	1	0
S 1241/09	1	1	0	1	0	1	0
S 1244/09	0	1	0	1	0	1	0
S 1248/09	1	2	0	1	2	3	0

Sektionsnummer	Postmortale Veränderungen		Pigment		Entzündungszeichen		
	frei Lymphozyten am Rand	freie Erythrozyten am Rand	Helles Pigment (Lipofuscin)	Dunkles Pigment (Melanin/Hämosiderin)	Hyperämie	betont perivaskuläre lymphoplasmazelluläre Infiltration	unter Beteiligung von Makrophagen
S 859/08	1	3	0	1	1	2	0
S 957/08	0	1	1	1	1	1	0
S 990/08	0	1	0	1	0	0	0
S 1095/08	0	1	0	1	0	0	0
S 1133/08	0	1	0	3	1	1	0
E 2857/08	1	1	1	1	1	2	1
S 424/09	0	1	1	1	0	0	0
S 505/09	0	0	0	2	0	0	0
E 558/09	0	1	1	1	1	1	0
S 580/09	0	1	1	1	0	0	0
S 597/09	0	2	0	1	0	0	0
S 600/09	1	1	2	1	1	2	0
E603/09	1	1	0	1	0	0	0
S 604/09	0	0	0	1	0	0	0
S 608/09	1	1	1	1	0	0	0
S 642/09	1	1	0	1	0	0	0

Sektionsnummer	Postmortale Veränderungen		Pigment		Entzündungszeichen		
	frei Lymphozyten am Rand	freie Erythrozyten am Rand	Helles Pigment (Lipofuscin)	Dunkles Pigment (Melanin/Hämosiderin)	Hyperämie	betont perivaskuläre lymphoplasmazelluläre Infiltration	unter Beteiligung von Makrophagen
S 656/09	3	1	0	1	1	1	0
S 706/09	1	2	0	2	1	1	0
S 707/09	1	1	0	1	0	0	0
S 714/09	1	1	1	1	1	1	0
S 765/09	0	1	1	1	0	0	0
S 776/09	1	3	0	3	0	1	0
S 785/09	2	1	2	1	1	2	1
S 800/09	1	1	1	1	0	0	0
S 822/09	1	1	1	2	2	1	0
S 840/09	0	1	1	1	0	0	0
S 874/09	0	2	0	2	0	0	0
S 885/09	0	1	1	2	0	0	0
S 897/09	0	1	1	1	1	1	0
S 898/09	0	1	0	3	0	0	0
S 1277/09	1	1	0	1	0	1	0
S 1283/09	0	0	0	3	0	0	0

Sektionsnummer	Postmortale Veränderungen		Pigment		Entzündungszeichen		
	frei Lymphozyten am Rand	freie Erythrozyten am Rand	Helles Pigment (Lipofuscin)	Dunkles Pigment (Melanin/Hämosiderin)	Hyperämie	betont perivaskuläre lymphoplasmazelluläre Infiltration	unter Beteiligung von Makrophagen
S 1299/09	0	1	1	1	0	0	0
S 2/10	0	1	0	3	2	1	0
S 18/10	0	1	0	2	0	0	0
S 77/10	0	2	1	1	1	1	0
S 80/10	0	1	0	1	3	2	0
S 107/10	0	1	1	1	0	0	0
S 140/10	0	1	1	1	0	0	0
S 158/10	1	1	1	1	0	0	0
S 159/10	0	1	0	2	1	0	0
S 160/10	0	1	1	1	1	1	0
S 168/10	1	1	1	1	1	1	1
S 204/10	0	1	1	2	0	0	0
S 219/10	0	3	0	2	0	0	0
S 220/10	0	1	1	1	0	0	0
S 265/10	0	1	0	1	0	0	0
S 275/10	0	1	1	1	0	0	0

Sektionsnummer	Postmortale Veränderungen		Pigment		Entzündungszeichen		
	frei Lymphozyten am Rand	freie Erythrozyten am Rand	Helles Pigment (Lipofuscin)	Dunkles Pigment (Melanin/Hämosiderin)	Hyperämie	betont perivaskuläre lymphoplasmazelluläre Infiltration	unter Beteiligung von Makrophagen
S 287/10	0	2	2	1	1	1	0
S 296/10	0	1	2	3	2	1	0
S 303/10	0	0	0	3	0	0	0
S 304/10	0	0	0	1	0	0	0
S 321/10	0	1	1	2	1	0	0
S 329/10	0	2	1	2	1	1	0
S 330/10	0	1	0	3	1	1	0
S 367/10	0	1	1	1	1	2	0
S 405/10	3	1	1	1	2	3	1
S 410/10	1	2	0	1	0	0	0
S 411/10	0	2	1	2	3	1	0
S 425/10	0	0	1	1	1	1	0
S 463/10	0	0	0	1	0	0	0
S 546/10	1	3	1	2	0	0	0
S 655/10	0	0	1	2	0	0	0
S 673/10	0	1	1	2	0	0	0

Sektionsnummer	Postmortale Veränderungen		Pigment		Entzündungszeichen		
	frei Lymphozyten am Rand	freie Erythrozyten am Rand	Helles Pigment (Lipofuscin)	Dunkles Pigment (Melanin/Hämosiderin)	Hyperämie	betont perivaskuläre lymphoplasmazelluläre Infiltration	unter Beteiligung von Makrophagen
S 699/10	0	2	0	2	0	0	0
S 722/10	0	1	1	1	1	1	0
S 735/10	0	1	0	1	0	0	0
S 785/10	0	1	0	2	1	1	0
S 805/10	1	1	0	2	1	2	0
S 837/10	1	1	1	2	1	1	0
S 913/10	1	1	0	1	0	0	0
S 993/10	1	1	0	1	0	0	0
S 1089/10	0	1	0	1	0	0	0
S 1210/10	0	2	0	2	1	1	0
S 1281/10	0	1	1	1	1	1	0
S 1287/10	0	1	1	1	0	0	0
E2153/10	1	1	0	1	0	1	0
S 4/11	1	3	1	1	0	0	0
S 6/11	0	1	0	2	0	0	0
S 13/11	1	1	1	2	1	1	0

Sektionsnummer	Postmortale Veränderungen		Pigment		Entzündungszeichen		
	frei Lymphozyten am Rand	freie Erythrozyten am Rand	Helles Pigment (Lipofuscin)	Dunkles Pigment (Melanin/Hämosiderin)	Hyperämie	betont perivaskuläre lymphoplasmazelluläre Infiltration	unter Beteiligung von Makrophagen
S 93/11	0	1	0	1	1	1	0
S 108/11	1	1	0	2	1	1	0
S 135/11	0	1	2	1	0	0	0
S 152/11	0	1	1	1	0	0	0
S 153/11	1	1	0	1	1	2	1
S 164/11	0	2	1	1	2	1	0
S 186/11	0	1	1	1	0	0	0
S 191/11	0	1	0	1	1	1	0
S 197/11	0	1	1	1	0	0	0
S 198/11	0	0	1	2	0	0	0
S 251/11	1	2	1	1	0	0	0
S 273/11	0	2	0	2	0	0	0
S 274/11	1	3	1	1	1	1	0
S 28/11	0	1	0	1	0	0	0
S 367/11	0	1	1	3	1	1	0
S 390/11	1	1	1	1	1	1	0

Sektionsnummer	Postmortale Veränderungen		Pigment		Entzündungszeichen		
	frei Lymphozyten am Rand	freie Erythrozyten am Rand	Helles Pigment (Lipofuscin)	Dunkles Pigment (Melanin/Hämosiderin)	Hyperämie	betont perivaskuläre lymphoplasmazelluläre Infiltration	unter Beteiligung von Makrophagen
S 458/11	0	0	0	1	1	1	0
S 593/11	1	1	0	3	1	0	0
S 619/11	0	1	1	2	0	0	0
S 941/11	0	1	0	2	0	0	0
S 84/12	0	1	1	2	0	0	0
S 87/12	0	1	1	2	0	0	0
S 97/12	0	1	0	1	0	0	0

## 11.7 Ergebnisse der stereologischen Untersuchung

( $V_V(\text{Pin}/\text{Epi})$ ): Volumendichte,  $V$ : Volumen,  $M$ : Masse)

Sektionsnummer	$V_V(\text{Pin}/\text{Epi})$ (Pinealzellen) [%]	$V_V(\text{Pin}/\text{Epi})$ (Pinealzellen)	$V(\text{Pin}, \text{Epi})$ Pinealzellen [ $\text{cm}^3$ ]	$M(\text{Pin}, \text{Epi})$ Pinealzellen [mg]	$V_V(\text{Pig}/\text{Epi})$ Pigment [%]	$V_V(\text{Bgw}/\text{Epi})$ Bindegewebe [%]
S 957/08	56	0,56	0,12	1,23	0,70	36
S 990/08	65	0,65	0,07	0,71	0,26	32
S 1095/08	59	0,59	0,03	0,29	2,80	28
S 1133/08	69	0,69	0,15	1,59	0,74	26
E 2857/08	67	0,67	0,07	0,74	0,16	31
S 424/09	69	0,69	0,08	0,82	2,22	23
S 505/09	68	0,68	0,19	1,99	0,23	30
S 580/09	63	0,63	0,10	1,08	0,24	26
S 597/09	60	0,60	0,12	1,27	0,00	30
S 600/09	76	0,76	0,26	2,74	1,04	21
S 604/09	70	0,70	0,07	0,77	0,43	28
S 608/09	65	0,65	0,15	1,56	0,70	32
S 642/09	75	0,75	0,14	1,49	2,42	17
S 656/09	73	0,73	0,10	1,02	0,00	27
S 714/09	63	0,63	0,06	0,63	1,34	21
S 785/09	55	0,55	0,06	0,66	0,22	40
S 800/09	60	0,60	0,03	0,30	0,41	35
S 822/09	61	0,61	0,11	1,22	0,66	34
S 840/09	75	0,75	0,11	1,20	1,66	21
S 874/09	67	0,67	0,11	1,14	1,44	31
S 885/09	59	0,59	0,12	1,23	1,20	36
S 897/09	64	0,64	0,12	1,28	0,93	28
S 974/09	77	0,77	0,12	1,23	1,23	17
S 1078/09	80	0,80	0,04	0,40	0,17	15
S 1088/09	66	0,66	0,09	0,93	0,85	25
S 1099/09	73	0,73	0,09	0,95	1,01	22
S 1124/09	63	0,63	0,09	0,94	0,64	30

Sektionsnummer	V <sub>V(Pin/Epi)</sub> (Pinealzellen) [%]	V <sub>V(Pin/Epi)</sub> (Pinealzellen)	V <sub>(Pin, Epi)</sub> Pinealzellen [cm <sup>3</sup> ]	M <sub>(Pin, Epi)</sub> Pinealzellen [mg]	V <sub>V(Pig/Epi)</sub> Pigment [%]	V <sub>V(Bgw/Epi)</sub> Bindegewebe [%]
S 1128/09	67	0,67	0,11	1,21	3,52	19
S 1137/09	72	0,72	0,09	0,93	2,38	20
S 1143/09	64	0,64	0,15	1,59	1,72	34
S 1204/09	75	0,75	0,11	1,13	1,95	19
S 1205/09	63	0,63	0,07	0,76	0,81	34
S 1219/09	71	0,71	0,09	0,92	0,00	28
S 1244/09	64	0,64	0,11	1,22	0,10	34
S 1277/09	69	0,69	0,26	2,76	1,10	27
S 1283/09	69	0,69	0,07	0,69	1,08	24
E 558/09	71	0,71	0,19	1,98	0,28	27
E603/09	60	0,60	0,14	1,44	0,14	39
S 18/10	51	0,51	0,02	0,26	0,78	41
S 77/10	66	0,66	0,16	1,65	0,38	31
S 107/10	63	0,63	0,05	0,50	1,28	29
S 140/10	77	0,77	0,14	1,53	0,12	22
S 158/10	65	0,65	0,16	1,69	7,01	25
S 159/10	64	0,64	0,10	1,03	2,66	30
S 160/10	57	0,57	0,06	0,68	1,09	40
S 168/10	55	0,55	0,07	0,77	0,29	37
S 204/10	62	0,62	0,11	1,17	0,92	34
S 220/10	61	0,61	0,14	1,47	0,14	36
S 265/10	71	0,71	0,09	0,93	0,60	24
S 275/10	50	0,50	0,15	1,61	0,19	47
S 296/10	61	0,61	0,09	0,92	5,45	28
S 321/10	86	0,86	0,15	1,64	0,43	12
S 329/10	61	0,61	0,12	1,23	1,60	32
S 367/10	58	0,58	0,05	0,52	0,00	35
S 405/10	77	0,77	0,10	1,07	0,15	21
S 411/10	72	0,72	0,09	0,94	0,39	22
S 425/10	70	0,70	0,10	1,05	0,96	25

Sektions- nummer	V <sub>V(Pin/Epi)</sub> (Pinealzel- len) [%]	V <sub>V(Pin/Epi)</sub> (Pinealzel- len)	V <sub>(Pin, Epi)</sub> Pinealzell- en [cm <sup>3</sup> ]	M <sub>(Pin, Epi)</sub> Pinealzell- en [mg]	V <sub>V(Pig/Epi)</sub> Pigment [%]	V <sub>V(Bgw/Epi)</sub> Bindegew- ebe [%]
S 673/10	53	0,53	0,07	0,79	0,98	34
S 699/10	76	0,76	0,11	1,14	0,00	22
S 785/10	71	0,71	0,08	0,86	1,59	25
S 805/10	68	0,68	0,10	1,02	1,16	25
S 837/10	53	0,53	0,08	0,90	4,19	36
S 913/10	76	0,76	0,11	1,15	0,75	20
S 993/10	66	0,66	0,05	0,53	0,00	28
S 1089/10	61	0,61	0,14	1,52	1,59	34
S 1287/10	70	0,70	0,12	1,26	1,38	26
S 4/11	71	0,71	0,10	1,07	0,56	25
S 13/11	67	0,67	0,12	1,28	1,38	27
S 93/11	72	0,72	0,18	1,87	0,09	24
S 135/11	71	0,71	0,13	1,34	0,22	27
S 153/11	81	0,81	0,05	0,56	0,00	14
S 164/11	69	0,69	0,11	1,17	0,00	28
S 186/11	73	0,73	0,14	1,45	0,12	23
S 251/11	73	0,73	0,11	1,17	0,91	21
S 367/11	42	0,42	0,04	0,42	9,87	47
S 390/11	76	0,76	0,09	0,98	0,16	22

## 12 DANKSAGUNG

Ein herzliches Dankeschön an meine Betreuerin Dr. Nadja Herbach für die Überlassung meines Dissertationsthemas, die herausragende Betreuung dieser Arbeit sowie für ihre Geduld, Hilfsbereitschaft und Zeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Hermanns für seine Hilfestellung bei der Anfertigung des Bildmaterials.

Prof. Dr. Kaspar Matiasek danke ich für die Hilfsbereitschaft bei organisatorischen und wissenschaftlichen Fragen. Sowie allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Tierpathologie, die mir bei Fragen weitergeholfen haben.

Ich möchte mich bei allen MitarbeiterInnen des Institute of Lung Biology and Disease (ILBD) and the Comprehensive Pneumology Center (CPC) des Helmholtz Zentrums München insbesondere bei Dr. Thomas Conlon für die Bereitstellung ihres Bildanalysesystem bedanken.

Für die statistische Beratung danke ich Dr. rer. nat. Alexander Tichy.

Mein ganz besonderer Dank aber gilt meinen Eltern, Helga und Erwin Ettl sowie meinen Großeltern, Maria<sup>†</sup> und Egon Ettl, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglichten und denen ich diese Arbeit widme.