

Aus dem Institut für Tieranatomie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Tieranatomie II,
insbesondere Allgemeine Anatomie,
Histologie und Embryologie
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz

ULTRASTRUKTURELLE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE
UNTERSUCHUNGEN
AM NEBENHODEN DES KATERS (*Felis silvestris "familiaris"*)

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

von
Tina Ruff
aus
München

München 2005

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. F. Sinowatz

Koreferentin: Univ.-Prof. Dr. K. Hartmann

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

Für Maximilian Anton

1	Einleitung	6
2	Literaturübersicht	9
2.1	Nebenhoden	9
2.1.1	Anatomie	9
2.1.2	Histologie	10
2.1.3	Embryologie.....	12
2.1.4	Funktion des Nebenhodens.....	12
2.2	Bedeutung und Vorkommen von Wachstumsfaktoren allgemein.....	17
2.2.1	Vascular endothelial growth factor (VEGF) und seine Rezeptoren.....	17
2.2.1.1	VEGF- Eigenschaften	17
2.2.1.2	Funktionen	19
2.2.1.3	Steuerung	20
2.2.1.4	Rezeptoren	21
2.2.1.5	Bedeutung von VEGF bei physiologischen und pathologischen Vorgängen in verschiedenen Organen	23
2.2.1.6	Vorkommen von VEGF im Nebenhoden.....	24
2.2.1.6.1	Physiologische Verteilung von VEGF im Nebenhoden des Menschen	24
2.2.1.6.2	Überexpression von VEGF und Unfruchtbarkeit	25
2.3	Growth hormone receptor (GHR).....	26
2.4	Cytokeratin und Vimentin.....	28
2.5	Laminin	30
2.6	Smooth muscle actin (SMA)	30
2.7	Androgen- Rezeptor	31
2.8	Östrogen- Rezeptor	32
2.9	Progesteron- Rezeptor.....	33

3	Material und Methodik.....	34
3.1	Untersuchungsmaterial	34
3.2	Lichtmikroskopie	34
3.2.1	Färbungen	35
3.2.1.1	Hämalaun-Eosin-Färbung (HE)	35
3.2.1.2	Trichromfärbung nach Masson und Goldner.....	35
3.2.1.3	PAS-Reaktion	36
3.2.1.3.1	PAS- Reaktion nach McManus.....	36
3.2.1.3.2	PAS- Reaktion mit Amylase.....	36
3.2.1.4	Alcianblau-Färbung.....	36
3.3	Elektronenmikroskopie	37
3.4	Immunhistologie	38
4	Ergebnisse	42
4.1	Lichtmikroskopische Untersuchung am Nebenhoden des Katers.....	42
4.1.1	Ductuli efferentes.....	45
4.1.2	Segment 1 des Ductus epididymidis.....	50
4.1.3	Segment 2 des Ductus epididymidis.....	52
4.1.4	Segment 3 des Ductus epididymidis.....	54
4.1.5	Segment 4 des Ductus epididymidis.....	55
4.1.6	Segment 5 des Ductus epididymidis.....	58
4.2	Elektronenmikroskopische Untersuchung am Nebenhoden des Katers	61
4.2.1	Ductuli efferentes.....	61
4.2.2	Ultrastruktur von Segment 1	67
4.2.3	Ultrastruktur von Segment 2	74
4.2.4	Ultrastruktur von Segment 3	80
4.2.5	Ultrastruktur von Segment 4	86
4.2.6	Ultrastruktur von Segment 5	91

4.3	Immunhistochemische Untersuchung des Nebenhodens	97
4.3.1	Immunhistochemischer Nachweis von "Vascular endothelial growth factor " (VEGF) im Nebenhoden des Katers	98
4.3.2	Immunhistochemischer Nachweis von VEGF-Rezeptor (KDR) im Nebenhoden des Katers	100
4.3.3	Immunhistochemischer Nachweis von "Growth hormone receptor" (GHR) im Nebenhoden des Katers	102
4.3.4	Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin im Nebenhoden des Katers	104
4.3.5	Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin im Nebenhoden des Katers	106
4.3.6	Immunhistochemischer Nachweis von Laminin im Nebenhoden des Katers	108
4.3.7	Immunhistochemischer Nachweis von "α- smooth muscle actin" (SMA) im Nebenhoden des Katers	110
4.3.8	Immunhistochemischer Nachweis von Androgen-Rezeptor im Nebenhoden des Katers	112
4.3.9	Immunhistochemischer Nachweis von Östrogen- Rezeptor im Nebenhoden des Katers	114
4.3.10	Immunhistochemischer Nachweis von Progesteron- Rezeptor im Nebenhoden des Katers	116
5	Diskussion	119
6	Zusammenfassung	129
7	Summary	131
8	Literaturverzeichnis	133
9	Anhang	150
10	Danksagung	154
11	Lebenslauf	155

1 EINLEITUNG

Die Anatomie des Nebenhodens wurde schon von Aristoteles (400 v.Chr.) untersucht, seine Funktion war jedoch lange unbekannt und auch heute sind viele funktionelle Aspekte und Zusammenhänge noch unklar.

Schon sehr früh wurde allerdings vermutet, dass der Nebenhoden die darin befindlichen Spermien verändert.

Im 17. Jahrhundert erkannte de Graaf, dass aus dem Nebenhodenkopf gewonnenes Sperma wässrige Konsistenz besitzt, das aus dem Nebenhodenschwanz jedoch milchige (Jocelyn und Setchell, 1972). Er schloss daraus, dass das Sperma sich bei seiner Passage durch den Nebenhoden verändert und eventuell verdichtet.

Tournade gewann 1913 von verschiedenen Stellen des Nebenhodens Spermien und stellte fest, dass proximal entnommene unbeweglich waren, Samenzellen aus dem distalen Anteil aber volle Motilität besaßen.

Kurze Zeit später erfolgte zum ersten Mal eine genaue histologische, zytologische und anatomische Beschreibung der Epididymis (Benoit, 1926). Dabei wurde auch ein Zusammenhang zwischen Nebenhoden, Hoden, der Ausschüttung von Hormonen und des Überlebens von Spermien erkannt (Benoit, 1926).

Bezüglich der Überlebensdauer von Spermienzellen kamen Anfang des letzten Jahrhunderts viele Forscher unabhängig voneinander zu dem Ergebnis, dass diese bei allen Säugetieren im Nebenhodenschwanz ein bis mehrere Monate beträgt. Zu dieser Erkenntnis kam man durch Ligatur der Ductuli efferentes bei Fledermäusen, Kaninchen und Bullen (Orgebin-Crist, 1998).

Young begann 1929 mit seiner Forschung über die künstliche Befruchtung von Meerschweinchen. Dabei stellte er fest, dass er mit aus dem proximalen Nebenhoden gewonnenen Spermien weitaus schlechtere Befruchtungsergebnisse erzielte als mit Samenzellen aus dem Nebenhodenschwanz. Damit hatte er nachgewiesen, dass Spermien während der Nebenhodenpassage nicht nur ihre Motilität, sondern auch ihre Befruchtungsfähigkeit erlangen.

In den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts war es erstmals möglich, in Spermien-DNA radioaktive Isotope zu inkorporieren. Mit dieser Methode konnte man

feststellen, dass bei allen untersuchten Säugetier-Spezies die Passagezeit durch den Nebenhoden im Schnitt zehn bis zwölf Tage beträgt (Orgebin-Crist, 1967).

Zur gleichen Zeit konnte endgültig nachgewiesen werden, dass die Spermien ihre Fähigkeit zur Vorwärtsmotilität und Befruchtung von Eizellen erst durch die Passage des Nebenhodens erhielten. Dabei ist das entscheidende Kriterium für die Reifung nicht, wie zuvor angenommen, die Zeit, sondern vielmehr das Milieu des Nebenhodengewebes (Bedford, 1967).

Durch den Fortschritt der Chirurgie in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde die Vasoepididymostomie möglich (Silber, 1989). Dadurch konnten selektiv Spermien aus der proximalen Epididymis sowie aus den Ductuli efferentes gewonnen werden. Mit diesen Samenzellen wurden erfolgreich künstliche Befruchtungen durchgeführt. Damit stellte sich die Frage, welche Bedeutung die Reifungsvorgänge im Nebenhoden haben könnten (Silber, 1989).

Die Verfügbarkeit von molekularbiologischen Techniken eröffnete eine neue Ära in den Untersuchungen der Funktionen des Epididymis. Seit der Isolierung der c-DNA der Proteine des Nebenhodensekrets wurden viele Funktionen und Zusammenhänge wie z.B. die Androgen-Abhängigkeit der Spermienentwicklung und - motilität klarer definiert (Brooks et al., 1986).

Seit 1966 wurden weltweit ca. 21000 Artikel über den Nebenhoden veröffentlicht. Dennoch bestehen in unserem Wissen um den Nebenhoden immer noch erhebliche Lücken, zumal auch tierartspezifische Besonderheiten berücksichtigt werden müssen.

Speziell am Nebenhoden des Katers wurden seit den 70er Jahren verschiedene Studien zum Beispiel über die Histochemie von Glykosidasen (Skolek-Winnisch, Sinowatz et al., 1979), die Ultrastruktur (Viotto et al., 1993), Elektronenmikroskopie der Hauptzellen (Morales et al., 1991) und die altersabhängigen Veränderungen des Nebenhodenepithels (Elcock et al., 1984) durchgeführt.

Mehr als dem Nebenhoden an sich galt das Interesse den daraus gewonnenen Spermien, die nach Einfrieren in verschiedenen Medien auf die Effekte von motilitätsfördernden Stoffen auf die Samenzellen (Stachecki et al. 1994) oder deren Kapazitation (Hay et al., 1993) untersucht wurden.

Andere Arbeiten beschäftigten sich mit im Sperma enthaltenen Substanzen (Axner et al., 2002; Buff et al., 2001) oder der Morphologie der Samenzellen aus verschiedenen Regionen des Nebenhodens (Axner et al., 1999) bzw. deren Unterschiede bei verschiedenen Gewinnungsmethoden (Axner et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit sollen bereits vorhandene Befunde über den Nebenhoden des Katers durch neue Ergebnisse ergänzt werden. Es wurde deshalb mit lichtmikroskopischen, ultrastrukturellen und immunhistochemischen Methoden die funktionelle Morphologie des Nebenhodens des Katers untersucht.

2 Literaturübersicht

2.1. Nebenhoden

2.1.1. Anatomie

Der Nebenhoden lässt sich schon makroskopisch in Nebenhodenkopf (Caput), Nebenhodenkörper (Corpus) und Nebenhodenschwanz (Cauda) unterteilen (Chandler et al., 1981, Nickel et al., 2004). Außen ist er von der Tunica albuginea umgeben, die vom visceralen Blatt der Tunica vaginalis bedeckt ist (Wrobel, 1990).

Der Nebenhoden ist dem Hoden in Längsrichtung angelagert und mit ihm verwachsen, bzw. durch das Mesepididymis mit ihm verbunden. Zwischen beiden Organen liegt die mit Peritoneum ausgekleidete Bursa testicularis.

Aus dem Rete testis des Hodens werden tierartsspezifisch zwischen 8 und 25 Ductuli efferentes entlassen (Wrobel, 1990), die die Tunica albuginea durchbrechen und mit dem Anfangsabschnitt des Nebenhodenkanals den Nebenhodenkopf bilden. Hier legen sie sich geschlängelt innerhalb bindegewebiger Läppchen (Liebich, 1990), den sogenannten Lobuli (Nickel et al., 2004) bzw. dem Conus vasculosus (Wrobel, 1990) zusammen. Die Lobuli werden von einem dichten Kapillarnetz begleitet (Liebich, 1990).

Durch Zusammenfluss der Ductuli efferentes entsteht der Nebenhodenkanal (Ductus epididymidis), der in Schlingen gelegt den distalen Nebenhodenkopf, den Nebenhodenkörper und -schwanz bildet und dann in den Samenleiter übergeht.

Dieser stellt die unmittelbare Fortsetzung des Nebenhodengangs und die Verbindung mit der Harnröhre dar. Der Samenleiter beginnt am Nebenhodenschwanz und läuft medial des Hodens über die ganze Länge bauchhöhlenwärts. Er bildet zusammen mit anderen Strukturen wie Nerven und Blutgefäßen den Funiculus spermaticus oder Samenstrang (Nickel et al., 2004).

Verbunden ist der Epididymis an der Cauda durch das Ligamentum testis proprium mit dem caudalen Hodenanteil, bzw. durch das Ligamentum caudae epididymidis mit dem Processus vaginalis.

Beim Kater ist der Hoden nicht auf ganzer Länge mit dem Nebenhoden verwachsen, sondern im Bereich des Corpus nur locker durch das Mesepididymis verbunden. Er

besitzt zwischen 14 und 17 (Hemeida et al., 1978) bzw. 15 und 18 (Nickel et al., 2004) Ductuli efferentes. Der gesamte Nebenhodenkanal des Katers ist gestreckt zwischen 1,5 und 3 Metern lang (Nickel et al., 2004).

2.1.2. Histologie

Die Ductuli efferentes liegen eingebettet in gefäßreiches Bindegewebe (Nickel et al., 2004). Sie besitzen ein mehrreihiges Epithel, das aus hochprismatischen Hauptzellen, Zilienzellen mit längsovalen Kernen und möglicherweise Basalzellen besteht. Die Kerne der Zilienzellen befinden sich hauptsächlich im apikalen Bereich des Epithels, die der Hauptzellen in der basalen Hälfte. Die luminalen Apices der Hauptzellen haben je nach Resorptionsaktivität eine unterschiedliche Form. Sie können Mikrovilli oder auch große Protrusionen besitzen. Subapikal finden sich Vakuolen und „coated vesicles“ (Wrobel, 1990). Die Basalzellen können große Mengen Glykogen enthalten, scheinen aber sonst relativ inaktiv zu sein (Chandler et al., 1981).

Von den Hauptzellen der Ductuli efferentes und dem Anfangsabschnitt des Nebenhodenkanals werden 90% der im Hoden gebildeten Flüssigkeit resorbiert (Sinowatz, 1992).

Außen an die Basallamina schließt eine dünne Schicht glatter Muskelzellen an.

Der Ductus epididymidis hat ebenfalls eine aus glatten Muskelzellen bestehende Wand und ist innen von einem durchgehend zweireihigen Epithel ausgekleidet. Er besteht aus hochprismatischen Hauptzellen mit Stereozilien, die zu Büscheln verklebt sind, sowie kleinen, rundlichen oder dreieckigen zytoplasmaarmen Basalzellen, deren Zellkerne tiefe Invaginationen zeigen können. Diese Zellen haben die Fähigkeit zur Mikropinozytose.

Die Hauptzellen haben eine Länge von bis zu 130 µm und besitzen einen Stereoziliensaum von ca. 20 µm Länge. Sie gehören somit zu den höchsten Epithelzellen des Körpers. Miteinander sind sie durch „Junctional complexes“ der seitlichen Zellmembran verzahnt. In der apikalen Region finden sich wiederum Organellen mit pinozytotischer Tätigkeit, sowie kernnah ein großer Golgi-Apparat. Infranukleär und basal des Kerns kommen hauptsächlich Lysosomen, Mitochondrien

und Granula vor. Endoplasmatisches Retikulum und Einschlusskörperchen liegen überall im Zytoplasma verteilt (Wrobel, 1990).

Außerdem fallen in allen Abschnitten des Nebenhodens Apikalzellen, Makrophagen sowie intraepitheliale Lymphozyten auf, die auch als Halo-Zellen bezeichnet werden. Die Höhe des Epithels wird im Verlauf des Ductus epididymidis geringer, der Lumendurchmesser sowie die Dicke der angelagerten Muskelschicht nehmen nach distal hin zu.

Der Ductus deferens besitzt eine derb-muskulöse Wand mit oft dreischichtiger Muskulatur. Die Schleimhaut besteht aus einem mehrreihigen hochprismatischen Epithel. Die Ampulla des Samenleiters besitzt Schlauchdrüsen, die ein zähes Sekret produzieren, das den Ductus deferens in die akzessorischen Geschlechtsdrüsen eingliedert (Nickel et al., 2004).

Anhand histologischer Kriterien wie der Zellausstattung, der Länge der Stereozilien, der Epithelhöhe, des Lumendurchmessers, der Kernlage und -form (Reid et al., 1957) oder der unterschiedlichen sekretorischen Aktivität, lässt sich der Nebenhoden in verschiedene Abschnitte einteilen, die sich sowohl morphologisch als auch funktionell deutlich unterscheiden.

So findet man beim Affen (Ramos et al., 1977) und beim Hund vier (Chandler et al., 1981), beim Hamster (Calvo et al., 1995), und bei der Maus fünf (Abou-Haila et al., 1984), beim Eber (Wrobel et al., 1974), Hengst, Bullen und Schafbock sechs (Nicander, 1958), beim Meerschweinchen sieben (Greenberg, 1979) beim Menschen acht (Holstein, 1969) und bei der Ratte neun (Zunke et al., 1981) Segmente.

Beim Kater werden vier (Sanchez et al., 1998) bzw. fünf (Prem, 1992) angegeben. Der Unterschied besteht darin, dass Prem (1992) den Corpusabschnitt unterteilt, wohingegen er von Sanchez et al. als eine Region gesehen wird. Prem (1992) hat festgestellt, dass das Epithel in der Hälfte des Corpus etwas niedriger ist. Außerdem sind die Stereozilien deutlich kürzer und tiefe Epitheleinbuchtungen ergeben ein nur für dieses Segment typisches Bild intraepithelialer Hohlräume, in die Stereozilien hineinragen.

Sanchez et al. (1998) kamen zu dem Ergebnis, dass das gesamte Corpus-Segment dem ersten des Caput epididymidis aus histologischer Sicht sehr ähnlich ist.

2.1.3. Embryologie

Die Urnierenkanälchen aus dem mittleren Gebiet des Mesonephros (Wrobel, 1990), die den embryonalen Harn vom Riesenglomerulus ableiten (Rüsse, 1998), werden zu den Ductuli efferentes, die einen Teil des Nebenhodenkopfes bilden. Einige münden nicht in den Ductus epididymidis, sondern enden blind. Sie werden Ductuli aberrantes genannt. Alle anderen Urnientubuli gehen zugrunde.

Das zwischen Nebenhodenkopf und Ductus epididymidis liegende Rudiment der Urniere wird als Paradidymis bezeichnet.

Der Ductus epididymidis entsteht aus dem Anfangsabschnitt des Urnierenganges. Durch ausgeprägtes Längenwachstum entsteht der Nebenhodenkanal, der sich dabei in zahlreiche Schlingen aufknäult. Diese Wachstumsphase erfolgt, je nach Tierart, zu unterschiedlichen Zeiten. Beim Rind erfolgt sie am 110. Tag p.c. oder beim Hund erst kurz vor der Geburt.

Am kranialen Ende des Wolff'schen Ganges kann ein kleines bläschenförmiges Gebilde zurückbleiben, das dem Nebenhodenkopf als Appendix epididymidis anhängt. In gleicher Weise bleibt am Hoden als Rest des Müller'schen Ganges der Appendix testis zurück (Nickel et al., 2004).

2.1.4. Funktion des Nebenhodens

Der Nebenhoden ist nicht nur ein passives Transportsystem für Spermien, sondern vielmehr erfahren die Samenzellen während ihrer Passage einige prägnante Änderungen ihrer Struktur und Funktion (Chandler et al., 1981), die insgesamt als epididymale Spermienreifung bezeichnet werden.

Der Transport der unbeweglichen Spermien zwischen Hoden und Samenleiter erfolgt vor allem durch Kontraktionen der glatten Muskulatur des Nebenhodenkanals. Im Bereich der Ductuli efferentes tragen auch die Zilien des Epithels zum Weitertransport bei (Bedford, 1975).

Bemerkenswert ist, dass trotz erheblich unterschiedlicher Länge des Nebenhodenkanals bei den einzelnen Tierarten die Passagezeit immer annähernd 12 Tage beträgt. Die Geschwindigkeit des Transports wird also nicht durch die Länge

sondern auch durch andere Faktoren wie z.B. durch Androgene beeinflusst (Hib und Ponzio, 1977).

Während des Transports werden Spermien verschiedenen Alters vermischt, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass Samenzellen in der Peripherie des Nebenhodenkanals schneller bewegt werden, als jene im Zentrum (Orgebin-Crist, 1965).

Der Nebenhoden dient auch als Organ für die SpermienSpeicherung, besonders die Cauda epididymidis. Die Befruchtungsfähigkeit bleibt hier über mehrere Wochen erhalten. Sie wird allerdings von der Höhe des Androgenspiegels sowie der Skrotum-Temperatur beeinflusst (Foldsey und Bedford, 1982).

Mit Ausnahme von Kaninchenspermien, die bei Entnahme aus der Cauda epididymidis Motilität zeigen (Turner und Reich, 1985), werden die der anderen Tierarten weitgehend unbeweglich gelagert und erst bei der Ejakulation motil.

Eine weitere wichtige Aufgabe des Nebenhodens ist es, alte, nicht ejakulierte oder defekte Spermien abzubauen. Auch bei sexuell aktiven Tieren werden permanent Samenzellen resorbiert (Orgebin-Crist, 1968). Durch Ligatur verschiedener Anteile des Nebenhodens haben mehrere Autoren versucht, die Stelle zu lokalisieren, an der die Spermien bevorzugt aufgenommen werden. Dabei hat man festgestellt, dass bei den meisten Tierarten die epitheliale Phagozytose im Caput stattfindet (Hoffer und Hamilton, 1974; Crabo et al., 1971).

Eine weitere mögliche Alternative ist der Abbau von Samenzellen durch intraluminale Spermatophagen (Roussel et al., 1967; Holstein, 1969). Nicht ejakulierte Spermien werden häufig auch über die Harnröhre ausgeschieden. Beim Kaninchen geschieht dies nach längerer sexueller Ruhe (Holtz und Foote, 1972).

Da defekte Spermien häufig geschwollene Köpfe und basophile Körper aufweisen, geht Millar (1972) von einem Selbstzerstörungsmechanismus der Spermien aus. Dieser steht vermutlich in engem Zusammenhang mit der Zusammensetzung des Nebenhodensekretes.

Verschiedene Untersuchungen haben ergeben, dass der Nebenhoden sowohl zur Sekretion als auch zur Resorption befähigt ist (Nicander, 1965; Cooper, 1986). Diese Vorgänge sind in den einzelnen Segmenten unterschiedlich stark ausgeprägt und

von bestimmten Zelltypen abhängig. Granula und intraepitheliale Vakuolen, sowie ein gut ausgeprägter Golgi-Apparat und ein stark ausgebildetes raues endoplasmatisches Retikulum lassen auf Sekretion schließen. Endozytotische Invaginationen der Zellmembran, die auch „coated vesicles“ genannt werden, deuten vor allem auf eine resorptive Aktivität hin (Hoffer et al., 1972). Die aus dem Hoden stammende Flüssigkeit wird zum größten Teil bereits im Nebenhodenkopf resorbiert. Dadurch steigen im Verlauf des Ductus epididymidis der Spermakritwert und die Proteinkonzentration an (Turner et al., 1984).

Verschiedene Ionen werden durch aktiven oder passiven Transport ins Lumen des Ductus epididymidis geschleust, bzw. aus diesem resorbiert. Diese Verschiebung von Elektrolyt-Konzentrationen ist steroidabhängig (Jones, 1974).

Einer der wichtigsten Bestandteile des Nebenhodensekretes sind außerdem Aminosäuren. Diese sind im Nebenhodenkopf wesentlich höher konzentriert als in der Cauda (Shimazaki et al., 1976). Vom epididymalen Epithel werden außerdem Glykoproteine synthetisiert, die mit den Spermien in Kontakt treten und für deren Reifung von großer Bedeutung sein können (Orgebin-Crist und Jahad, 1978).

Zusätzlich werden Glycerylphosphorylcholin (GPC) sowie Sialinsäure synthetisiert und sezerniert. Die Sialinsäure wird zum Teil an Spermien gebunden, sie soll auch eine membranstabilisierende Wirkung haben und die Reifung der Samenzelle positiv beeinflussen (Bose et al., 1966). Ein weiterer bedeutender Inhaltsstoff des Nebenhodensekretes stellt Inosit dar. Es dient als Substrat für den Spermienstoffwechsel während der Passage (White, 1973).

Eine besonders wichtige Aufgabe des Nebenhodens ist die Reifung der Spermien. Diese müssen durch den gesamten Nebenhoden transportiert werden, um Beweglichkeit und die Fähigkeit zur Befruchtung zu erlangen. Die vollständige Reifung beinhaltet morphologische, physiologische und biochemische Veränderungen der Samenzellen. Ein Schritt davon ist die Ablösung bzw. Kaudalverlagerung des Zytoplasmatröpfchens. Je nach Tierart erfolgt diese in unterschiedlichen Segmenten des Nebenhodens. Beim Pferd beginnt die Verlagerung erst im unteren Teil des proximalen Corpus, beim Rind dagegen bereits am Anfang des Corpus (Nicander, 1958). Reife Spermien besitzen kein Zytoplasmatröpfchen mehr (Lindholmer, 1974).

Während der Spermienreifung im Nebenhoden kommt es bei einigen Spezies zu Veränderungen der Form des Akrosoms (Bedford, 1965). Beim Kaninchen ist beispielsweise das Akrosom der Caudaspermien wesentlich kleiner als das der Caputspermien (Bedford, 1965). Beim Kaninchen und beim Affen verändert das Akrosom während der verschiedenen Phasen der Nebenhodenpassage seine Form. Es erfolgt eine Umverteilung des subakrosomalen Materials, sowie eine Änderung der Ultrastruktur der akrosomalen Membran (Bedford und Nicander, 1971).

Die Passage der Samenzellen durch den Nebenhoden bewirkt auch eine veränderte Zusammensetzung ihrer Plasmamembran, vor allem der Lipide und Kohlenhydrate, sowie Veränderung ihrer antigenen Struktur (Wrobel, 1990). So werden auf der Spermienoberfläche Glykoproteine beschrieben, die epididymalen Ursprungs sind (Faye et al., 1980). Durch die Einwirkung der Glykoproteine und Glykosidasen auf die Spermienoberfläche kommt möglicherweise die Änderung der antigenen Struktur zustande (Sinowatz et al., 1975). Außerdem erfährt die Plasmamembran eine veränderte Ladungsverteilung, die eine Zunahme der Disulfidbrücken bewirkt (Bedford, 1975).

Besonders wichtig ist die Entwicklung der Vorwärtsmotilität, die vor allem auf die Veränderung der Struktur der Spermenschwänze zurückzuführen ist. Der Bildung von Disulfidbrücken in den Fibrillen des Spermenschwanzes kommt dabei wiederum eine wichtige Bedeutung zu (Bedford et al., 1973). Caputspermien zeigen aufgrund der Steifheit ihres Halsansatzstückes und des Schwanzmittelstückes mehr zirkuläre Bewegungen und sind deshalb in der Regel nicht befruchtungsfähig (Burgos und Tovar, 1974). Zusätzlich ist die Zusammensetzung des Nebenhodensekretes essentiell für die Motilitätsentwicklung der Spermien (Carr und Acott, 1984). Acott und Carr (1984) gehen von einer Abhängigkeit der Beweglichkeit vom epididymalen pH-Wert aus. Demnach hat das Nebenhodensekret des Rindes einen pH-Wert von 5,8. Wird dieser erhöht steigt die Motilität der Spermien. Steigt der pH –Wert allerdings auf 7,6 oder wird auf 5,5 gesenkt, so ist die Beweglichkeit der Spermien erheblich eingeschränkt (Acott und Carr, 1984).

Bemerkenswert ist weiterhin, dass Carnitin in der Lage ist, bei Spermien in proximalen Bereichen die Motilität zu steigern, in den distalen Segmenten auf reife Spermien aber inhibierend wirkt (Hinton et al., 1981). Unter normalen Bedingungen nimmt die Carnitinkonzentration im Verlauf des Nebenhodens von proximal nach distal zu, wobei Carnitin nicht vom Nebenhoden selbst synthetisiert werden kann.

Der Gehalt an Carnitin im Nebenhoden ist abhängig von der Androgenkonzentration (Casillas und Erickson, 1975).

Ein weiterer wichtiger Faktor, welcher die Motilität von Spermien beeinflusst, ist zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), das in Verbindung mit dem „forward motility protein“ eine vorwärtsgerichtete Bewegung der Samenzellen erzeugt (Acott et al., 1983). Allerdings verändert sich der Gehalt an cAMP nicht, wenn sich der pH-Wert erhöht, dennoch wird eine volle Motilität der Spermien erreicht (Acott und Carr, 1984).

Die Umstellung des Spermienstoffwechsels im Nebenhoden lässt sich zu einem geringen Teil mit der zunehmenden Dehydratation der Samenzellen im Laufe der Nebenhodenpassage erklären. Hauptsächlich beruht sie auf dem Verbrauch der Phospholipide und damit auch der Phospholipid-gebundenen Fettsäuren, die den Samenzellen während ihrer Reifung zur Ernährung zur Verfügung stehen (White, 1973).

2.2. Bedeutung und Vorkommen von Wachstumsfaktoren allgemein

Wachstumsfaktoren bzw. "Growth Factors" (GF) sind Polypeptide, die die Zellproliferation und Differenzierung durch Bindung an spezifische Rezeptoren regulieren. Sie bewirken den Übergang von Zellen aus der G₀- in die G₁-Phase im Zellzyklus.

Zu den Wachstumsfaktoren zählen der "Epidermal growth factor" (EGF), der "Nerve growth factor" (NGF), der "Insuline-like growth factor" I und II (IGF I+ II), der "Transforming growth factor" (TGF) oder der Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF). Die Wechselwirkung des Wachstumsfaktors mit der Zielzelle erfolgt über die Bindung an einen spezifische Membranrezeptor, der meist Tyrosinkinaseaktivität besitzt (Löffler und Petrides, 1997).

2.2.1. Vascular endothelial growth factor (VEGF) und seine Rezeptoren

2.2.1.1 VEGF- Eigenschaften

VEGF ("Vascular endothelial growth factor") bzw. VPF ("Vascular permeability factor") ist ein Mitglied der ständig größer werdenden Familie der Wachstumsfaktoren.

Es existieren mehrere Isoforme von VEGF (= VEGF-A) mit unterschiedlicher Anzahl an Aminosäuren (121, 165, 189 und 206) (Tischer et al., 1991), sowie noch fünf Mitglieder der VEGF- Familie: PlGF ("Placenta growth factor"), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und mindestens drei virale Homologe, die gemeinsam als VEGF-E bezeichnet werden (Veikkola und Alitalo, 1999). VEGF-E wird von einem Parapox-Virus (Orf-Virus) produziert, das Hautläsionen bei Schafen und Ziegen verursacht (Haig et al., 1996).

Viele VEGF- ähnliche oder –verwandte Moleküle haben gemeinsam, dass sie an Endothel- Zellen wirken. VEGF weist eine gewisse Sequenz-Homologie mit PDGF ("Platelet derived growth factor"), sowie eine hohe Ähnlichkeit zu PlGF auf (Maglione et al., 1991).

Alle Mitglieder der VEGF- Familie besitzen ein einheitliches Muster von acht Cystein-Molekülen, die in intra- und intermolekulare Disulfid-Brücken eingebunden sind. Das zweite und vierte Cystein sind jeweils für die antiparallele Anordnung verantwortlich, die zur Bildung des Homodimers führt (Veikkola und Alitalo, 1999). Dieses gemeinsame Cystein-Motiv wird als "VEGF homology domain" (VHD) bezeichnet. Es enthält drei Disulfid- Brücken, zwei innerhalb und eine außerhalb der Ring-Struktur und ist für die Stabilisation der Tertiär-Struktur zuständig. Eine analoge Cystein-Anordnung findet sich auch bei TGF β ("Tumor growth factor") sowie bei PDGF. VEGF-C und VEGF-D sind als einzige Ausnahmen nicht-kovalente Homodimere (Maglione, 1991), sie enthalten Aminosäuren mit langem N- und C-terminalem Ende (Stacker und Achen, 1999).

Natives VEGF (hauptsächlich VEGF₁₆₅) ist ein basisches, heparinbindendes, homodimeres Glykoprotein von 45000 Dalton (Ferrara et al., 1992). Dvorak et al. (1995) geben die Größe mit 35-45 kD an. VEGF₁₂₁ dagegen ist ein schwach saures Polypeptid, das nicht an Heparin bindet .VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ sind wieder basischer und binden Heparin mit einer größeren Bindungsneigung als VEGF₁₆₅ (Houk et al., 1992). Trotz dieser unterschiedlichen Affinität, die wesentlich geringer ist als die anderer Wachstumsfaktoren, wie etwa "Fibroblast growth factor" (Dvorak et al., 1995), wird VEGF zur Gruppe der heparinbindenden Wachstumsfaktoren gezählt.

Die Isoforme zeigen auch große Unterschiede in ihrer Bioverfügbarkeit. Während VEGF₁₂₁ frei löslich ist, bleibt ein großer Teil von VEGF₁₆₅ an die Zelloberfläche bzw. die extrazelluläre Matrix gebunden. Im Gegensatz dazu kommen VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ fast ausschließlich als Einschlüsse in der extrazellulären Matrix vor (Park et al., 1993).

Alle Isoforme werden durch ein Gen codiert, das acht Exons enthält. Durch alternatives m-RNA-Splicing entstehen Proteine mit unterschiedlicher Anzahl an Aminosäuren (Klagsbrun und D'Amore, 1996). Laut Houk et al. (1991) wurden die Proteine mit 121, 165 und 189 Aminosäuren identifiziert, die Existenz von VEGF₂₀₆ ist nur durch die PCR humaner C-DNA nachgewiesen (Houk et al., 1991).



Abb. 1: VEGF-Molekül

2.2.1.2. Funktionen

Ursprünglich wurde VEGF bzw. VPF als ein Protein beschrieben, das von Tumorzellen produziert wird und die Durchlässigkeit von Gefäßwänden erhöht (Senger et al., 1983). In der Folge wurde von verschiedenen Autoren berichtet, dass VEGF an vielen weiteren, meist physiologischen, Vorgängen beteiligt ist.

VEGF ist vor allem verantwortlich für alle Prozesse der Gefäßbildung. Es wirkt spezifisch mitogen auf Endothelzellen der verschiedenen Gefäße (Pepper et al., 1996) und induziert die Expression antiapoptotischer Proteine (Gerber et al., 1998). Somit ist es ein entscheidender Auslöser bei der Formung kapillärer Strukturen (Pepper et al., 1992). VEGF fördert die Angiogenese, d.h. das Wachstum und die Sprossung neuer Kapillaren aus einem bereits bestehenden Gefäß, sowie die Vaskulogenese, die Entstehung von Gefäßen aus Mesenchymzellen im Embryo. Bestimmte Isoforme von VEGF induzieren auch die Lymphangiogenese (Roberts und Palade, 1995; Olofsson et al., 1999).

Die Wirkung von VEGF wurde in Tierversuchen und in vitro bewiesen. Nennenswert erscheint hier vor allem die Veröffentlichung von Takeshita et al. (1994). Hier wurden bei Kaninchen die A. iliaca externa ligiert und die A. femoralis komplett entfernt. Nach Applikation von VEGF ergab sich eine dosisabhängige Neubildung von Gefäßen. Außerdem wurde nachgewiesen, dass VEGF essentiell für die embryonale Vaskulogenese ist. Embryonen, bei denen eines der VEGF-Allele fehlte, starben vor der Geburt ab (Carmeliet et al., 1996).

Eine weitere wichtige Funktion von VEGF ist die Entwicklung der Gefäßpermeabilität (Roberts und Palade, 1995). Seine Wirkung ist etwa 50000-mal so stark wie die von Histamin (Senger et al., 1983). VEGF bzw. VPF wurde auch als wichtigster Faktor für

die Entstehung von Aszites bei Tumor- Patienten beschrieben (Keck et al., 1989). VEGF wirkt auf die Permeabilität durch Aktivierung der sogenannten vesikulären-vakuolären Organellen (VVO), die den Austritt von Plasma in das umliegende Gewebe ermöglichen (Dvorak et al., 1995). Durch das Auseinanderweichen der Endothelzellen und ein Dünnenwerden der Gefäß-Basalmembran treten Plasmaproteine aus, die ein Fibringerüst und damit die Matrix für das Wachstum weiterer Endothelzellen oder auch Tumorzellen bilden (Brown et al., 1993; Folkman und Shing, 1992).

2.2.1.3. Steuerung

Die Produktion von VEGF wird im Gegensatz zu allen anderen Mitgliedern der VEGF-Familie in erster Linie durch Hypoxie induziert (Enholm et al., 1997). Diese Tatsache führte dazu, dass VEGF lange Zeit nur im Zusammenhang mit Tumorwachstum gesehen wurde. Wenn ein Tumor relativ schnell wächst, entsteht ein schlecht mit Sauerstoff versorgter Bereich im Zentrum des Tumors. Dieser wird dann entweder nekrotisch, oder es bilden sich unter Beteiligung von VEGF neue Gefäße. Erst mit der Etablierung neuer Gefäße kann der Tumor sich weiter vergrößern (Shweiki et al., 1995).

Auch bei einem Gefäßverschluss steigt der VEGF-Spiegel rasch an, um durch die Bildung von Kollateralgefäßen möglichst schnell die Versorgung des betroffenen Gewebes zu gewährleisten. Dies wurde experimentell durch die Unterbindung einer Koronararterie beim Schwein bewiesen. Die Reaktion auf die myokardiale Ischämie war ein spontaner Anstieg des VEGF-mRNA –Spiegels (Banai et al., 1994).

Der Mechanismus der erhöhten VEGF-Expression ist noch nicht vollständig geklärt. Es wurde jedoch festgestellt, dass die Halbwertszeit von VEGF-mRNA unter normalen Bedingungen 30-45 Minuten beträgt, unter hypoxischen signifikant auf sechs bis acht Stunden ansteigt (Shima et al., 1995).

Dieser Vorgang hat eine erhebliche Ähnlichkeit zur Regulation von Erythropoetin. Auch die Expression dieses Hormons wird durch Hypoxie verstärkt. Beide Gene weisen eine homologe Sequenz von 28 Basen- Paaren auf (Goldberg und Schneider, 1994).

Zusätzlich wurde eine Korrelation von Sauerstoffmangel und PDGF im Zusammenhang mit VEGF-Expressions-Anstieg in vaskulären glatten Muskelzellen festgestellt (Stavri et al., 1995).

Alternativ kann VEGF durch veränderte Blut-Glukose-Werte angeregt werden. Dies erklärt auch das vermehrte Auftreten von VEGF in Glaskörpern von Diabetes-Patienten und führt zu der Hypothese, dass VEGF generell an diabetischen Begleiterscheinungen beteiligt ist (Adamis et al., 1993).

Eine Beteiligung an dem Anstieg der Expression von VEGF wurde auch für verschiedene Hormone, Wachstumsfaktoren und Cytokine, z.B. "Epidermal growth factor", LH oder TGF- β ("Transforming growth factor") nachgewiesen (Klagsbrun, D`Amore, 1996).

2.2.1.4. Rezeptoren

Bisher sind vier Rezeptoren bekannt, die VEGF bzw. verschiedene Mitglieder der VEGF-Familie binden (siehe Tabelle 1). Drei davon sind Oberflächen-Proteine und gehören zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren: VEGFR-1 = flt-1 (fms-like tyrosine kinase), VEGFR-2 = Flk-1/KDR (**F**etal **l**iver **k**inase beim Menschen entspricht **K**inase insert **D**omain **R**eceptor bei der Maus (Quinn et al., 1993)) und VEGFR-3 = flt-4. Die genannten Rezeptoren werden in der Embryonalphase auf allen Endothelzellen exprimiert (Millauer et al., 1993). Die Expression von VEGFR-1 und VEGFR-2 setzt sich über die Embryonalphase hinaus bei allen Endothelzellen fort. VEGFR-3 wird nach der Embryonalentwicklung nur von venösen und lymphatischen Endothelien exprimiert (Kaipainen et al., 1995). VEGFR-3 kommt in adulten Organen nur in lymphatischem Epithel vor und ist der einzige bekannte Marker für diese spezielle Zellart (Lymboussaki et al., 1998).

Die Oberflächen-Rezeptoren enthalten sieben Immunglobulin-ähnliche Domänen in ihren extrazellulären Domänen und eine Tyrosinkinase-Domäne in der zytoplasmatischen Region. Flk-1/KDR wird bei Kontakt mit VEGF autophosphoryliert. Dies ist der erste wichtige Schritt der Signaltransduktion. Für Flk-1 und Flt-1 wurde nachgewiesen, dass VEGF einen Calcium-Ausfluss aus *Xenopus*-Oozyten, die den Rezeptor exprimieren, veranlasst. Dieser Mechanismus läuft vermutlich immer über

die genannten Rezeptoren ab (Quinn et al., 1993). VEGF hat für jeden Rezeptor eine andere Bindungsstelle. Bei KDR dient ein basischer Teil als Ligand, an Flt-1 bindet eine saure Region mit der Aminosäuresequenz Arg-Lys-His.

Die Bedeutung von Flt-1 und Flk-1 als VEGF- Rezeptoren wurde bei Mäusen mit homozygoter Mutation der entsprechenden Gene nachgewiesen. Ein inaktives Flk- Gen führte zu fehlender Blut-Insel- Bildung und Vaskulogenese, wogegen ein inaktives Flt- Gen zu fehlerhaftem Aneinanderreihen von Endothelzellen und der Bildung von schlauchartigen Gefäßen führt. Beide Mutationen führten zum Absterben des Embryos am Tag acht (Keyt et al., 1996).

Außerdem gehört noch Neutropilin-1= NP-1 zu den Mitgliedern der VEGF-Familie bindenden Rezeptoren (Stacker und Achen, 1999). NP-1 verstärkt die Bindung von VEGFR-2 an VEGF₁₆₅ und die durch VEGF₁₆₅ vermittelte Chemotaxis (Soker et al., 1998).

Tab. 1

Funktionen und Bindungsverhalten der verschiedenen Rezeptoren:

	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	Neuropilin-1
Funktion	Zell-Zell und Zell-Matrix – Interaktionen während der Embryonalphase	Vasculogese in frühen Embryonalstadien, Tumorangiogenese	Lymphangiogenese und Formation großer Blutgefäße im Embryo	Koordination neuronaler und vasculärer Entwicklung
VEGF	+	+		◇
VEGF-B	+			◇
VEGF-C		+	+	
VEGF-D		+	+	
VEGF ₁₆₅	◆	◆		+
PlGF	+			◇
PlGF-2	◆			+

zusammengestellt nach dem Inhalt aus + Stacker und Achen, 1999

◇ Olofsson et al., 1999 bzw. Veikkola und Alitalo, 1999

◆ Klagsbrun und D'Amore, 1996.

2.2.1.5. Bedeutung von VEGF bei physiologischen und pathologischen Vorgängen in verschiedenen Organen

VEGF ist immer dann von Bedeutung, wenn eine Neubildung oder Ausdifferenzierung von Gefäßen notwendig ist, um einen physiologischen oder pathologischen Prozess ablaufen zu lassen. Wie bereits erwähnt, ist die Embryonalphase die Zeit in der die stärkste Vaskulogenese und Angiogenese stattfindet.

Auch bei adulten Individuen bilden sich in einigen Organen, wie z.B. im Ovar oder im Uterus neue Gefäße (Lymboussaki et al., 1999; Phillips et al., 1990).

VEGF wurde in physiologischer Funktion erstmals in kultivierten Rinder-Hypophysen-Zellen (Ferrara, Henzel, 1989), im Corpus luteum der Ratte (Phillips et al., 1990) sowie in glatten Gefäßmuskelzellen (Tischer et al., 1991) gefunden.

Weiterhin wurde durch Northern- Blots und In-Situ- Hybridisierung die mRNA von VEGF in vielen Organen wie Lunge, Niere, Nebenniere und Herz nachgewiesen.

Etwas geringere mRNA-Mengen von VEGF kommen in Leber, Milz, Magenschleimhaut und peritonealen Makrophagen vor. Die höchsten Spiegel an VEGF zeigten sich dabei in Epithelzellen von Lungenalveolen, Nierenglomeruli, Nebennierenrinde und Herzmuskelzellen (Berse et al., 1992). Die menschliche Niere wurde auch von Brown et al., 1992 untersucht. Northern- Blot und In-Situ-Hybridisierung ergaben, dass viscerale glomeruläre Endothelzellen große Mengen an VEGF-mRNA bzw. das Protein selbst enthalten. Dagegen konnten parietale Zellen des Glomerulums und Endothelzellen immunhistologisch nicht mit VEGF-Antikörpern angefärbt werden.

Angiogenese ist auch bei der Wundheilung von großer Bedeutung, da hier zerstörte Gefäße durch neue ersetzt werden müssen (Lymboussaki et al., 1999).

Es gibt zusätzlich eine Reihe von pathologischen Vorgängen, bei denen VEGF eine Rolle spielt.

Beim Diabetes mellitus kommt es häufig zu proliferativer Retinopathie. Ausgang hierfür ist ein Verschluss der Vena centralis retinae. Dies führt zu einer intraokkulären Neovaskularisation. Ebenso ist VEGF maßgeblich an der altersbedingten Makula-Degeneration (AMD) beteiligt (Garner, 1994).

Zwei Studien haben einen Zusammenhang von VEGF mit rheumatischer Arthritis (RA) gezeigt. Hierbei war VEGF in der Synovia von Patienten mit RA signifikant

höher als bei anderen Arthritiden bzw. degenerativen Gelenkserkrankungen (Koch et al., 1994, Fava et al., 1994).

Auch bei verschiedenen Hauterkrankungen wurde eine Mitwirkung von VEGF nachgewiesen, so bei der Psoriasis, die durch erhöhte Gefäßpermeabilität und verstärkte Vaskularisation charakterisiert ist (Detmar et al., 1994), sowie bei einigen bullösen Dermatosen (Brown et al., 1995a).

Zuletzt soll noch einmal die Rolle des VEGF für das Tumorwachstum besprochen werden. Untersuchungen an Tumoren waren ausschlaggebend für die Entdeckung von VEGF, da das Wachstum eines Tumors durch seine Blutversorgung (Wizigmann-Voos et al., 1995) und somit indirekt durch das zur Verfügung stehende VEGF bestimmt wird. So wurden z.B. Zellen aus einem menschlichen Adenokarzinom des Gastrointestinaltrakts untersucht. Dabei stellte man fest, dass maligne Epithelzellen VEGF-mRNA in großen Mengen exprimieren, während in normalen Zellen nur wenig oder gar keine VEGF-mRNA nachweisbar war (Brown et al., 1993).

Weiterhin stellten Gasparini et al., 1997, bei postoperativen Studien an Brustkrebspatientinnen fest, dass die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs bei VEGF-negativen Tumoren wesentlich geringer ist als bei VEGF-positiven.

2.2.1.6. Vorkommen von VEGF im Nebenhoden

2.2.1.6.1. Physiologische Verteilung von VEGF im Nebenhoden des Menschen

VEGF ist im gesamten männlichen Genitaltrakt sowie in der Samenflüssigkeit vorhanden (Brown et al., 1995b). Auffällig hierbei ist, dass die höchsten VEGF-Werte in samenfreien Ejakulaten nach Vasektomie nachgewiesen wurden. Dies spricht dafür, dass VEGF im Seminalplasma aus Prostata und Samenblase und nicht aus Hoden oder Nebenhoden stammt. VEGF spielt möglicherweise eine Rolle bei der Implantation der Blastozyste ins Endometrium (Brown et al., 1995b).

Auch die Verteilung von VEGF und seiner Rezeptoren wurde im menschlichen Nebenhoden untersucht und zwar jeweils durch Reverse Transcription Polymerase Chain Reaktion (RT-PCR), durch Western Blot sowie durch immunhistologische Färbungen.

Das Material stammt von Männern zwischen 66 und 85 Jahren, die aufgrund eines Prostatakarzinoms orchidektomiert werden mussten.

VEGF wurde dabei in den Muskelzellen der Ductuli efferentes und des Ductus epididymidis nachgewiesen. In den distalen Ductuli efferentes färbten sich vor allem zilienbesetzte Epithelzellen an, im proximalen Anteil war keine positive Reaktion sichtbar. Auch die Endothelien von interstitiellen Gefäßen konnten nicht angefärbt werden. Nur einige perivaskuläre Zellen der großen Gefäße sowie einige Basalzellen des Ductus epididymidis zeigten eine leichte Anfärbung, die Hauptzellen hingegen reagierten nur andeutungsweise.

Der VEGF- Rezeptor Flt-1 ließ sich deutlich in einigen Basalzellen und in Zilienzellen im distalen Anteil der Ductuli efferentes darstellen. In ihrem Lumen befanden sich auch einige Flt-1-positive Makrophagen. Im Corpus epididymidis ließen sich nur Lymphgefäße anfärben, alle anderen Strukturen verhielten sich beim immunhistologischen Nachweis von Flt-1 negativ.

KDR ließ sich in den Ductuli efferentes bzw. im Caput epididymidis in den Endothelzellen großer interstitieller Gefäße sowie in zilienlose Epithelzellen des Nebenhodenganges nachweisen. Im Corpus reagierten einige Basalzellen und die kapillären Endothelzellen in der Lamina propria des Ductus epididymidis positiv. Die Autoren gehen davon aus, dass im Nebenhoden kaum Neovaskularisation stattfindet, und dass VEGF hier hauptsächlich als Permeabilitätsfaktor fungiert. Der Nachweis in Makrophagen führt zu zwei Thesen: Entweder dienen sie als Speicher für VEGF oder aber VEGF funktioniert als autokriner Faktor und beeinflusst ihre Motilität.

Da VEGF die Permeabilität beeinflusst, ist es im Nebenhoden auch wesentlich am Ausmaß der Resorption der aus dem Hoden stammenden Flüssigkeit beteiligt und steht durch die unterschiedliche Verteilung von Flt-1 und KDR mit der Spermienreifung in Zusammenhang (Ergün et al., 1998).

2.2.1.6.2.Überexpression von VEGF und Unfruchtbarkeit

In diesem Versuch wurde Mäusen ein "mouse mammary tumor virus", der die Expression von VEGF in der weiblichen Brustdrüse und den männlichen Geschlechtsorganen veranlasst, eingeschleust.

VEGF-mRNA wurde durch Northern und Southern Blotting nachgewiesen. Dabei zeigten sich die höchsten Werte im Nebenhoden, weniger im Hoden. In Prostata oder Samenblasendrüse konnte keine VEGF-mRNA nachgewiesen werden. Makroskopisch verändert erschien bei erhöhter Expression von VEGF auch nur der Nebenhoden. Er wirkte vergrößert und geschwollen. Histologisch zeigte sich ein erweiterter Ductus epididymidis. Vor allem in Caput und Corpus war die Epithelhöhe reduziert, in der Cauda fiel eine epitheliale Hyperproliferation auf. Der Nebenhodengang war in viele kleine Räume aufgeteilt und auch das Rete testis war erweitert. Der Nachweis von Fibrin gab einen Hinweis auf eine erhöhte vaskuläre Permeabilität. Die Expression der VEGF-Rezeptoren war wesentlich höher als bei Vergleichstieren, außerdem war die Anzahl der Kapillaren um 40-80% erhöht. Der Hoden war von der VEGF-Überexpression weniger betroffen, Sertoli- und Leydig- Zellen waren unverändert. Allerdings enthielten viele Tubuli seminiferi Vakuolen. Außerdem traten weniger Spermatogonien auf und das gesamte Spermienepithel wirkte ungeordnet. Alle behandelten männlichen Mäuse waren infertil.

Die Unfruchtbarkeit ist die Folge mehrerer Faktoren. Als erstes ist hierbei die direkte Einwirkung von VEGF auf die Zellen der Spermatogenese und die daraus resultierende Unterbrechung in der Elongationsphase der Spermatischen zu nennen. Außerdem steigt durch die erhöhte Durchblutung durch die Vermehrung der Gefäße die Temperatur in Hoden und Nebenhoden an, was wiederum zur Verschlechterung der Spermaqualität führt. Als letztes wird angeführt, dass durch ein schlecht ausgebildetes Epithel sowie eine veränderte kapilläre Struktur die Reabsorption der im Hoden gebildeten Flüssigkeit vermindert und damit das Sperma wesentlich weniger konzentriert wird.

Diese Versuche haben gezeigt, dass VEGF nicht nur auf Endothelzellen einwirkt, sondern auch an wichtigen physiologischen Prozessen, wie der Fortpflanzung, beteiligt ist (Korpelainen et al., 1998).

2.3. Growth hormone receptor (GHR)

Das Wachstumshormon, GH (Growth hormone), wird wie Prolaktin im Hypophysenvorderlappen gebildet und muss zur Auslösung einer biologischen Antwort an den entsprechenden Rezeptor binden (Kelly et al., 1991).

Der GHR gehört zur Familie der Cytokin-/ Hämatoopoetin- Rezeptoren. Diese umfasst Rezeptoren für verschiedene Interleukine, Interferone und Wachstumsfaktoren, wie z.B. Erythropoetin oder "granulozyte colony stimulating factor" (Finidori und Kelly, 1995). GHR ist ein transmembranes Protein, das einen extrazellulären Anteil besitzt, der für die Ligandenbindung zuständig ist. Außerdem verläuft ein kleiner Teil in der Membran, dann folgt ein langer zytoplasmatischer Schwanz, der an der Signaltransduktion beteiligt ist (Edens und Talamantes, 1998). Ursprünglich nahm man an, dass Rezeptoren für GH ausschließlich in der Leber vorkommen (Lobie et al., 1990a).

Inzwischen wurde GHR aber in einer Reihe von anderen Organen und Geweben wie Fettgewebe, Lymphgewebe, Darm, Herz, Niere, Lunge, Pankreas, Gehirn, Knorpel, Skelettmuskel, Corpus luteum und Hoden nachgewiesen (Lobie et al., 1990a).

Auch in allen Anteilen der Haut wie Epidermis, Haarfollikel, Schweißdrüsen und Dermis kommt GHR vor (Lobie et al., 1990b).

Die Regulation der Expression von GHR ist nicht vollständig erforscht.

Nachgewiesen wurde aber, dass bei Ratten Nierenversagen (Finidori et al., 1980) sowie Futterentzug zu einem Abfall von GHR in der Leber führt. Allerdings geschieht die Erneuerung der GHR bemerkenswert schnell. Ratten, die vier Tage kein Futter bekamen, wiesen nur noch 50% der normalen Rezeptormenge auf, nach drei Tagen Nahrungsaufnahme war die Anzahl der Rezeptoren wieder gleich derer von Kontrolltieren (Postel-Vinay et al., 1982). Auch Östrogene scheinen einen Einfluss auf die GHR-Expression zu haben. So steigt bei weiblichen Ratten nach der Pubertät der Gehalt an GHR in der Leber um das Doppelte an (Maes et al., 1983).

Embryonal beeinflusst GH auch die Entwicklung der Gonaden, bei adulten Tieren die Hormonsynthese im Hoden und die Ovulation (Zachmann, 1992).

Aus diesem Grund wurden von Lobie et al. (1990a) sämtliche männliche und weibliche Fortpflanzungsorgane der Ratte auf ihren Gehalt an GHR geprüft. Bei männlichen Geschlechtsorganen exprimieren die akzessorischen Geschlechtsdrüsen, die Hoden und unterschiedlichen Vorstufen von Spermien GHR in variabler Intensität. Das Epithel des Nebenhodens zeigte eine starke Reaktion des Epithels, auf ganzer Länge des Ductus epididymidis, mit Ausnahme von einigen Zellen, die immunonegativ waren. Die ein- oder mehrlagige Muskelschicht zeigte sich schwach positiv, an den Spermatozoen aus dem Lumen war so gut wie keine Reaktion sichtbar.

Im weiblichen Geschlechtsapparat reagierten nahezu alle Strukturen des Ovars und des Uterus GHR-positiv.

2.4. Cytokeratin und Vimentin

Da Cytokeratin und Vimentin in vielen Geweben gleichzeitig in derselben Zelle nachgewiesen wurden, kam man schon vor längerer Zeit zu der Annahme, dass möglicherweise eine noch ungeklärte funktionelle Beziehung zwischen den beiden Intermediärfilamenten besteht (Kasper, Karsten, 1988). Cytokeratin-Filamente bilden ein intrazelluläres Netzwerk, das mit den Desmosomen in Verbindung steht (Palacios et al., 1993). Vimentin tritt hauptsächlich in mesenchymalen Zellen auf (Cooper et al., 1985).

Bis heute sind 20 verschiedene Cytokeratine bekannt, wovon CK 1-8 basisch und CK 9-20 sauer sind (Sundström und Stigbrand, 1994). Jeweils ein basisches und ein saures Monomer sind in der Lage ein Cytokeratindimer zu bilden. In einschichtigen Epithelien findet oft eine Koexpression und Dimerbildung von CK 18 und CK 8 statt (Lane und Alexander, 1990).

In diversen Organen des männlichen Geschlechtstrakts wurden beide Proteine nachgewiesen, so z.B. in Sertoli-Zellen ungeborener Ratten (Paranko et al., 1986) oder im Rete testis (Ramaekers et al., 1985). Auch im menschlichen Nebenhoden wurden Cytokeratin und Vimentin nachgewiesen (Kasper und Stosiek, 1989). Die fetalen und präpubertären Gewebe waren hier fast durchwegs für Cytokeratin und Vimentin positiv, lediglich einige Basalzellen waren Vimentin-negativ. Im adulten Nebenhoden des Menschen wurde festgestellt, dass Vimentin im Epithel der Ductuli efferentes sehr gleichmäßig exprimiert wird, und dass kein Unterschied zwischen Zellen mit und ohne Zilien vorliegt. Cytokeratin 17 kommt dagegen überhaupt nicht vor. Die stärkste positive Reaktion trat bei Vimentin im proximalen Corpus des Nebenhodens in der Nähe der Ductuli efferentes auf. Im Verlauf des Nebenhodenganges nahm die Reaktion auf die Vimentin-Antikörper ab. Die Cauda war negativ, mit Ausnahme einiger intraepithelialer Makrophagen und einigen Basalzellen. Cytokeratin hingegen veränderte seine Expression in den einzelnen Abschnitten des Ductus epididymidis nicht. Es ist immunhistochemisch in der ganzen Länge des Nebenhodenganges in den glatten Muskelzellen nachweisbar (Kasper und Stosiek, 1989).

In einer weiteren Arbeit wurde der Gehalt an Vimentin und Cytokeratin im menschlichen Rete testis und Nebenhoden verschiedener prä- und postnataler Altersstufen bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass Cytokeratin hauptsächlich in der apikalen Region des Zytoplasmas der Zellen des Ductus epididymidis vorkommt, während Vimentin eher im basalen Anteil zu finden ist. Allerdings lässt sich dieser Unterschied erst ab einem Alter von zwei Jahren beobachten. Cytokeratin konnte bereits bei zehn Wochen alten Embryonen nachgewiesen werden, Vimentin hingegen erst ab Woche zwölf (Dinges et al., 1991).

Auch im Verlauf des Nebenhodens konnten unterschiedliche Verteilungsmuster der beiden Intermediärfilamente gezeigt werden, wobei Cytokeratin deutlich im Rete testis und den Ductuli efferentes sowie im Ductus deferens dominiert. Vimentin kommt bevorzugt in den distalen Anteilen des Ductus epididymidis vor (Dinges et al., 1991), was den Untersuchungen von Kasper und Stosiek (1989) widerspricht. Palacios et al. (1993) untersuchten ebenfalls die Expression von Intermediärfilamenten, wobei die Befunde zum großen Teil mit jenen von Kasper und Stosiek (1989) übereinstimmen. Die Autoren sind der Ansicht, dass keine Koexpression von Vimentin und Cytokeratin vorliegt, sondern dass Vimentin im Verlauf des Nebenhodens durch Cytokeratin ersetzt wird.

Ein ganz anderes Ergebnis erhielten Wakui et al. (1994) bei ihren Untersuchungen an Rete testis und Epididymis des Hundes. In den Ductuli efferentes ist demnach Cytokeratin nur in Zilienzellen zu finden. Im Nebenhodenkopf und -körper wird das meiste Cytokeratin von Apikalzellen exprimiert, etwas weniger von Haupt- und Basalzellen. Im Nebenhodenschwanz sind die Basalzellen negativ. Vimentin ist laut dieser Untersuchung im Nebenhoden des Hundes in großer Menge nur in den Hauptzellen des Nebenhodenkopfes und in geringer Menge in den Hauptzellen des Nebenhodenkörpers vorhanden.

Eine Studie liegt auch über den Nebenhoden des Katers vor (Sanchez et al., 1998). Demnach kommt Vimentin nicht in Hauptzellen, "schmalen Zellen" und Apikalzellen, dagegen in höherer Menge in Basalzellen und Muskelzellen im gesamten Nebenhoden vor.

Cytokeratin lässt sich in Muskelzellen nicht nachweisen, kommt aber in Basalzellen, schmalen Zellen und Apikalzellen vor (Sanchez et al., 1998).

2.5. Laminin

Die Basalmembran ist aus Protein- und Polysaccharidkomplexen aufgebaut und lässt sich elektronenmikroskopisch weiter unterteilen, in eine Lamina rara interna bzw. Lamina lucida, Lamina densa und Lamina rara externa. Die Lamina densa besteht aus Kollagenfasern, die ihr anliegenden Lamina interna und externa bestehen aus Glykoproteinen wie Fibronectin und Laminin. Laminin ist eine wichtige Komponente der Basalmembran. Es besteht aus drei Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind (Lee et al., 1996).

Laminin und Kollagen IV wurden in den Gonaden männlicher Ratten unterschiedlicher Entwicklungsstufen untersucht. Ab dem 12/13. Gestationstag werden sie in den Wolff'schen Gängen und anderen Organen exprimiert. Zu dieser Zeit ist auch zum ersten Mal eine noch diskontinuierliche Basalmembran in den Organen sichtbar (Gelly et al., 1989).

Zum Zeitpunkt der Geburt wurde Laminin in der durchgehenden Basalmembran von Samenstrang und Ductus epididymidis nachgewiesen. Die positive immunhistochemische Reaktion verstärkte sich während der postnatalen Entwicklung. Außer der Basalmembran färbten sich im adulten Nebenhoden auch die kontraktilen Zellen des Ductus epididymidis an. Diese werden im Verlauf des Nebenhodens zahlreicher. Deshalb reagiert die Cauda epididymidis beim Nachweis von Laminin am stärksten positiv (Gelly et al., 1989).

2.6. Smooth muscle actin (SMA)

Aktin kommt in sechs verschiedenen Isoformen vor, die in ihrer Sequenz große Homologie aufweisen. Außerhalb von Muskelzellen findet man β - und γ -Aktin, im Skelettmuskel das α -sarcomeric Aktin und im Herzmuskel das α -myocardial Aktin. Glatte Muskelzellen enthalten α -smooth muscle- Aktin und γ -Aktin (Vandekerckhove und Weber, 1978).

α -smooth muscle- Aktin ist während der Embryonalphase auch in Herzmuskel- und Skelettmuskelzellen vorhanden (Woodcock-Mitchel et al., 1988). Beim gesunden erwachsenen Tier wird es jedoch nur noch in glatten Muskelzellen, oder Zellen, die mit ihnen in Verbindung stehen, exprimiert (Vandekerckhove und Weber, 1981).

Allerdings kommt es bei pathologischen Prozessen auch bei adulten Individuen außerhalb der glatten Muskelzellen vor, z.B. in Myofibroblasten während der Wundheilung und in Tumoren (Gabbiani, 1992).

Außerdem spielt α -smooth muscle- Aktin eine bedeutende Rolle bei der menschlichen Atherosklerose, die von der Proliferation glatter Muskelzellen gekennzeichnet ist (Turla et al., 1991).

Im Nebenhoden der Ratte konnte Aktin in den Stereozilien der Hauptzellen sowie im Rete testis nachgewiesen werden. Außerdem reagierten die basalen Anteile des Epithels, die Basalmembran sowie die glatten Muskelzellen positiv auf den immunhistologischen Nachweis von Aktin (Francavilla et al., 1983).

2.7. Androgen- Rezeptor (AR)

Androgenrezeptoren vermitteln die Wirkung von Testosteron und seinen Metaboliten. Ihre Expression in verschiedenen Geweben wird direkt durch die Quantität von Androgen gesteuert (Zhu et al., 2000). Androgene können als lipophile Moleküle die Zellmembran praktisch ungehindert passieren und im Zytoplasma den AR binden. Der entstandene Androgen-AR-Komplex wird in den Kern transportiert, wo er die Transkription verschiedener Proteine beeinflussen kann (Carson-Jurica et al., 1990). Androgen-Rezeptoren im Nebenhoden wurden bei vielen verschiedenen Tierarten untersucht. Pujol und Bayard (1979) stellten bei der Ratte die höchste Konzentration an AR im Caput epididymidis, die geringste im Corpus fest. Außerdem wiesen sie nach, dass die Ligatur der Ductuli efferentes keine Auswirkung auf die Konzentration von AR im Ductus epididymidis hat.

Bei der Ratte fand man auch heraus, dass der größte Teil der Dihydrotestosteron (DHT)-Rezeptoren in den Hauptzellen des Nebenhodens lokalisiert ist (Sar und Wilson, 1989). Dies liegt vermutlich daran, dass die 5α -Reduktase, die Testosteron in DHT umwandelt ebenfalls in den Hauptzellen vorkommt (Klinefelter und Amann, 1980). Die Affinität der AR im Nebenhoden des Schafbocks zu Testosteron ist nur 1/10 so stark wie die zu DHT (Tekpetey und Amann, 1988).

Um den Gehalt an Rezeptoren und deren Lokalisation genauer zu bestimmen wurde eine Studie am Schafbock-Epididymis durchgeführt. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die höchste Konzentration an AR-Antikörpern im mittleren und distalen Caput, sowie im mittleren Corpus besteht.

In den Ductuli efferentes war die Immunfärbung für AR schwach bis negativ (Tekpetey et al., 1989).

Diese unterschiedliche Reaktion in den verschiedenen Abschnitten wurde bereits beim Rhesus-Affen (Roselli et al., 1991) und beim Kaninchen (Toney und Danzo, 1988) beschrieben, scheint bei der Ratte aber nicht vorzuliegen (Sar et al., 1990).

Weil die DHT-Rezeptoren in der Fraktion II, die mit Hauptzellen angereichert war, etwa fünf mal so häufig vorkommen, geht man davon aus, dass sie vor allem in den Hauptzellen lokalisiert sind, wobei niedrige Level an AR auch in glatten Muskelzellen und Fibroblasten nachgewiesen wurden (Tekpetey et al., 1989). Ähnliche Ergebnisse ergaben auch Untersuchungen am menschlichen Nebenhoden. Die Autoren betonen, dass sich eine positive Reaktion bei AR durch braun erscheinende Zellkerne ausdrückt. Die Ductuli efferentes sind negativ, die Immunfärbung der Kerne nimmt von proximal nach distal zur Cauda hin ab, manche Epithelzellen sind hier komplett negativ.

Wiederum sind AR vorwiegend in den Hauptzellen vorhanden, Basalzellen reagieren schwach (Ungefroren et al., 1997). Das Ergebnis deckt sich mit Untersuchungen bei der Ratte (Paris et al., 1994) und beim Rhesus-Affen (Roselli et al., 1991).

Im Gegensatz zum Schafbock und zum Menschen sollen jedoch bei Ratten (Sar et al., 1990), Mäusen (Cooke et al., 1991) und Rhesus-Affen (Roselli et al., 1991) Stroma-Zellen positiv reagieren. Bei letztgenannten sowie bei Embryonen von Ratten (Bentvelsen et al., 1995) und Mäusen (Cooke et al., 1991) zeigten auch die Ductuli efferentes eine intensive Immunfärbung.

Am menschlichen Nebenhoden wurde zusätzlich zur Immunhistologie eine In-Situ-Hybridisierung (ISH) durchgeführt, wobei auch hier die Menge an mRNA für Androgen-Rezeptoren im distalen Caput und proximalen Corpus groß war und in den caudalen Anteilen eher niedrig (Ungefroren et al., 1997).

Die Untersuchung des umgebenden Gewebes mittels ISH ergab, dass das Interstitium samt Gefäßen keine AR besitzt. Dies widerspricht einer früheren Theorie, nach der Androgen den epididymalen Blutfluss beeinflusst (Brown und Waites, 1972).

2.8. Östrogen- Rezeptoren (Er α und ER β)

Der Östrogen-Rezeptor liegt in zwei Formen vor: Östrogenrezeptoren ER α und β . Die α - Form kommt hauptsächlich im Uterus vor, die β - Variante in Ovar und Prostata, sowie in geringen Mengen in Uterus, Vagina und Zervix. Beide Rezeptoren werden in Nebenhoden, Hypothalamus, Herz und Lunge exprimiert (Couse et al., 1997).

Im Nebenhoden des Menschen wird der Östrogen-Rezeptor an solchen Bereichen exprimiert, die eine geringe AR-Konzentration enthalten, nämlich in den Ductuli efferentes im Rete testis, Dagegen lässt sich im Nebenhodengang, der einen deutlichen Gehalt an AR aufweist, nur eine sehr schwache immunhistochemische Reaktion auf ER erkennen. Diese Beobachtung lässt sich vermutlich mit der unterschiedlichen embryonalen Herkunft erklären, da die Ductuli efferentes sich aus den Kanälchen des Mesonephros, der Ductus epididymidis sich dagegen aus den Wolff'schen Gängen entwickeln. Außerdem findet sich der Östrogenrezeptor auch in Endothelzellen von Gefäßen im Nebenhoden (Ergün et al., 1997).

Im Nebenhoden der Maus wird ER α in den Epithelzellen der Ductuli efferentes sowie in den Stroma-Zellen exprimiert. ER β kommt nur in den Epithelzellen des Ductus epididymidis vor, und zwar in der ganzen Länge des Nebenhodens. Im Nebenhodengang findet man ER α in Apikalzellen, schmalen Zellen und einigen Basalzellen sowie in den Hauptzellen des Caput. Stroma-Zellen sind im Caput epididymidis negativ, färben sich aber zur Cauda hin mehr und mehr an (Zhou et al., 2002).

2.9. Progesteron- Rezeptoren

Auch bei den Progesteron-Rezeptoren (PR) gibt es zwei Formen: PR-A und PR-B. PR-B besitzt an seinem N-terminalen Ende einen Aminosäureabschnitt, der je nach Tierart unterschiedlich lang ist. Er wirkt im Kern als Transkriptionsaktivator, wogegen PR-A die Transkription aller übrigen Steroidhormonrezeptoren hemmt (Giangrande und Mc Donnell, 1999).

Die Expression von PR wird durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus reguliert, das heißt, je mehr Progesteron vorhanden ist, umso weniger Rezeptoren werden exprimiert (Vu Hai et al., 1977).

Der Gehalt an Progesteron im Nebenhodensekret soll den Spermientransport und die sekretorische Aktivität der Epithelzellen der Ductuli efferentes positiv

beeinflussen. Es kommt im menschlichen Nebenhoden ebenfalls nur in den Ductuli efferentes vor (Ergün et al., 1997).

3. Material und Methodik

3.1. Untersuchungsmaterial

Die untersuchten Nebenhoden stammen von 23 Katern im Alter zwischen 5 Monaten und 10 Jahren, die in der Praxis kastriert wurden.

Alle Tiere waren klinisch gesund, die Nebenhoden erschienen makroskopisch unverändert (siehe Tabelle 3).

3.2. Lichtmikroskopie

Die Nebenhoden wurden zunächst an den Hoden belassen und mit diesen sofort nach der Kastration in Bouin- Lösung (Pikrinsäure, Formalin und Eisessig), bzw. 4% gepuffertem Formol oder Methanol- Eisessig fixiert.

Als beste Methode der Fixierung erwies sich, den Hoden mit Nebenhoden bedeckt zu fixieren und dann vor dem Einbetten den Processus vaginalis zu entfernen.

Die Proben blieben für 24 Stunden in der Bouin-Lösung bzw. einem Methanol- Eisessig-Gemisch. Sie wurden danach für drei Tage in 70%-igen Alkohol verbracht, der täglich gewechselt wurde

Die Hoden, die in 4% gepuffertem Formol eingelegt wurden, wurden eine Woche lang fixiert. Anschließend wurden diese Proben mit PBS-Lösung ausgewaschen und die Hoden mit Nebenhoden in 70%-igen Alkohol verbracht.

Die bedeckten Hoden mit dem Processus vaginalis wurden mit einem Skalpell geteilt, wodurch der Nebenhoden der Länge nach in zwei Hälften getrennt wurde. Aufgrund der anatomischen Form des Nebenhodens lassen sich so Corpus und Cauda gut darstellen. Der Nebenhodenkopf liegt häufig in einer anderen Ebene und musste durch einen zusätzlichen etwas schrägen Schnitt halbiert werden.

Die unbedeckten Hoden wurden mit Messer bzw. Schere vom Bindegewebe des Processus vaginalis befreit. Der Teil, der durch das Ligamentum caudae epididymidis mit dem Nebenhodenschwanz verbunden ist, verblieb an der Probe, um keine Struktur des Nebenhodens zu zerstören.

Danach wurden die Proben in einem Einbettungsautomaten (TP 1020, Fa. Leica) über 24 Stunden zuerst in 80%igen, dann in 96%igen Alkohol zum Schluss in

Isopropylalkohol entwässert, mit Xylol versetzt und anschließend mit Paraffin durchtränkt.

Die so präparierten Hoden wurden in Paraffinblöcke eingegossen. Mit einem Mikrotom (Rotationsmikrotom Leitz 1516) wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträger aufgezogen und auf einem Wärmetisch getrocknet.

3.2.1. Färbungen

Für alle folgenden Färbungen wurden die Schnitte mit Xylol zwei mal zehn Minuten entparaffiniert, durch eine absteigende Alkoholreihe (Isopropanol/ 96%-Alkohol-/ 70%-Alkohol/ Aqua dest.) hydriert, nach der Färbung in umgekehrter Richtung wieder dehydriert und zum Schluss mit Eukitt® eingedeckelt.

Die Rezepte der einzelnen Färbungen sind im Detail im Anhang aufgeführt.

3.2.1.1 Hämalaun-Eosin- Färbung (H.E.) nach Romeis (1989)

Der Schnitt wurde zur Kernfärbung für 15 Minuten in Hämalaun verbracht, kurz mit destilliertem Wasser gespült und anschließend zum Bläuen für fünfzehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Danach wird das Präparat für etwa zehn Minuten in Eosin belassen, vor der Alkoholreihe wird noch einmal kurz mit destilliertem Wasser gespült.

3.2.1.2. Trichromfärbung nach Masson und Goldner nach Romeis (1989)

Nach der Alkoholreihe wurden die Schnitte zehn Minuten in Eisenhämatoxylin nach Weigert belassen, danach mit fließendem Leitungswasser 10 Minuten gespült und für 45 Minuten in Azophloxin gegeben. Nach dem Spülen in 1%iger Essigsäure sowie Aqua dest. wird in Phosphorwolframsäure-Orange-G-Gemisch bis zu 30 Minuten differenziert, im Falle der Nebenhoden in etwa 13-14 Minuten. Im Anschluss folgte wieder ein Spülen in Essigsäure und eine 15-minütige Gegenfärbung mit Lichtgrün. Bei dieser Färbung stellen sich die Zellkerne braun, Zytoplasma rot, Erythrozyten orange-gelb und Bindegewebe sowie saure Mucosubstanzen grün dar.

3.2.1.3 PAS- Reaktion

3.2.1.3.1. PAS- Reaktion nach Mc Manus

Nach der absteigenden Alkoholreihe werden die Schnitte für fünf Minuten in 0,5%-ige wässrige Lösung von Perjodsäure gestellt, danach in Aqua dest. gespült und für 30 Minuten in Fuchsin-schweflige Säure (Schiff'sches Reagenz) verbracht. Anschließend werden die Schnitte drei Mal für jeweils zwei Minuten in SO_2 -Wasser und für 15 Minuten in Aqua dest. gewaschen. Abschließend folgt entweder die aufsteigende Alkoholreihe oder vorher eine Kernfärbung für drei bis fünf Minuten in Hämalaun mit wiederum 15- minütiger Wässerung.

Bei der Oxidation von Chromsäure entstehen Aldehyde und Karbonsäuren, die mit dem Schiff'schen Reagenz nicht nachweisbar sind. Durch Perjodsäure werden auch unsubstituierte Glykole und äquivalente Strukturen zu Aldehyden oxidiert. Die PAS-Reaktion erfasst Mucopolysaccharide, Muco- und Glykoproteine, Glykolipide, ungesättigte Fette und Phospholipide.

3.2.1.3.2. PAS- Reaktion mit Amylase

Auf die Schnitte werden hierbei in der feuchten Kammer jeweils 100 μl 0,5%-ige Amylase pipettiert und diese dann für zehn Minuten bei 37°C im Trockenschrank belassen. Bei den noch positiv reagierenden Substanzen handelt es sich nicht um Glykogen.

3.2.1.4. Alcianblau- Färbung

Von jedem Block werden zwei Schnitte benötigt

Einer wird drei Minuten in 3%-ige Essigsäure gegeben, 30 Minuten in Alcianblau (pH 2,5) gefärbt und mit Aqua dest. gespült. Anschließend wird fünf Minuten in Kernechtrot gefärbt und wieder gespült, danach folgt die aufsteigende Alkoholreihe. Saure Mucosubstanzen sind leuchtend blau, Kerne hellrot und der Hintergrund rosa. Karboxyl- und Sulfatgruppen können nur durch folgende Methoden differenziert werden:

- 1.) Senken des pH- Wertes der Farbstofflösung führt zu Unterdrückung der Dissoziation der Karboxylgruppen. Somit steuern nur Sulfatgruppen negative Valenzen zur Färbung bei.

2.) Bei höherem pH- Wert kann die Dissoziation der Karboxylgruppe durch Zusatz unterschiedlicher Konzentrationen eines anderen Elektrolyts unterdrückt werden, auch hier sind nur Sulfatgruppen färbbar.

In diesem Fall wurde der pH-Wert gesenkt.

Der zweite Schnitt wurde drei Minuten in 0,1 N HCl belassen, danach in Alcianblau (pH 1,0) gefärbt und wiederum in HCl gespült.

3.3. Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden drei Nebenhoden von Katern zwischen acht Monaten und einem Jahr verwendet. Sie wurden in Karnovsky- Lösung fixiert (2% Paraformaldehyd, 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer, pH 7,2). Die Fixierung wurde vor der Kastration angesetzt und in zwölf Eppendorf-Gefäße aufgeteilt. Erst nach Beendigung der OP wurde der Processus vaginalis vom Hoden entfernt. Die Aufteilung des Nebenhodens in Ductuli efferentes und Segmente 1-5 erfolgte entsprechend den Ergebnissen der Lichtmikroskopie mit einem Skalpell. Die einzelnen Abschnitte wurden mit Rasierklingen auf einer Wachsplatte in einem Tropfen Fixierer in ca. 1x1x1 mm große Stücke geteilt und mit einer Pinzette in Eppendorf –Gefäße mit Karnovsky- Fixierung bei 4°C gegeben. Am nächsten Tag wurde die Fixierungslösung abpipettiert und durch Cacodylat-Puffer (0,1M, pH7,4) ersetzt.

Zur Kontrastierung wurden die Proben zwei Stunden lang mit 1% Osmiumtetroxid und 1,5% Kaliumferrocyanid behandelt, danach folgte dreimaliges Waschen in Cacodylat-Puffer und die Dehydratation in aufsteigender Alkoholreihe. Hierauf folgt das Einbetten in Epon. Dafür werden die Proben zuerst in reines Propylenoxid gegeben und der Epongehalt langsam gesteigert:

- 2 x 15 Minuten Propylenoxid
- 1 Stunde Propylenoxid: Epon im Verhältnis 2:1
- über Nacht Propylenoxid: Epon im Verhältnis 1:1
- 1 Stunde Epon

Als nächstes wurden die Proben in Gelatinekapseln gefüllt und mit Epon überschichtet. Als letzter Schritt folgte eine 24-stündige Polymerisierung des Epon bei 60°C im Wärmeschrank.

3.4. Immunhistologie

In Tabelle 2 dargestellte Primärantikörper wurden mit der Avidin-Biotin-Methode (Guesdon et al., 1979, Hsu et al., 1981) zur Darstellung der Antigene an Methanol-eisessig-, Formol- oder Bouin-fixierten Paraffinschnitten verwendet.

Bei der Avidin-Biotin-Methode bindet ein mit Biotin gekoppelter Sekundärantikörper an einen Primärantikörper, welcher seinerseits gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet ist.

Das dritte Reagenz ist ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex, der an das Biotin des Sekundärantikörpers bindet.

Die Protokolle für die immunhistologischen Nachweise sind im Anhang angegeben.

Tab. 2

Übersicht über die verwendeten Antikörper

<u>Primär-AK</u>	<u>Fixierung</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Vorbehandlung</u>	<u>Sekundär-AK</u>
Laminin 734, Nr.88	Methanol-Eisessig	Huhn	1:500	0,1%Protease(121) 30 min RT	Anti Huhn IgG biot. vom Kaninchen (99), Rockland (1:400!)
PanCytokeratin plus, Biokarta CM162, Nr. 132	Bouin, Methanol-Eisessig oder Formalin	Maus	1:100	Trypsin (158) 30 min RT	Anti Maus IgG biot. vom Kaninchen, Dako (Hamburg)

Progesteron-Rezeptor , Becman coulter 1546, Nr. 157	Bouin, Methanol- Eisessig oder Formalin	Maus	1:100	In Citratpuffer in Mikrowelle, 3 x 10 min bei 750 W	Anti Maus IgG biot. vom Kaninchen, Dako (Hamburg)
SMA ("Smooth muscle actin"), Dako M0851, Nr. 162	Bouin, Methanol- Eisessig oder Formalin	Maus	1:40 1Std. bei RT		Anti Maus IgG biot. vom Kaninchen, Dako (Hamburg)
VEGF ("Vascular endothelial growth factor") #21, Schams, Nr. 115	Methanol- Eisessig	Kaninchen	1:800 1:200 1:100		Anti Kaninchen IgG biot. vom Schwein, Dako (Hamburg)
VEGF-Rezeptor 2 (KDR), Sigma V3003, Nr. 140	Methanol- Eisessig	Maus	1:50		Anti Maus IgG biot. vom Kaninchen, Dako (Hamburg)
Östrogen- Rezeptor α , ERalpha (H- 184) Santa Cruz 7207, Nr. 155	Bouin	Kaninchen	1:400	In Citratpuffer in Mikrowelle, 3 x 10 min bei 750 W	Anti Kaninchen IgG biot. vom Schwein, Dako (Hamburg)
GPS I, GHR ("Growth hormone receptor"), Nr. 128	Bouin, Methanol- Eisessig oder Formalin	Meerschwein- chen	1:300		Anti Meerschwein IgG biot. von der Ziege (135) Vector
Vimentin , Dako M7020, Nr. 154	Bouin, Methanol- Eisessig oder Formalin	Maus	1:500	0,1%Protease(121) 15 min RT	Anti Maus IgG biot. vom Kaninchen, Dako (Hamburg)
Androgen- Rezeptor , Nr. 156	Bouin	Kaninchen	1:10	In Citratpuffer in Mikrowelle, 3 x 10 min bei 750 W	Anti Kaninchen IgG biot. vom Schwein, Dako (Hamburg)

Tab. 3

Liste der für die Lichtmikroskopie und Immunhistologie verwendeten Nebenhoden

Nummer	Datum	Alter	Fixierung
264/03	03.03.03	5 Monate	Methanol-Eisessig
265/03	03.03.03	5 Monate	Methanol-Eisessig
266/03	03.03.03	5 Monate	Methanol-Eisessig
267/03	03.03.03	5 Monate	Methanol-Eisessig
125/03	03.02.03	6 Monate	Bouin
126/03	03.02.03	6 Monate	Bouin
127/03	03.02.03	6 Monate	Bouin
128/03	03.02.03	6 Monate	Bouin
260/03	17.02.03	6 Monate	Bouin
261/03	17.02.03	6 Monate	Bouin
262/03	17.02.03	6 Monate	Bouin
263/03	17.02.03	6 Monate	Bouin
268/03	11.03.03	6 Monate	Methanol-Eisessig
269/03	11.03.03	6 Monate	Methanol-Eisessig
270/03	11.03.03	6 Monate	Methanol-Eisessig
271/03	11.03.03	6 Monate	Methanol-Eisessig
280/03	13.03.03	6 Monate	Methanol-Eisessig
281/03	13.03.03	6 Monate	Methanol-Eisessig
282/03	13.03.03	6 Monate	Methanol-Eisessig
283/03	13.03.03	6 Monate	Methanol-Eisessig
248/03	13.02.03	7 Monate	Formol
249/03	13.02.03	7 Monate	Formol
250/03	13.02.03	7 Monate	Formol
251/03	13.02.03	7 Monate	Formol
22/03	08.01.03	8 Monate	Bouin
23/03	08.01.03	8 Monate	Bouin
24/03	08.01.03	8 Monate	Bouin
25/03	08.01.03	8 Monate	Bouin
61/03	18.01.03	8 Monate	Bouin
62/03	18.01.03	8 Monate	Bouin
63/03	18.01.03	8 Monate	Bouin
64/03	18.01.03	8 Monate	Bouin
93/03	20.01.03	8 Monate	Bouin
94/03	20.01.03	8 Monate	Bouin
95/03	20.01.03	8 Monate	Bouin
96/03	20.01.03	8 Monate	Bouin
272/03	11.03.03	8 Monate	Methanol-Eisessig
273/03	11.03.03	8 Monate	Methanol-Eisessig
274/03	11.03.03	8 Monate	Methanol-Eisessig
275/03	11.03.03	8 Monate	Methanol-Eisessig
18/03	08.01.03	9 Monate	Bouin
19/03	08.01.03	9 Monate	Bouin
20/03	08.01.03	9 Monate	Bouin
21/03	08.01.03	9 Monate	Bouin
52/03	13.01.03	9 Monate	Bouin

54/03	13.01.03	9 Monate	Bouin
55/03	13.01.03	9 Monate	Bouin
56/03	13.01.03	9 Monate	Bouin
110/03	28.01.03	9 Monate	Bouin
111/03	28.01.03	9 Monate	Bouin
112/03	28.01.03	9 Monate	Bouin
113/03	28.01.03	9 Monate	Bouin
191/03	11.02.03	10 Monate	Bouin
192/03	11.02.03	10 Monate	Bouin
193/03	11.02.03	10 Monate	Bouin
194/03	11.02.03	10 Monate	Bouin
97/03	21.01.03	12 Monate	Bouin
98/03	21.01.03	12 Monate	Bouin
99/03	21.01.03	12 Monate	Bouin
100/03	21.01.03	12 Monate	Bouin
106/03	28.01.03	18 Monate	Formol
107/03	28.01.03	18 Monate	Formol
108/03	28.01.03	18 Monate	Formol
109/03	28.01.03	18 Monate	Formol
114/03	31.01.03	18 Monate	Bouin
115/03	31.01.03	18 Monate	Bouin
116/03	31.01.03	18 Monate	Bouin
117/03	31.01.03	18 Monate	Bouin
187/03	13.02.03	18 Monate	Bouin
188/03	13.02.03	18 Monate	Bouin
189/03	13.02.03	18 Monate	Bouin
190/03	13.02.03	18 Monate	Bouin
276/03	12.03.03	3 Jahre	Methanol-Eisessig
277/03	12.03.03	3 Jahre	Methanol-Eisessig
278/03	12.03.03	3 Jahre	Methanol-Eisessig
279/03	12.03.03	3 Jahre	Methanol-Eisessig
57/03	13.01.03	10 Jahre	Bouin
58/03	13.01.03	10 Jahre	Bouin
59/03	13.01.03	10 Jahre	Bouin
60/03	13.01.03	10 Jahre	Bouin

4. Ergebnisse

4.1. Lichtmikroskopische Untersuchungen des Nebenhodens

Der Nebenhoden liegt der Länge nach dem Hoden an seiner Margo epididymidis an. Er ist mit dem caudalen Hodenanteil durch das Ligamentum testis proprium verbunden. Makroskopisch ist die Gliederung in Caput, Corpus und Cauda leicht erkennbar, sowie der Umschlagspunkt am Nebenhodenschwanz in den stark geschlängelten Samenleiter. Dieser bildet zusammen mit den Hodengefäßen den Samenstrang.

Mikroskopisch lassen sich durch Beurteilung des Lumendurchmessers des Nebenhodenganges, sowie Höhe des Epithels und dessen Oberflächenbesatz beziehungsweise Vorkommen bestimmter Zellen fünf Segmente unterscheiden. Der Nebenhodenkopf wird von den Ductuli efferentes und den Abschnitten eins und zwei gebildet, außerdem enthält er Anteile von extratestikulärem Rete testis. Die Segmente drei und vier bilden die Grundlage des Nebenhodenkörpers, Segment fünf entspricht dem Nebenhodenschwanz.

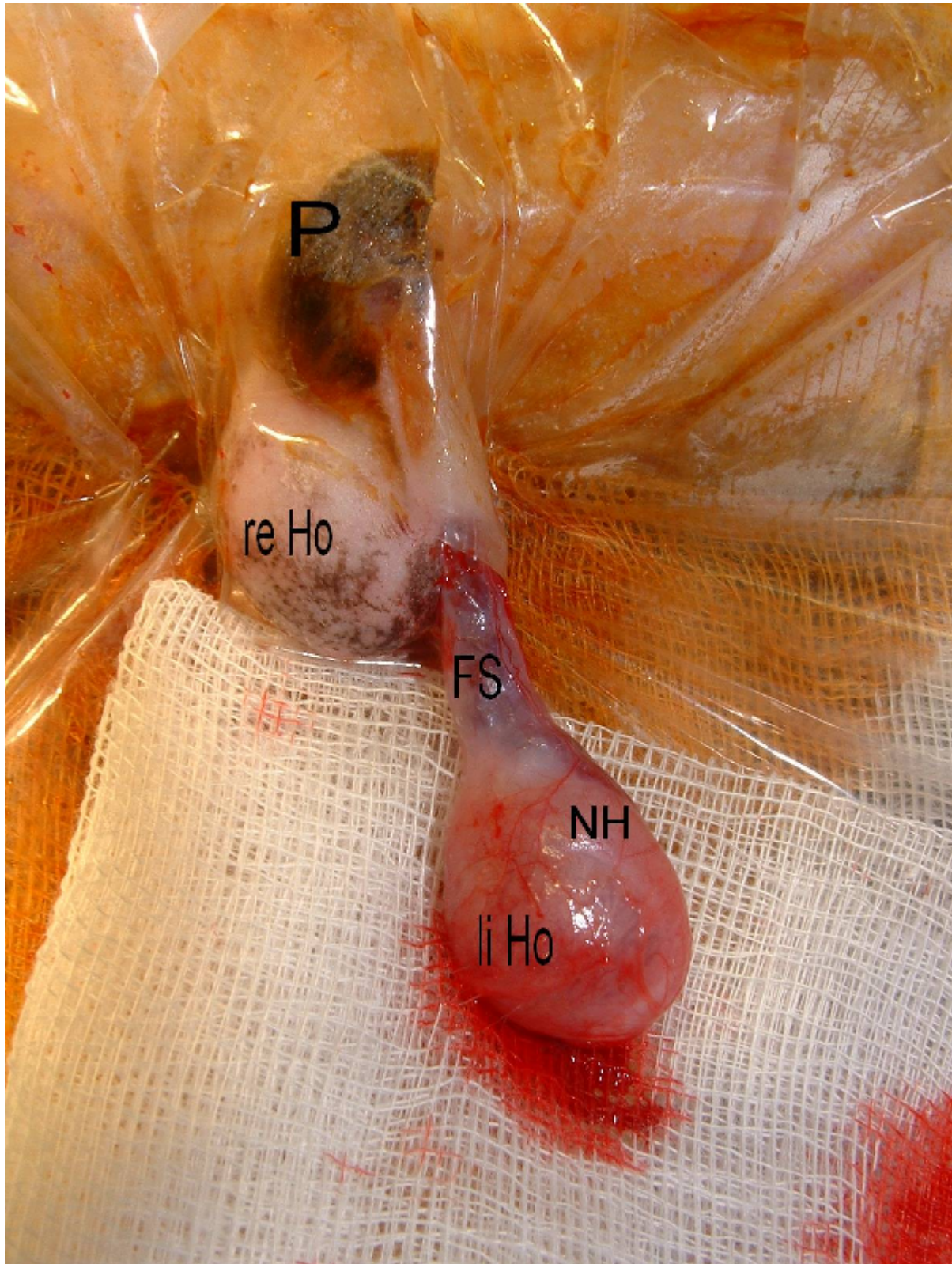


Abb. 2

In situ: linker Hoden (li Ho) und Nebenhoden (NH) sind vom Processus vaginalis umgeben. Der Funiculus spermaticus (FS) ist noch bedeckt. Der rechter Hoden (re Ho) liegt im Skrotum, darüber ist das Präputium (P) erkennbar.

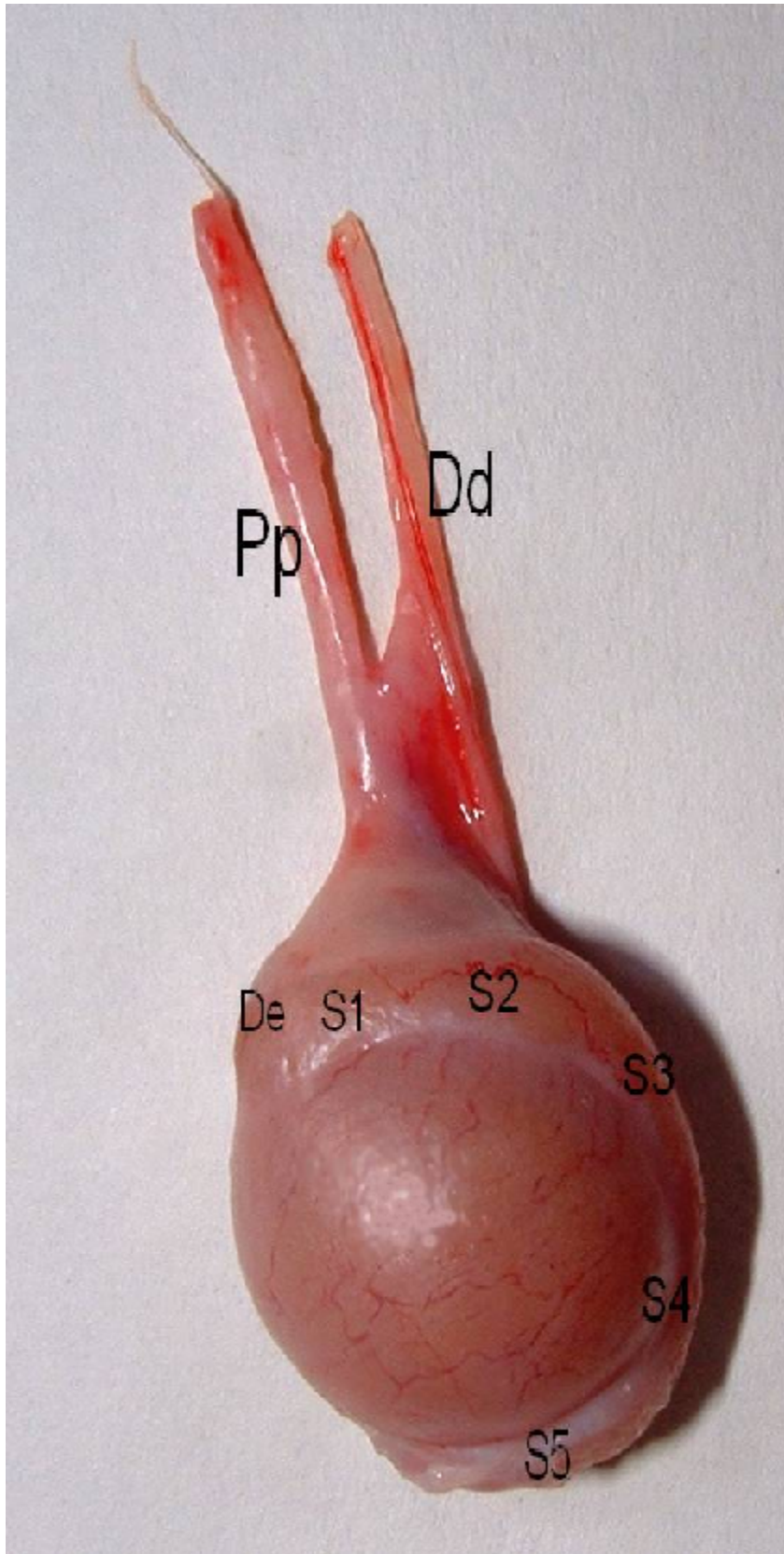


Abb. 3

Hoden und Nebenhoden ohne Processus vaginalis, Plexus pampiniformis (Pp) vom Ductus deferens (Dd) getrennt.

Lage der Ductuli efferentes (De) und der Segmente 1 bis 5 (S1-5)



Abb. 4

Umschlagspunkt des Nebenhodenschwanzes (NHS) in den geschlängelten Ductus deferens (Dd) am kaudalen Hodenpol (—→).

4.1.1. Ductuli efferentes

Die Ductuli efferentes verbinden das Rete testis mit dem Ductus epididymidis. Sie bilden den proximalen Anteil des Nebenhodenkopfes. Sie werden von einem einschichtigem, iso- bis hochprismatischem Epithel ausgekleidet. Das Epithel ist mit durchschnittlich 14,4 μm wesentlich niedriger als im Nebenhodengang, auch das Lumen ist meist deutlich kleiner. Es kommen Ductuli mit verschiedenen großen Lumina vor, die durchschnittlich 94,5 μm , 40,5 μm und 27 μm messen, wobei die kleinsten mit Abstand am häufigsten sind.

Zwei verschiedene Arten von Zellen bilden das Epithel der Ductuli efferentes, nämlich Zellen mit Kinozilien von etwa 13,5 μm Länge und Zellen mit einem kurzen apikalen Bürstensaum.

Bei verschiedenen Färbungen lässt sich eine unterschiedliche Reaktion der beiden Zellarten feststellen. Auch die Form des Kerns ist nicht gleich. Die Zilienzellen besitzen einen längsovalen Kern, jener der Zellen mit Bürstensaum ist rund bis queroval. Alle Kerne enthalten einen oder mehrere Nucleoli.

Im Lumen der Ductuli efferentes finden sich regelmäßig Epithelzellen und Spermien.

Außen schließt sich eine dünne Muskelschicht an. Das Interstitium ist im Bereich der Ductuli efferentes gut entwickelt und vaskularisiert, die Gefäße sind jedoch meist von geringem Durchmesser.

Als Besonderheit in diesem Abschnitt ist das Vorkommen eines extratestikuläre Rete testis, sowie das regelmäßige Auftreten von Leydig Zellen zu nennen, die beide auf eine funktionelle und topographische Verbindung zum Hoden hinweisen.

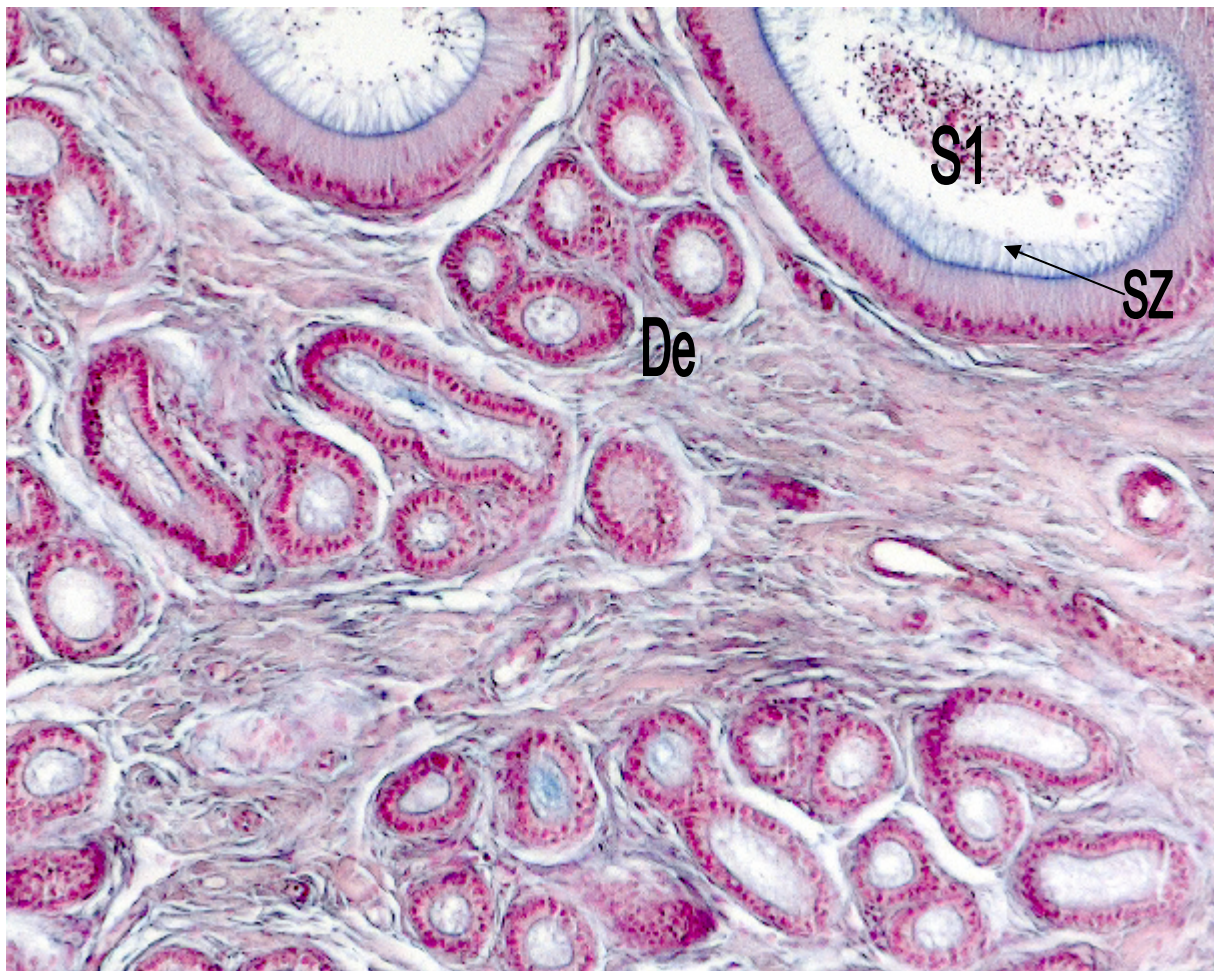


Abb. 5

Übergang der iso- bis hochprismatischen Ductuli efferentes (De) in das hochprismatische Epithel Ductuli efferentes in Segment 1 (S1) des Ductus epididymidis mit Stereozilien (SZ), Alcianblau-Färbung (pH 2,5), 165 x



Abb. 6

Ductuli efferentes, Zellen mit Kinozilien (KZ) und länglichem Kern, sowie Zellen mit Mikrovillibesatz (Mv) mit rundem Kern, umgeben von dünner Muskelschicht (MZ), Goldner, 695x

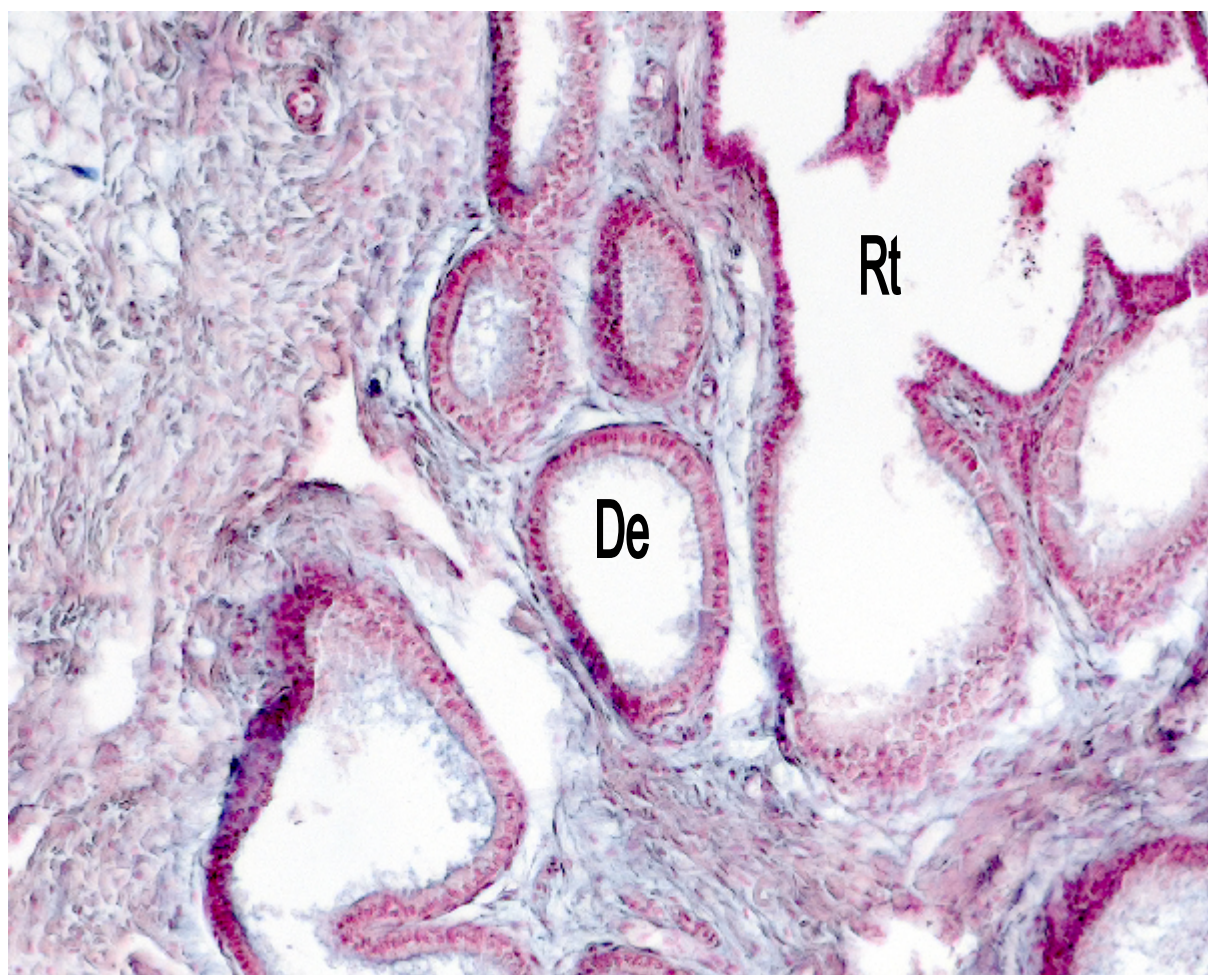


Abb.7

Übergang des Rete testis (Rt) in die Ductuli efferentes (De), Alcianblau-Färbung (pH 2,5), 200 x

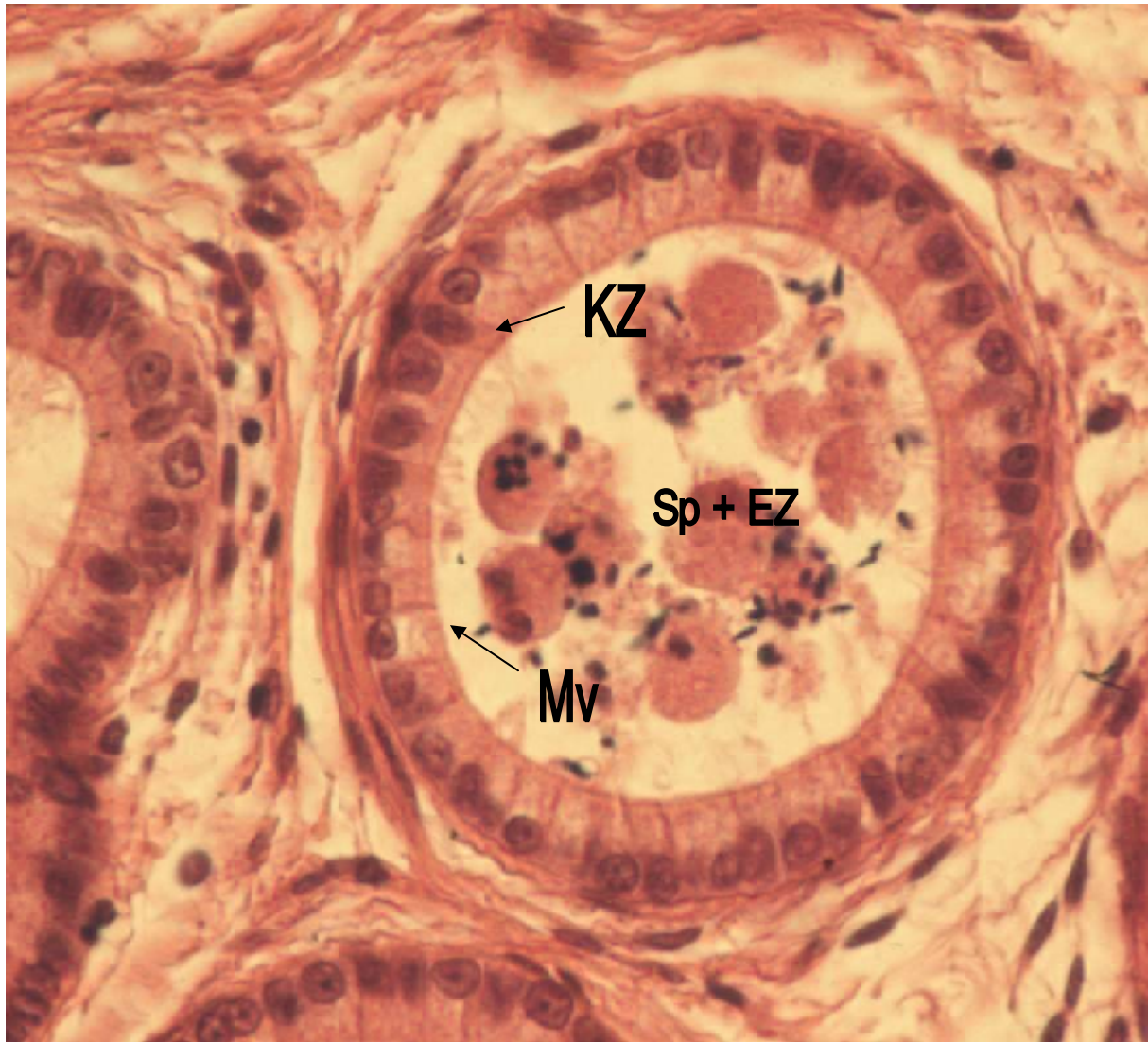


Abb.8

Ductuli efferentes, Zellen mit Kinozilien (KZ) mit länglichem Kern und zilienlose Zellen mit Mikrovilli (MV) mit rundem Kern, intraluminal Spermien (Sp) sowie abgeschilferte Epithel- und Keimzellen (EZ) (HE), 890 x

4.1.2. Segment 1 des Ductus epididymidis

Segment 1 bildet den Anfangsabschnitt des Ductus epididymidis und ist deutlich von den Ductuli efferentes zu unterscheiden. Das Epithel ist mehrreihig und hochprismatisch. Seine Höhe beträgt durchschnittlich 38,8 µm.

Das Lumen des Nebenhodenganges ist meist weiter als in den Ductuli efferentes, aber auch hier sehr unterschiedlich. Im Mittel misst das Lumen 53 µm, es kommen jedoch Abweichungen von +/- 25 µm vor. Die meisten Hauptzellen sind mit etwa 16 µm langen Stereozilien besetzt, einige zeigen auch Protrusionen des Zytoplasmas. Außerdem kommen Basalzellen vor, die durch ihren queroval der Basallamina anliegenden Kern gekennzeichnet sind. Des Weiteren sieht man Lymphozyten, die kugelförmige bis längsovale Gestalt haben und sich auch im basalen Anteil des Epithels finden.

Der Kern der Hauptzellen ist längsoval und befindet sich in der Nähe der Basallamina. Er enthält meist mehrere Nucleoli.

Spermien sowie Epithelzellen sind im Lumen des Ganges nur vereinzelt zu erkennen. Die Muskulatur der Wand des Ductus epididymidis besteht aus mindestens zwei, manchmal auch drei Lagen glatter Muskelzellen. Im Interstitium kommen neben Fibrozyten auch Lymphozyten und Makrophagen vor.

Eine Besonderheit des Segments 1 sind die apikalen Verbindungen der Hauptzellen, die "Junctional complexes", die sich vor allem mit der Alcian-Blau-Färbung gut darstellen lassen.



Abb. 9

Segment 1 des Ductus epididymidis mit Mitose (→) der Epithelzellen; längliche Muskelzellen (MZ) umgeben des Ductus epididymidis, deutlich erkennbar auch die querovalen Kerne der Basalzellen (BZ), HE, 430 x

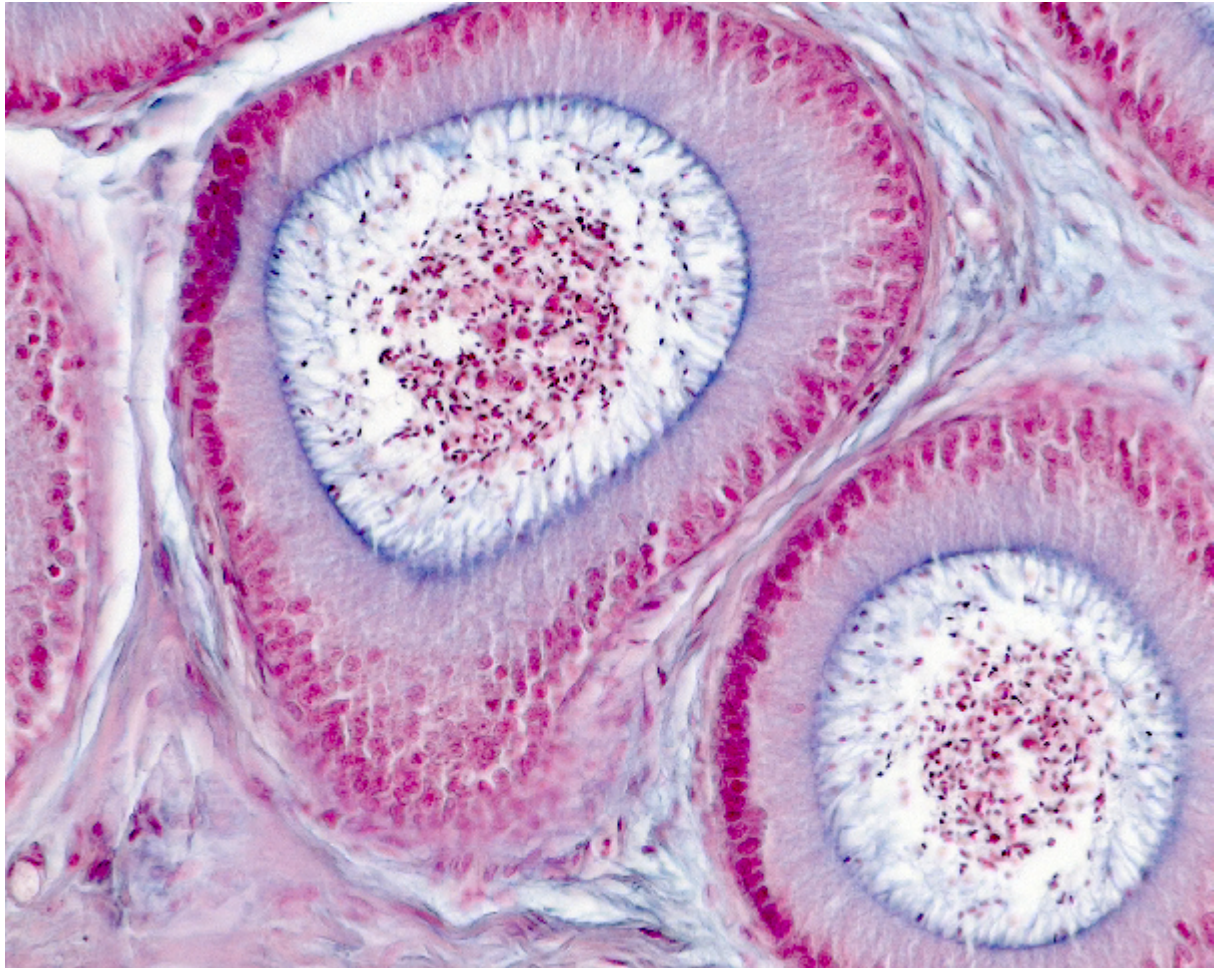


Abb. 10

Segment 1 des Ductus epididymidis, Spermien und Epithelzellen im Lumen, Alcianblau-Färbung (pH 2,5), 340 x

4.1.3. Segment 2 des Ductus epididymidis

Das zweite Nebenhoden-Segment (S2) bildet den distalen Nebenhodenkopf

Das Epithel ist hochprismatisch, allerdings mit 32 μm etwas weniger hoch als das des vorherigen Segments und meist zwei- manchmal auch dreireihig.

Das Lumen des Nebenhodenganges ist an dieser Stelle relativ einheitlich 52,2 μm groß. Die Hauptzellen sind mit 20 μm langen Stereozilien besetzt. Teilweise kommen auch hier wieder Protrusionen des Zytoplasmas vor. Neben den Hauptzellen sind regelmäßig Basalzellen ausgebildet. Lymphozyten kommen nur selten vor. Die Kerne der Basalzellen sind hier etwas runder als im vorigen Segment, liegen aber auch hier der Basallamina parallel an. Der Kern der Hauptzellen ist rundoval und liegt in der

Nähe der Basalmembran. Alle Kerne besitzen zwei oder mehrere Nucleoli. Im Lumen kommen Spermien und Epithelzellen nur vereinzelt vor.

Die umgebende Muskulatur besteht aus mindestens zwei Lagen. Das Interstitium ist gut vaskularisiert, außerdem finden sich hier viele Fibrozyten sowie Lymphozyten. Charakteristisch für Segment 2 sind die Apikalzellen, die einen langen keulenförmigen Kern besitzen, und vor allem am Übergang zum Corpus gehäuft auftreten.

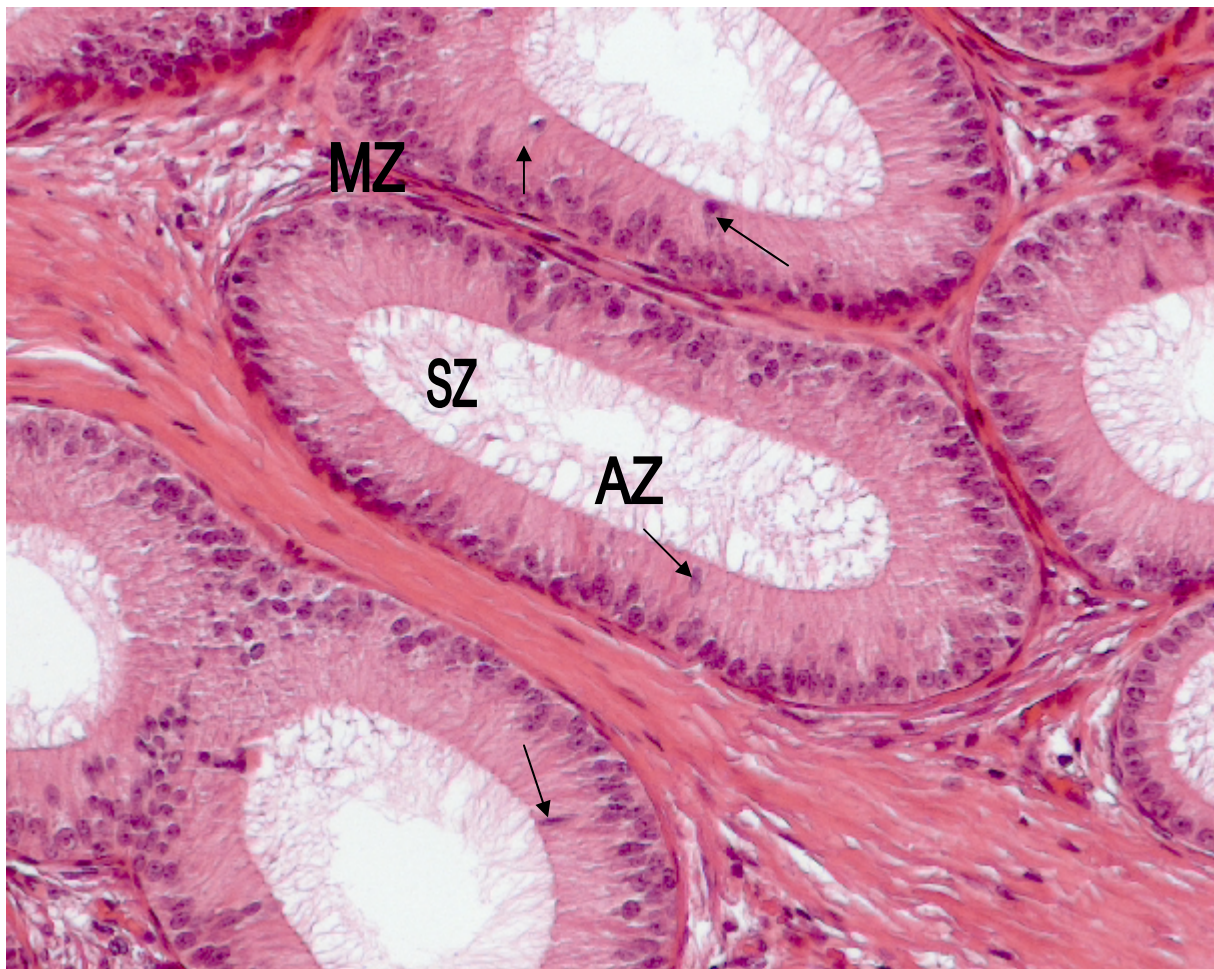


Abb. 11

Segment 2 des Ductus epididymidis mit Apikalzellen (AZ →), Muskelzellen (MZ) und Stereozilien (SZ) der Hauptzellen, HE, 310 x

4.1.4. Segment 3 des Ductus epididymidis

Der Übergang vom Nebenhodenkopf zum ersten Abschnitt des Corpus ist relativ fließend. Hier ist das Epithel zwei- oder hauptsächlich im Anfangsabschnitt, durch Apikalzellen dreireihig. Das Epithel ist hier durchschnittlich 43 μm hoch, das Lumen misst 44,5 μm . Die Hauptzellen sind mit 5,1 μm kurzen Stereozilien besetzt. Außer den Hauptzellen treten auch hier Basalzellen und Lymphozyten auf. Der Kern der Hauptzellen hat eine rundliche bis ovale Form, der Kern der Basalzellen ist rund. Meist sind innerhalb des Kerns ein oder zwei Nucleoli vorhanden. Vor allem in der Alcianblau-Färbung lässt sich erkennen, dass das Zytoplasma oberhalb des Kerns verdichtet ist. Im Lumen sind verhältnismäßig wenige Spermien zu finden, teilweise bilden sich jedoch kleine Konglomerate. Die glatte Muskulatur besteht zumeist aus drei Lagen. An der hodenzugewandten Seite des Nebenhodens finden sich gehäuft Gefäße.

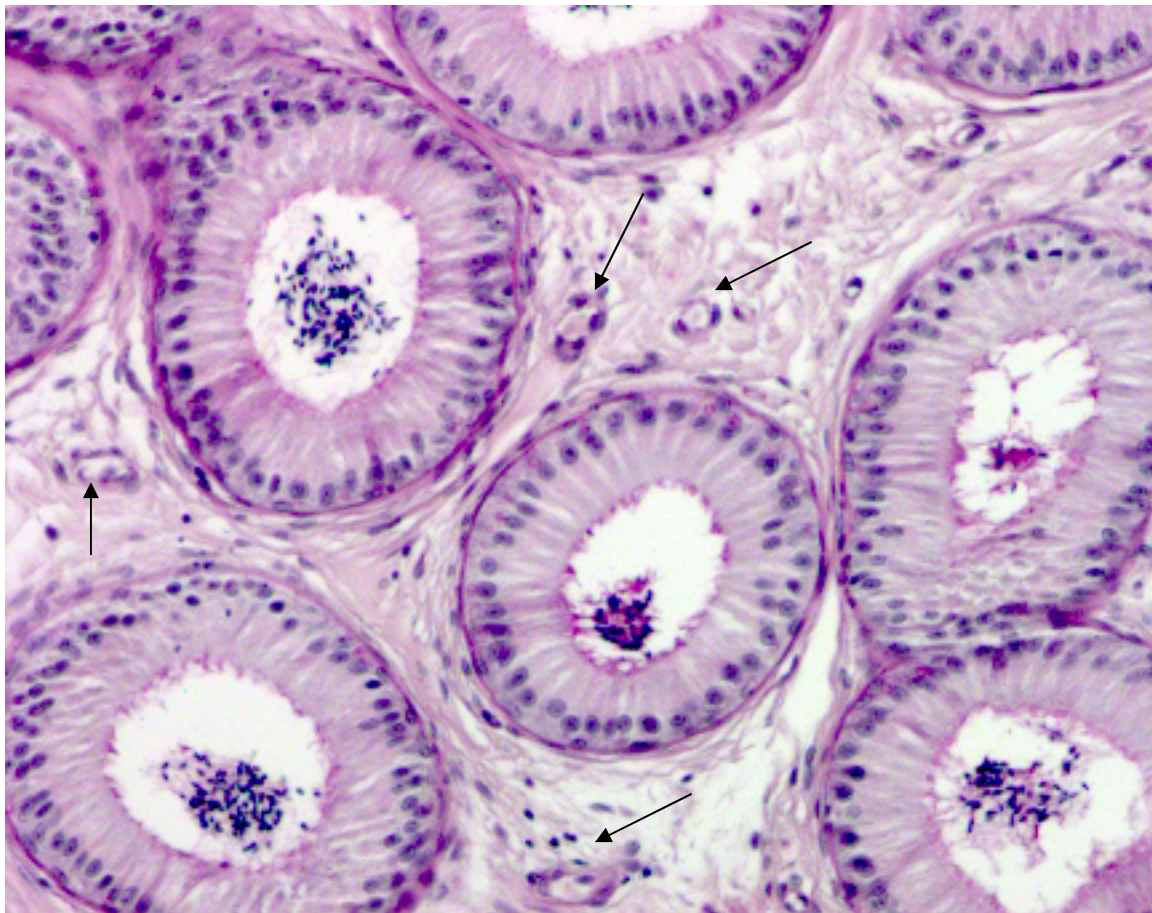


Abb. 12

Segment 3 des Ductus epididymidis mit Spermienkonglomeraten im Lumen, Blutgefäße (\rightarrow) im Interstitium, PAS-Färbung, 230 x

4.1.5. Segment 4 des Ductus epididymidis

Das Epithel ist in diesem Abschnitt sehr unterschiedlich hoch. Im Durchschnitt misst es 38,7µm. Das Lumen hat einen Durchmesser von etwa 60 µm, es kommen aber Lumina zwischen 45 und 81 µm vor. Im zweiten Abschnitt des Corpus ist das Epithel zweireihig und besteht aus Hauptzellen, Basalzellen und Lymphozyten. Die meisten Zellen sind mit kurzen Stereozilien (5,4 µm) besetzt. Der Kern der Basalzellen ist in diesem Segment rund, genau wie bei einem Großteil der Hauptzellen. Es finden sich aber Anschnitte des Nebenhodenganges in denen vereinzelt oder auch gehäuft Hauptzellen mit langgestrecktem, ovalem Kern auftreten. Meist haben diese langgestreckten Zellen auch den längeren Stereozilienbesatz. Auch Protrusionen des Zytoplasmas sind hier im Vergleich Segment 3 wieder verstärkt vorhanden. Die ovalen Kerne liegen innerhalb der Zelle etwas weiter lumenwärts als die runden, beide liegen jedoch in der Nähe der Basalmembran. Meist sind zwei Nucleoli vorhanden. Das Lumen des Ductus epididymidis enthält häufig Spermien sowie einige abgeschilferte Epithelzellen. Hier ist deutlich zu erkennen, dass die Dicke der Muskulatur nach distal zunimmt, man findet mindestens vier bis fünf Lagen, die als eine ca. 6 µm dicken Schicht das Epithel des Nebenhodenganges umgeben. Das Interstitium enthält viele Fibrozyten, Lymphozyten und Mastzellen. Das gesamte Gewebe erscheint verglichen mit den vorherigen Segmenten locker strukturiert. Typisch für Segment 4 des Nebenhodens sind die intraepithelialen Hohlräume. Sie stellen sich lichtmikroskopisch als große weiße Blasen innerhalb des Epithels dar. In diese Hohlräume ragen Stereozilien hinein. Gelegentlich sind Spermien darin zu beobachten. Diese Besonderheit tritt ausschließlich in Segment 4 auf, allerdings von Tier zu Tier in sehr unterschiedlichem Ausmaß. Teilweise ist unter den gesamten Anschnitten des Nebenhodenganges nur ein einziger intraepithelialer Hohlraum zu finden, teilweise hat jeder Abschnitt mehrere.

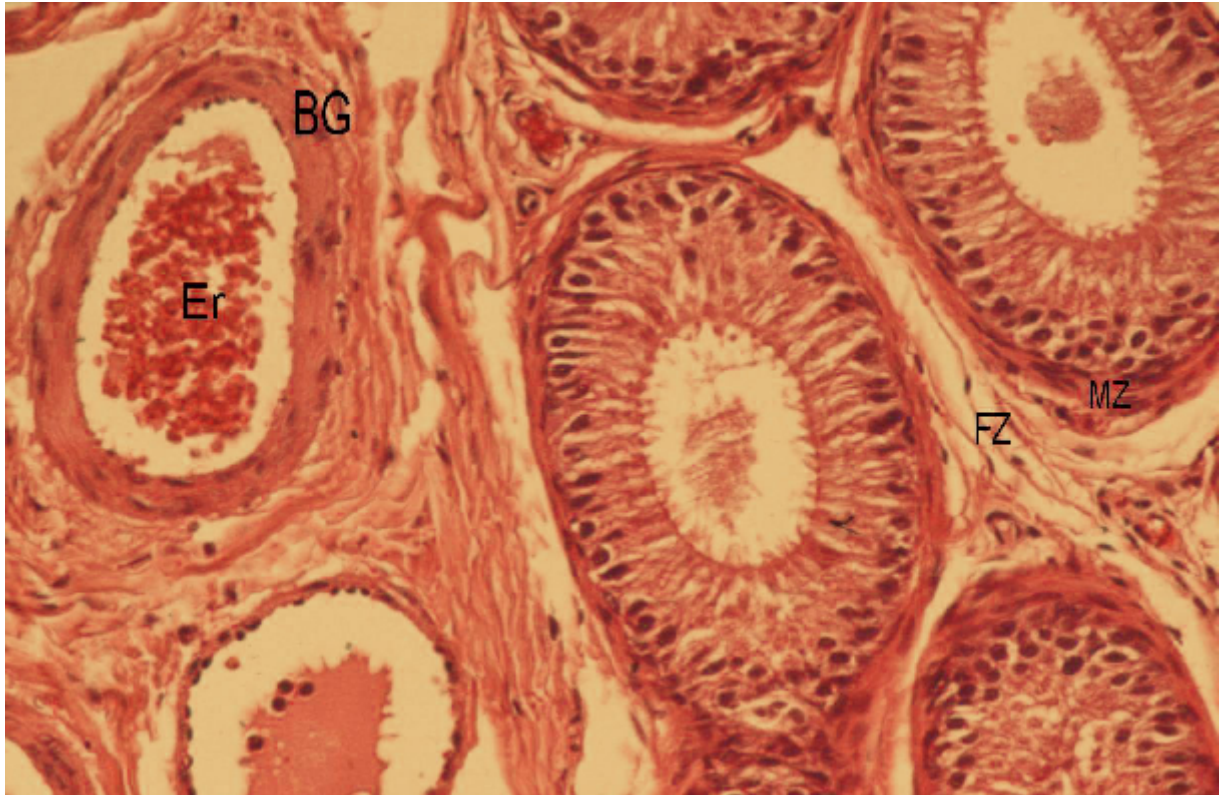


Abb.13

Im Segment 4 hat die glatte Muskelschicht (MZ) des Ductus epididymidis auf ca. 6 μm zugenommen. Daneben ist ein dickwandiges Blutgefäß (BG) mit deutlich erkennbaren Erythrozyten (Er) zu sehen, im Interstitium Fibrozyten (HE), 280 x

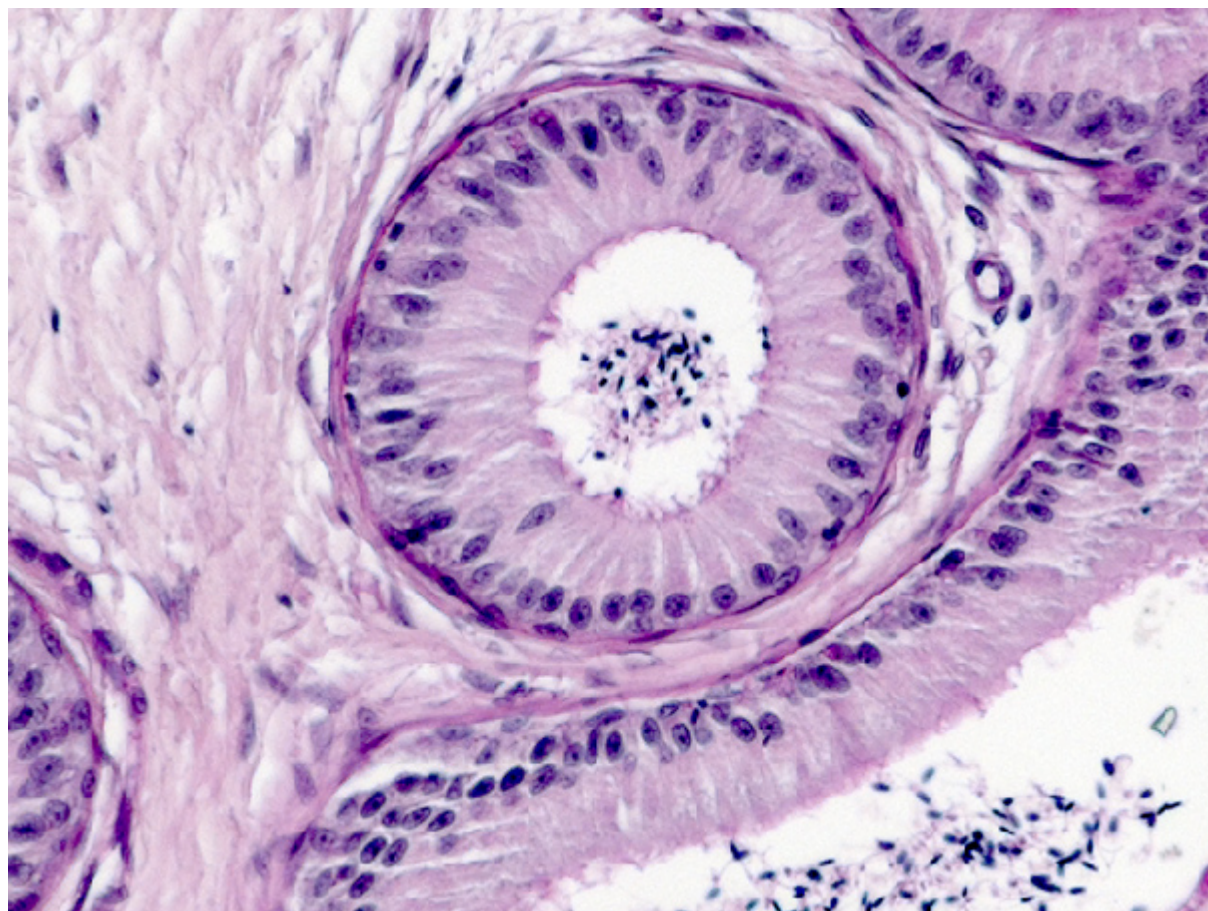
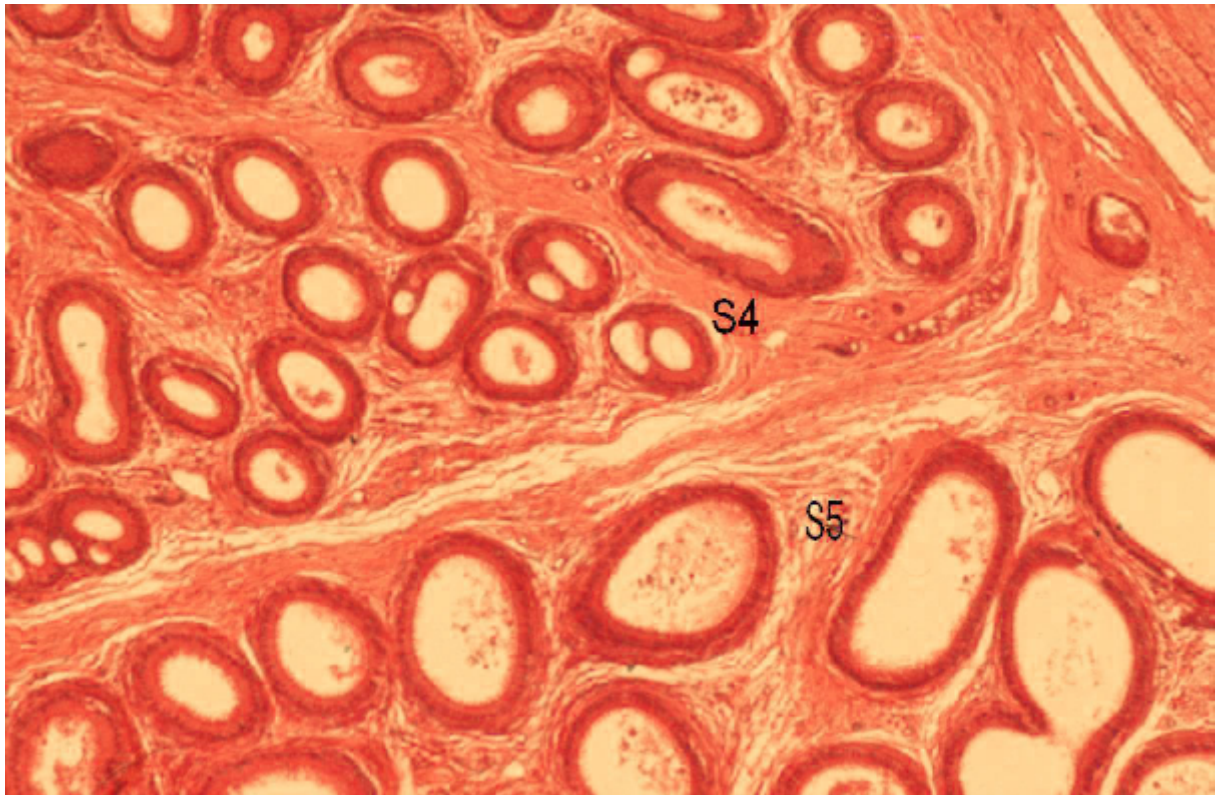


Abb. 14

Segment 4 des Ductus epididymidis, PAS- Färbung, 400 x

**Abb.15**

Übergang Segment 4-Segment 5 des Ductus epididymidis: Intraepitheliale Hohlräume in Segment 4, wenige Spermien, Segment 5 mit größerem Lumen, massenhaft Spermien (HE), 70 x

4.1.6. Segment 5 des Ductus epididymidis

Segment 5 bildet den Nebenhodenschwanz des Katers. Der Übergang von Segment 4 zum Schwanz ist immer besonders deutlich und meist schon makroskopisch zu erkennen. Dies liegt an dem wesentlich weiteren Lumen beziehungsweise dem mit durchschnittlich 29,7 μm niedrigerem Epithel. Dennoch ist das Epithel noch immer hochprismatisch und zwei- beziehungsweise dreireihig. Das Lumen stellt sich meist oval dar und misst zwischen 149 x 108 μm bis zu 540 x 337 μm .

Hauptsächlich besteht das Epithel aus Haupt- und Basalzellen. Es finden sich im Nebenhodenschwanz aber, wie im Segment 2, Apikalzellen. Im Unterschied zu Segment 2 besitzen die Apikalzellen jetzt einen runden Kern. Der Zellbesatz besteht aus gleichmäßig kurzen Stereozilien mit ca. 5,4 μm beziehungsweise Protrusionen, die sich hier, vor allem bei der Alcianblau- Färbung und der PAS- Reaktion

wesentlich intensiver als in den vorangegangenen Segmenten anfärben. Die Zellkerne sind rund bis oval und liegen wieder der Basallamina an. Meist weisen sie einen Nucleolus, selten zwei Nucleoli auf.

Im Lumen des Ductus epididymidis im Bereich des Nebenhodenschwanzes sind massenhaft Spermien und Spermienkonglomerate vorhanden, auch abgeschilferte Epithelzellen und Keimzellen aus dem Hoden sind regelmäßig zu finden.

Die glatte Muskulatur hat in S5 auf etwa 54 μm zugenommen und besteht aus sieben oder mehr Muskellagen, die besonders gut in der Goldner-Färbung zu sehen sind.

Das Interstitium ist gut vaskularisiert, sehr aufgelockert und enthält einige Lymphozyten.



Abb.16

Segment 5 des Ductus epididymidis mit zahlreichen rundkernigen Apikalzellen (AZ \rightarrow), Spermien (Sp) im Lumen, umgeben von einer ca. 54 μm dicken, glatten Muskelschicht (MZ). Im Interstitium liegen zahlreiche kleine Blutgefäße (BG) (HE), 280 x

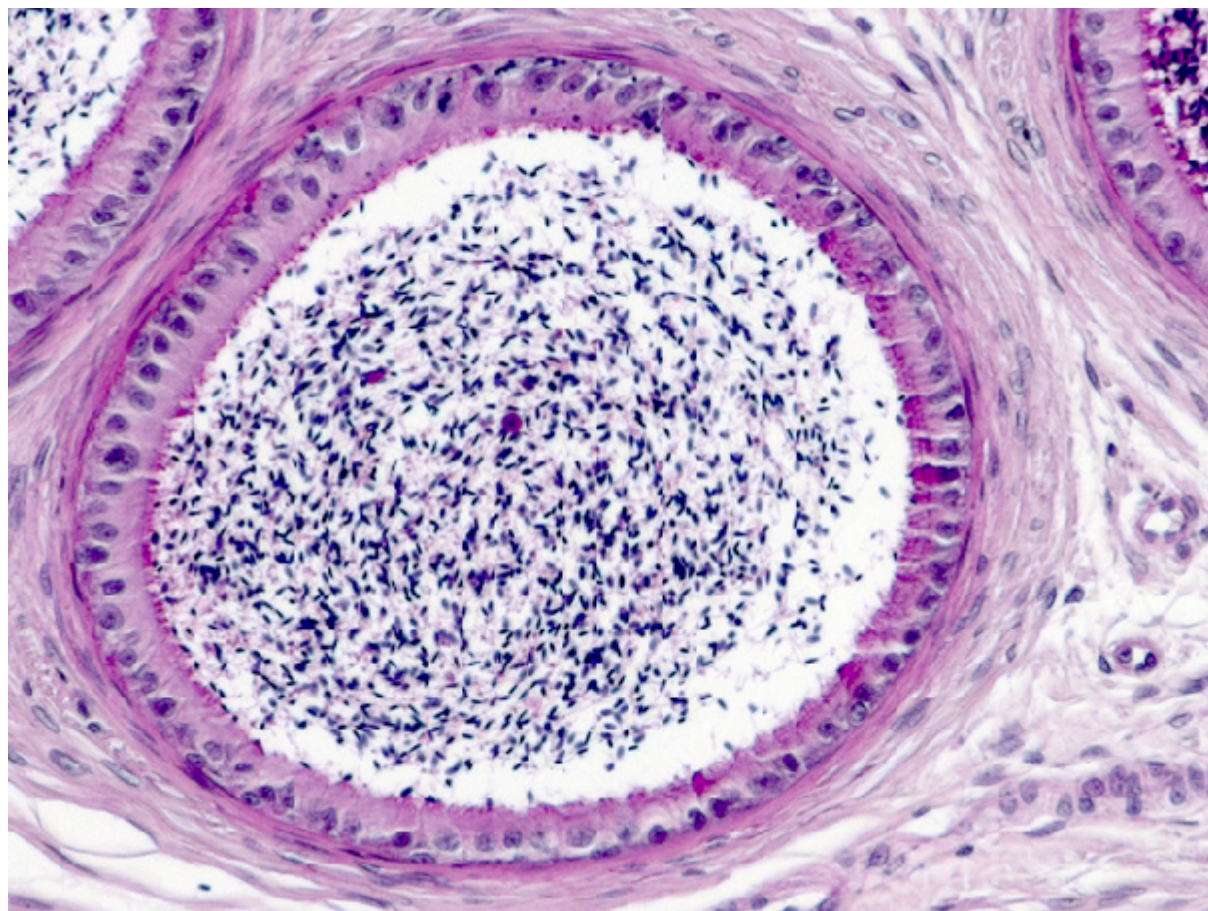


Abb. 17

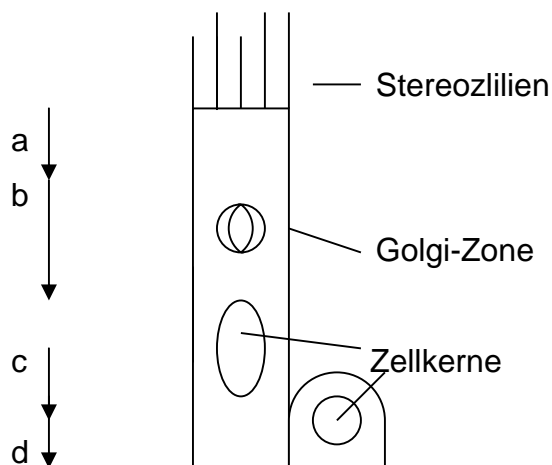
Segment 5 des Ductus epididymidis mit massenhaft Spermien, PAS, 640 x

Tab. 4

Übersicht über die durchschnittlichen Maße des Nebenhodens (in μm)

	De	S1	S2	S3	S4	S5
Lumen	94,5/ 40,5/ 27	53,3 (29,7-81)	52,2	44,5	60 (45-81)	148,5 x 108-540 x 337,5
Zilien/ Stereozilien	13,5	16	20	5,1	5,4	5,4
Epithel	14,4	38,8	32	43	38,7 827- 50)	29,7

4.2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Nebenhoden des Katers

**Abb. 18**

Schematische Darstellung einer hochprismatischen Epithelzelle und einer Basalzelle
 a= apikale Zone, b= iuxt nukleäre Zone, c= infranukleäre Zone, d= basale Zone

4.2.1. Ductuli efferentes

Die Ductuli efferentes verbinden das Rete testis des Hodens mit dem Ductus epididymidis des Nebenhodens. Das Epithel ist einschichtig und isoprismatisch. Seine Höhe ist mit durchschnittlich $14,4\ \mu\text{m}$ wesentlich geringer als im folgenden Ductus epididymidis. Es kommen hier zwei verschiedene Arten von Zellen vor: Isoprismatische Zellen mit langem Kinozilienbesatz, sowie Zellen, die nur mit Mikrovilli ausgestattet sind. In beiden Zelltypen dominiert der Kern, das Zytoplasma ist relativ gering ausgebildet und vor allem basal sehr schmal.

Im Lumen und zwischen den Kinozilien liegen massenhaft Spermien. Teilweise kann man im Lumen größere Ansammlungen von apokrinem Sekret beobachten. Zwischen den Stereozilien sind sowohl Invaginationen als auch Protrusionen erkennbar. Die Invaginationen schnüren sich zu kleinen Vesikeln ab, die in der apikalen Zone gehäuft auftreten. Vakuolen verschiedener Elektronendichte treten rund um den Kern auf. Dabei ist auffallend, dass die Zilienzellen mehr Vakuolen besitzen, wobei diese apikal sehr dunkel sind und unterhalb des Kerns oft leer wirken.

Im gesamten Zytoplasma findet man viele Mitochondrien deren Gestalt rundlich bis länglich sein kann.

Der Golgi-Apparat ist klein. Rund um den Kern liegen zunehmend Zisternen von rauem endoplasmatischem Retikulum. Der Kern selbst unterscheidet sich bei den beiden genannten Zellarten. Zilienzellen besitzen einen längsovalen Kern mit meist 2 Nucleoli, Mikrovilli tragende Zellen hingegen einen runden bis querovalen Kern mit nur einem Nucleolus. Das Heterochromatin ist bei beiden schollig verteilt, konzentriert sich aber in der Peripherie. Ebenfalls bei beiden Zellarten ist die Gestalt des Kerns unregelmäßig geformt und eingebuchtet.

Im an das Epithel anschließenden Bereich fallen glatte Muskelzellen mit länglichem Kern auf, die eine einlagige Muskelschicht bilden und in lockeres Bindegewebe eingebettet sind. Das Interstitium ist gut entwickelt und kapillarisiert

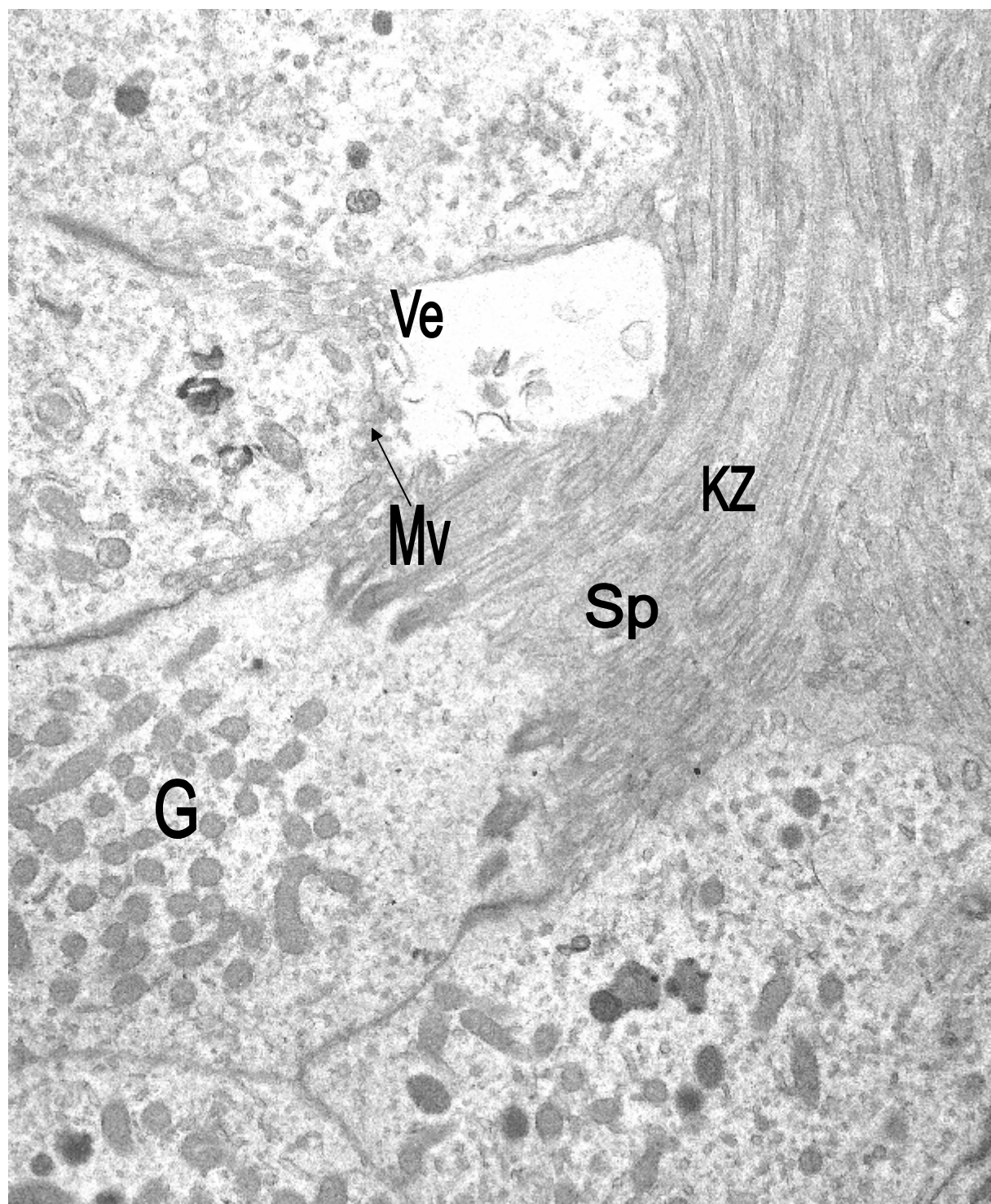


Abb. 19

Ductuli efferentes, apikal: Anschnitte von Spermien (Sp), Mikrovilli (MV→),
Kinozilien (KZ), intraluminale Vesikel (Ve), apikal Granula (G), 5500 x

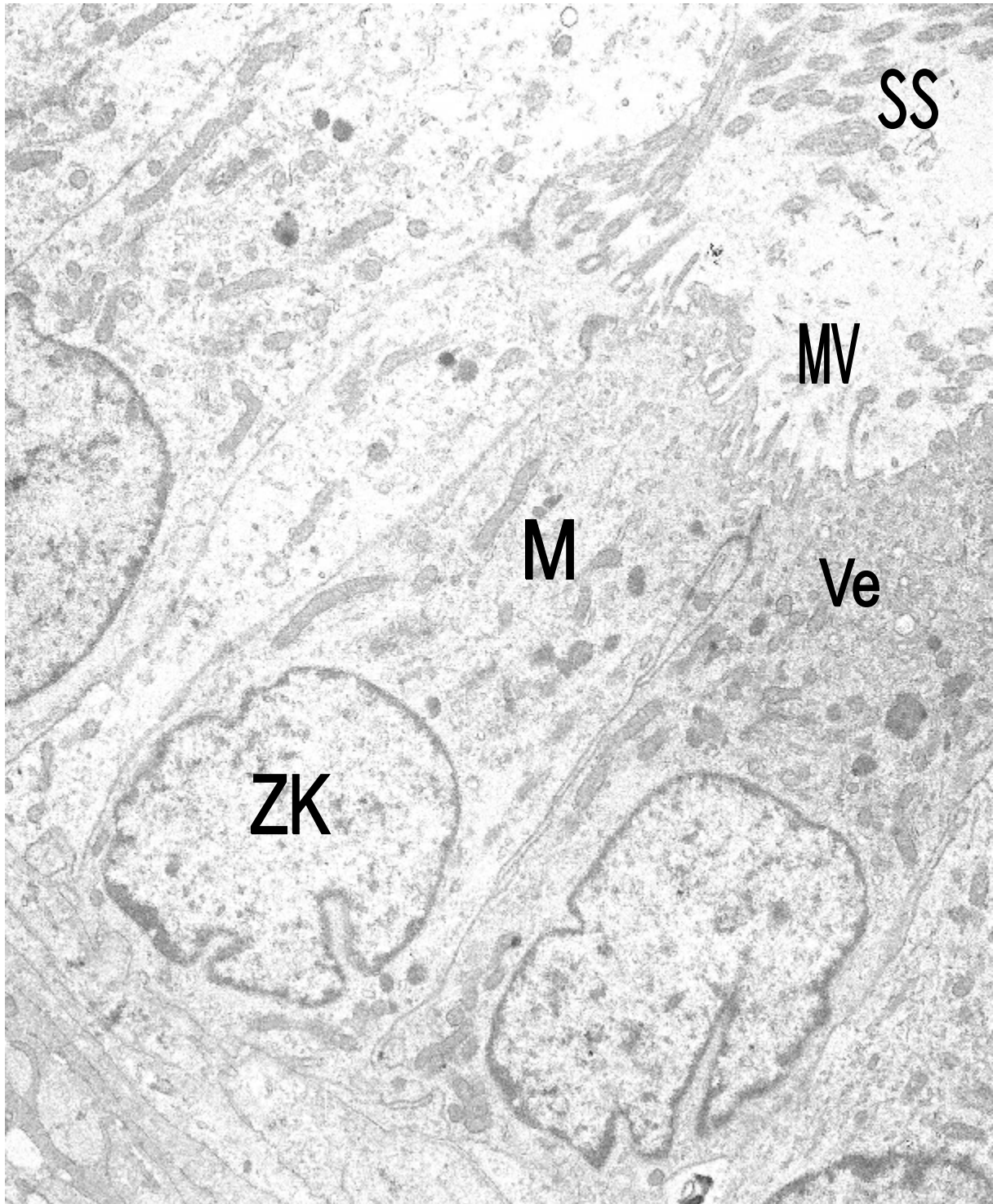


Abb. 20

Ductuli efferentes: Im Lumen Spermenschwänze (SS), kurze Mikrovilli (MV), Vesikel (Ve), über Zellkern (ZK) mit Invaginationen zahlreiche Mitochondrien (M), 2400 x

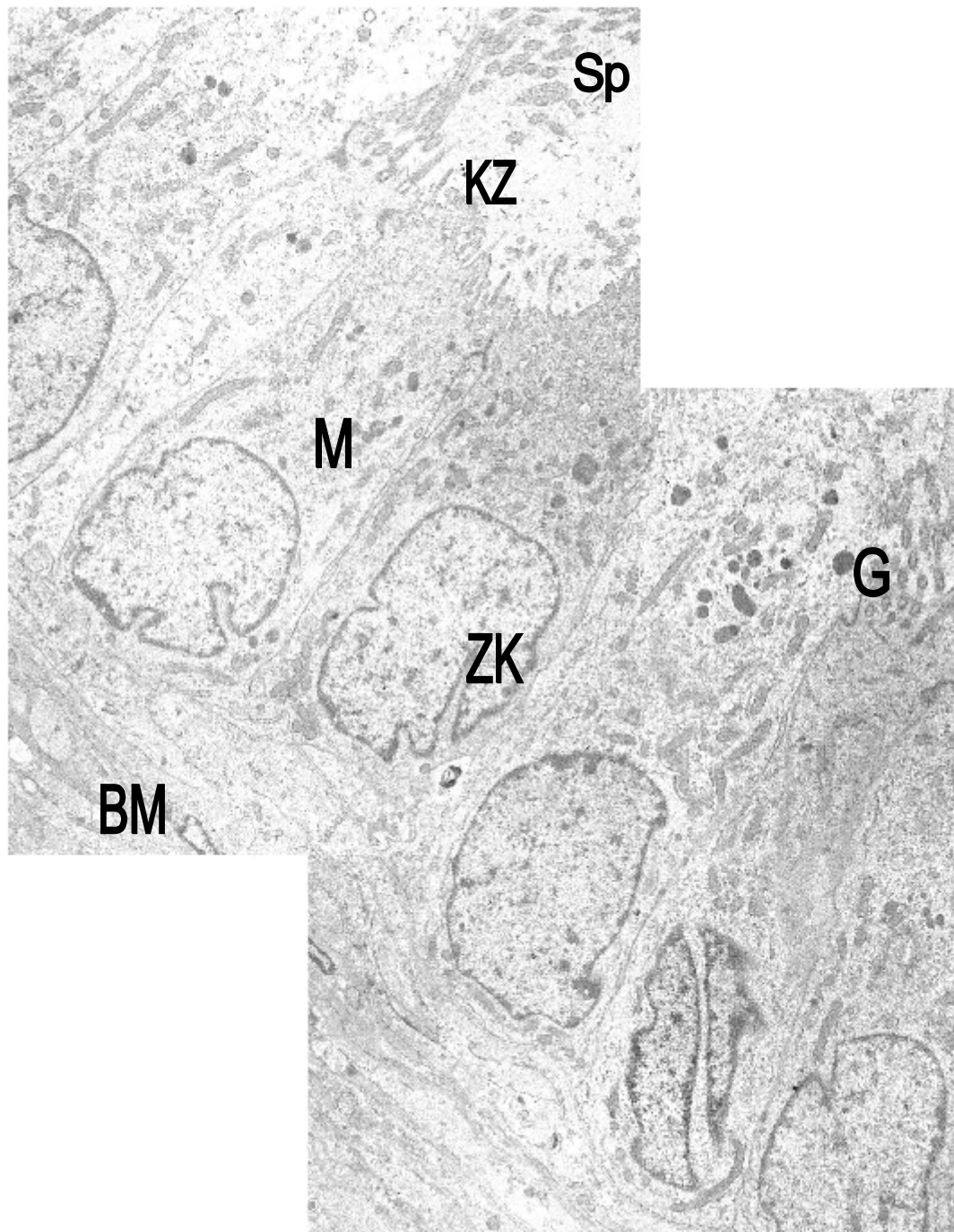


Abb. 21

Übersicht über das Epithel der Ductuli efferentes, 1600 x

Die Epithelzellen sitzen der Basalmembran (BM) auf. Der Zellkern (ZK) nimmt einen großen Teil der Zelle ein, im apikalen Bereich finden sich Granula (G), sowie längliche Mitochondrien. Zwischen den Kinozilien (KZ) sieht man einige Anschnitte von Spermien (Sp).

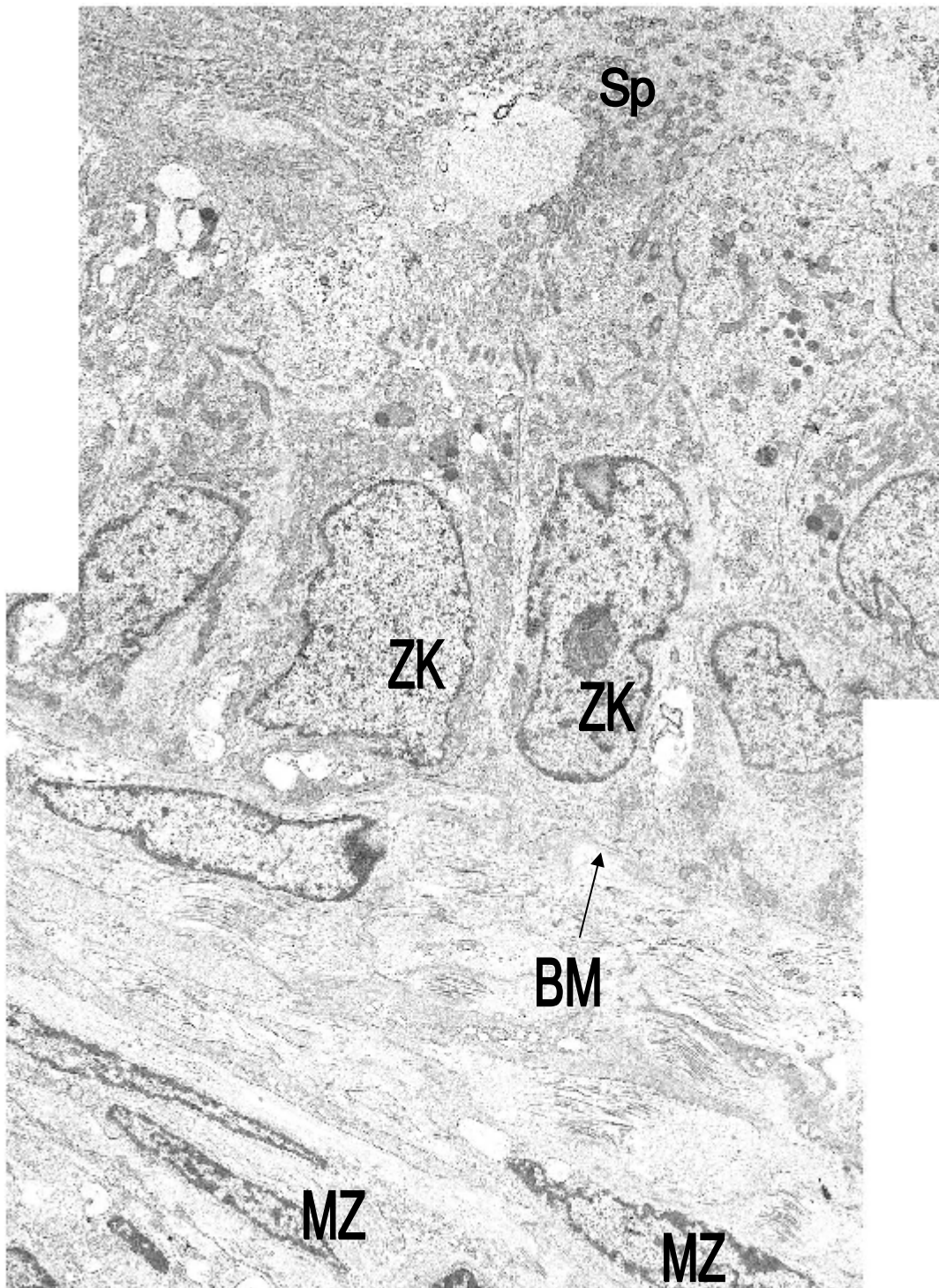


Abb. 22

Übersicht über das Epithel der Ductuli efferentes, 1600 x

Außerhalb der Basalmembran (BM) erkennt man glatte Muskelzellen (MZ) mit langgestrecktem Kern (ZK) der Hauptzellen. Im Lumen zeigen sich massenhaft Spermien (Sp).

4.2.2. Ultrastruktur von Segment 1

Das Lumen in Segment 1 des Ductus epididymidis ist mit durchschnittlich 53,3 μm meist größer als das der vorangegangenen Ductuli efferentes und enthält kaum Spermien. Das Epithel zeichnet sich durch sehr hohe Hauptzellen mit relativ langem (16 μm) Stereozilienbesatz aus. Die benachbarten Hauptzellen werden im apikalen Bereich durch "Junctional complexes" fest miteinander verbunden.

Zwischen den Stereozilien finden sich Ausstülpungen der Plasmamembran, sogenannte Protrusionen, die mäßig elektronendichtes Material enthalten. Diese können sich komplett abschnüren und bilden dann Vesikel innerhalb des Lumens. Daneben kommen häufig Einstülpungen der Plasmamembran vor, die sich als kleine, helle endozytotische Vesikel abschnüren. Einige dieser Vesikel lagern sich zu "multivesicular bodies" zusammen und sind dann von einer gemeinsamen Membran umschlossen. In der apikalen und iuxtanukleären Zone finden sich Tubuli von glattem endoplasmatischem Retikulum (sER), sowie einzelne Mitochondrien. Sehr auffällig sind die zahlreich in der Nähe des Kerns auftretenden, elektronendichten Sekretgranula, die sich auch um den Golgi-Apparat lagern. Der Golgi-Apparat besteht aus konzentrisch angeordneten Zisternen, die miteinander verbunden sind und sich um eine Anzahl verschieden großer Bläschen lagern. Neben dem Golgi-Apparat bis hin zur infranukleären Zone treten Zisternen von rauem endoplasmatischem Retikulum (rER) sowie einige längliche Mitochondrien auf. Der Zellkern der Hauptzellen hat in Segment 1 eine längsovale Form und liegt in etwa auf halber Höhe der Zelle. Er enthält mindestens einen deutlich erkennbaren Nucleolus und wenig Heterochromatin, das der inneren Kernhüllenmembran angelagert ist. Infranukleär findet man wiederum kleine Vesikel, elektronendichte Granula, längliche und runde Mitochondrien sowie große Vakuolen mit faserartigem Inhalt.

In der Nähe der Basalmembran sind regelmäßig Basalzellen zu erkennen, die durch einen relativ großen Kern bzw. wenig Zytoplasma gekennzeichnet sind. Lediglich in der Nähe des Kerns findet man einen kleinen Golgi-Apparat und einige Stränge von endoplasmatischem Retikulum, sowie einige relativ runde Mitochondrien. Der Zellkern hat eine querovale Form und ist oft an einer oder mehreren Stellen eingebuchtet. Das Karyoplasma ist mäßig elektronendicht, das Heterochromatin ist auch hier in die Peripherie des Zellkerns verlagert. Meist ist ein deutlicher Nucleolus zuerkennen. Sitzen die Zellen in ihrer ganzen Breite der Basalmembran auf, ist der

Kern wellig eingebuchtet. Die Basalzellen sind durch fingerartige Invaginationen mit den Hauptzellen und mit der Basalmembran verbunden.

In der basalen Region der Hauptzellen kommen einzelne Mitochondrien sowie einige große Ansammlungen von rER-Zisternen vor. Dazwischen finden sich wieder dunkle Sekretgranula, sowie größere helle Vakuolen.

Die Basalmembran, der das hochprismatische Epithel aufsitzt ist meist gut zu erkennen. Sie ist relativ schmal und durch ihren geschlängelten Verlauf gut vom Interstitium abzugrenzen. Der Kontakt der Basalzellen zur Basalmembran ist sehr unterschiedlich. Sie können ihr in der ganzen Breite angelagert sein, oder aber nur mit einem kleinen Anteil zwischen zwei Hauptzellen Kontakt haben.

Basal treten zwischen den Hauptzellen auch andere Zellarten wie Makrophagen und Lymphozyten auf. Die Makrophagen sind durch einen kleinen Kern und ein Zytoplasma mit vielen dunklen Vakuolen gekennzeichnet. Deshalb erscheint die ganze Zelle sehr elektronendicht im Vergleich zu den Basalzellen. In Kernnähe erkennt man den Golgi-Apparat sowie lange Zisternen von rER.

Die Lymphozyten haben einen runden Kern und enthalten wenige Organellen.

Im Interstitium kommen neben Fibrozyten auch Lymphozyten und Makrophagen vor.

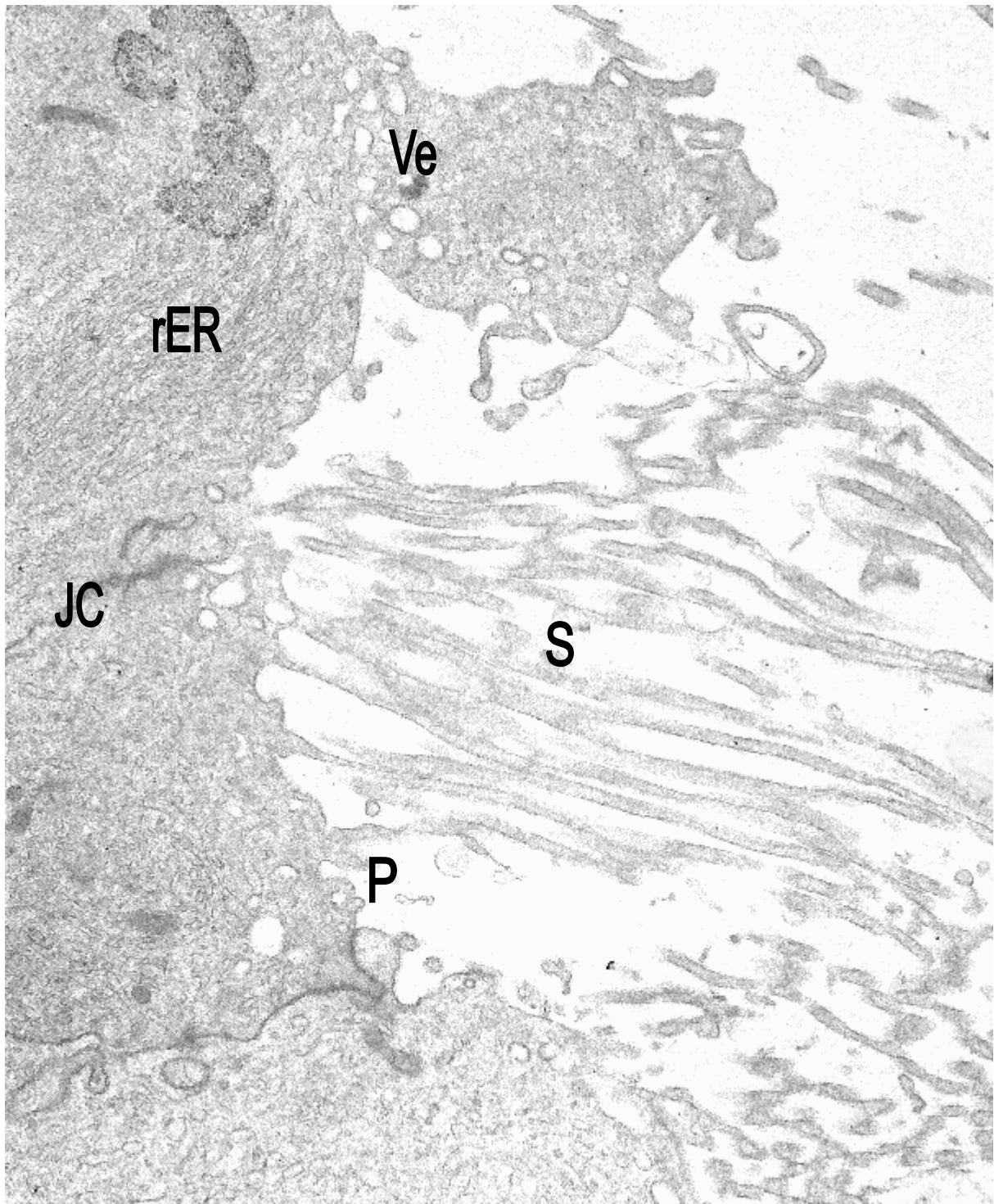


Abb. 23

Apikaler Bereich von Segment 1: Stereozilien (S), Protrusionen (P) und Verbindung der Zellen durch "Junctional complexes" (JC), im apikalen Zytoplasma große Vesikel (Ve) und raues endoplasmatisches Retikulum (rER), 5500 x

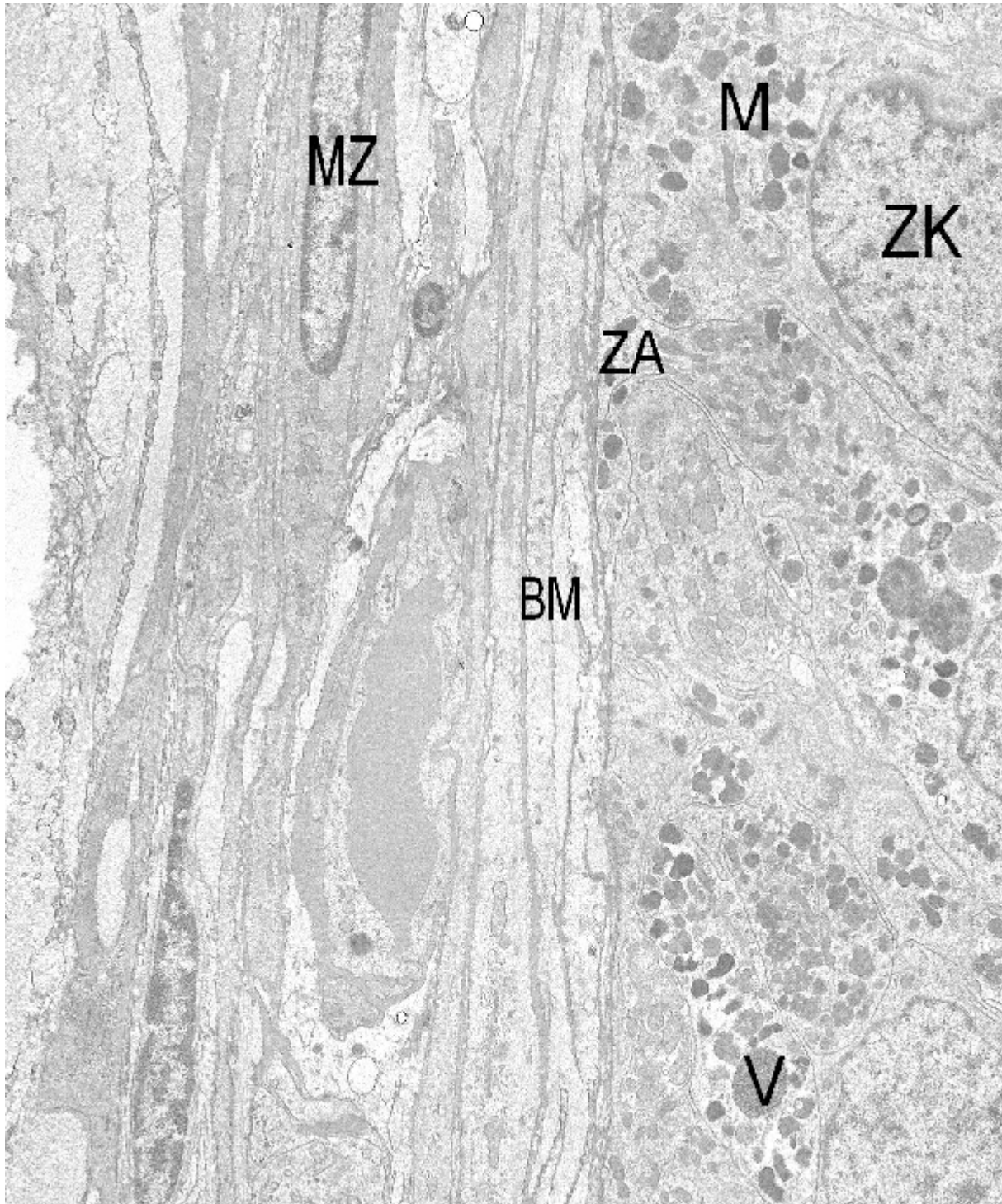


Abb. 24

Basaler Bereich von Segment 1: basal liegende Zellkerne (ZK), im Zytoplasma darunter Mitochondrien (M) und Vakuolen (V), dazwischen Zellausläufer (ZA) von Zellen mit weiter apikal gelegenem Kern, mit Kontakt zur Basalmembran (BM), anschließend mehrere Schichten glatter Muskelzellen (MZ), 2400 x

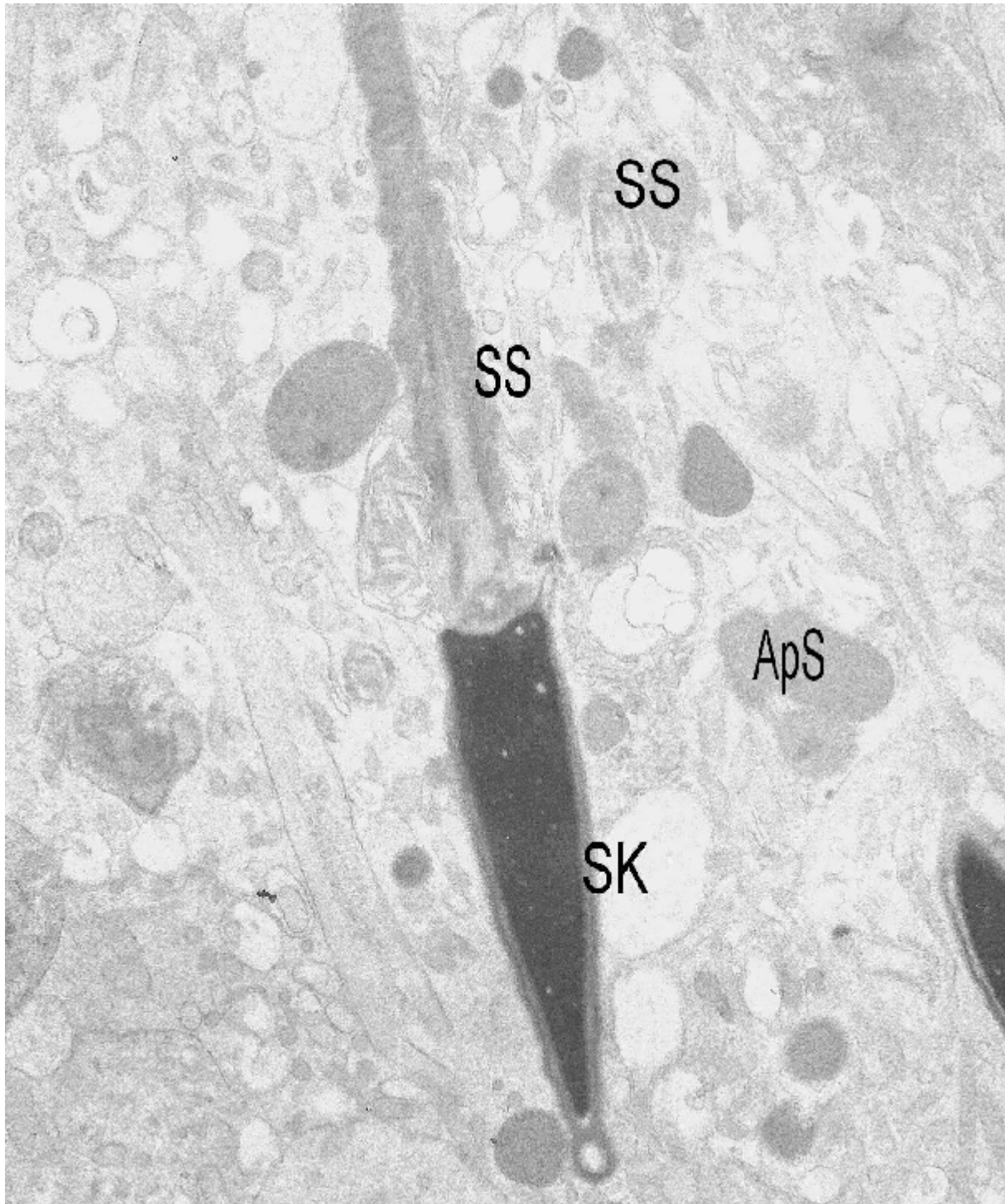


Abb. 25

Segment 1: Luminal gelegenes Spermium im Längsschnitt, mit Spermienkopf (SK) und Spermischwanz (SS), daneben einige Spermischwänze im Querschnitt, umgeben von Sekretvakuolen (ApS), 5500 x

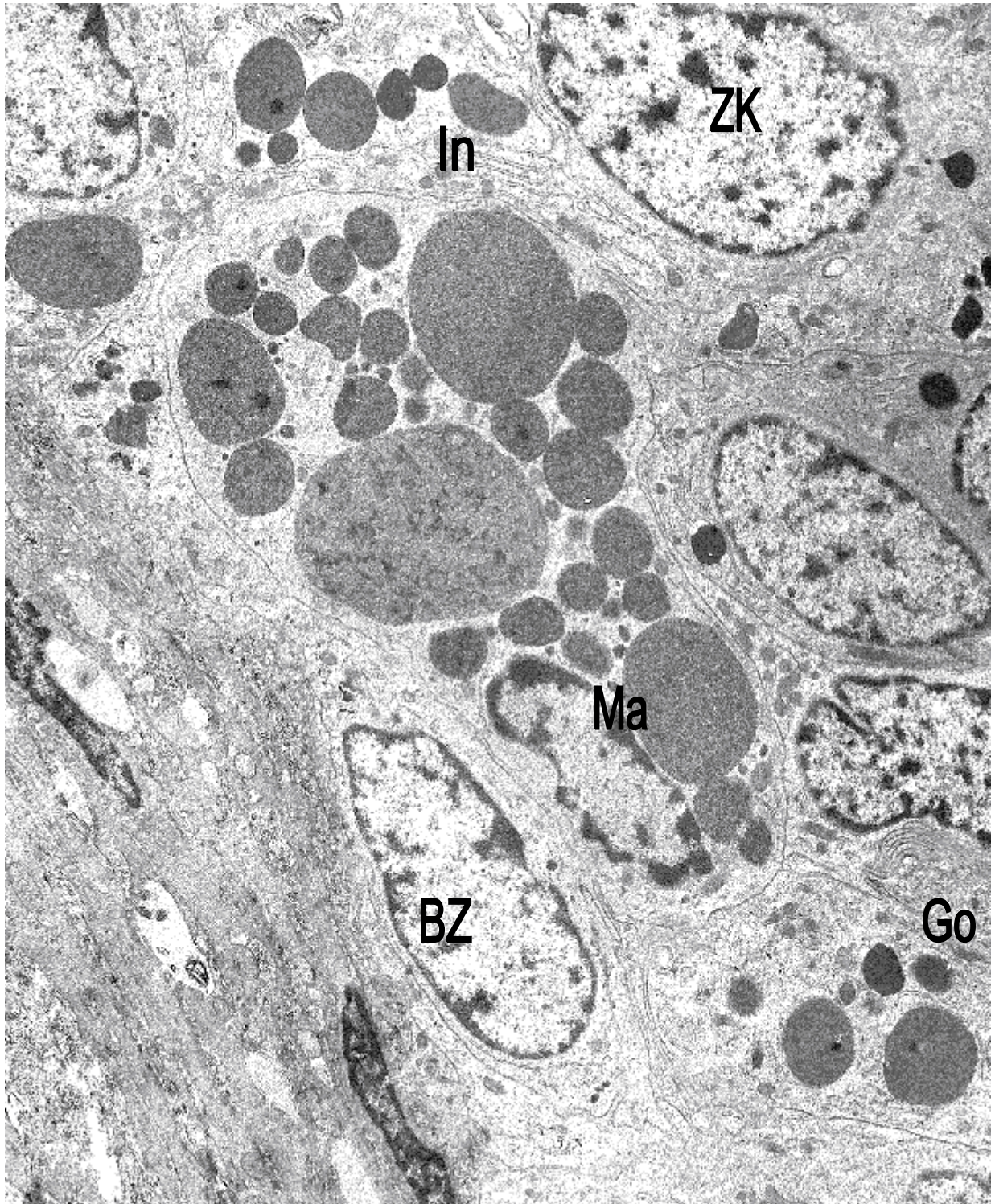


Abb. 26

Basaler Bereich von Segment 1: Zellkerne (ZK) der Hauptzellen, Verbindung der Zellen durch Invaginationen (In) der Plasmamembran, Golgi-Apparat (Go), Basalzellen (BZ), Makrophage (Ma), 2400 x

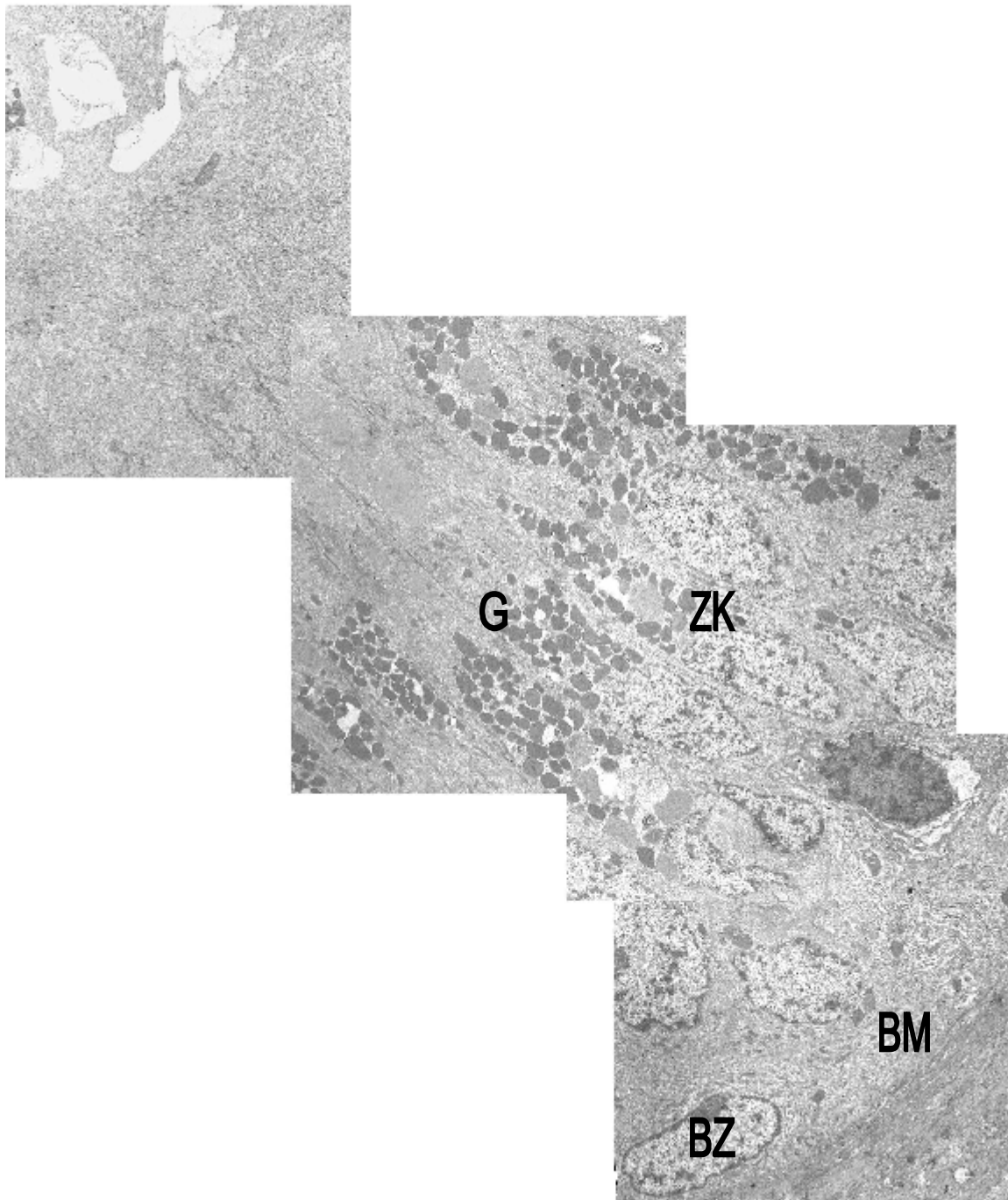


Abb. 27

Übersicht über das Epithel des Segment 1 des Ductus epididymidis, 800 x
Deutlich erkennbar ist die Basalmembran (BM) mit ihr aufsitzenden Basalzellen (BZ).
Über den Zellkernen (ZK) der Hauptzellen zeigt sich eine Ansammlung
elektronendichter Granula (G).

4.2.3. Ultrastruktur von Segment 2

In Segment 2 ist das Epithel mit etwa 32 µm etwas niedriger als im vorangegangenen Abschnitt. Neben den Hauptzellen kommen in diesem Bereich Apikalzellen, Basalzellen und Lymphozyten vor. Die Stereozilien sind circa 20 µm lang und damit etwas länger als im vorangegangenen Segment. Auch hier kommen zwischen dem Zellbesatz Protrusionen und Invaginationen vor, die Vesikel innerhalb des Lumens bzw. Zytoplasmas bilden. Das Lumen beherbergt außerdem einige frühe Keimzellen, abgeschilferte Epithelzellen, sowie eine mäßige Anzahl von Spermien. Diese Spermien lagern sich teilweise um große wenig elektronendichte Vakuolen aus apokrinem Sekret.

Die Verbindung der zwischen den Hauptzellen des Ductus epididymidis erfolgt durch "Junctional complexes" in der apikalen Zone der Epithelzellen. Im Zytoplasma der Hauptzellen befinden sich in diesem Bereich zahlreiche Zisternen von rER und Sekretgranula, sowie helle und dunkle Vakuolen unterschiedlicher Größe. Auch um den relativ weit luminal gelegenen Golgi-Apparat sieht man einige elektronendichten Granula, die über dem Kern mengenmäßig abnehmen, sowie zahlreiche dunkle unterschiedlich geformte Mitochondrien vom Cristae-Typ.

Der Kern der Hauptzellen liegt weiter basal als im vorangegangenen Segment und enthält im Karyoplasma verteiltes Heterochromatin sowie ein bis zwei Nucleoli. Der Zytoplasmasaum neben dem Kern ist sehr schmal. Dort liegen nur einige Stränge von rER und vereinzelt Mitochondrien.

Die basale Zone ist wiederum durch das massive Auftreten von rER charakterisiert. Außerdem sind in Segment 2 einige Apikalzellen im Epithel des Ductus epididymidis vorhanden, deren konischer Kern sich im luminalen Drittel befindet. Ihr Zytoplasma erscheint heller als das der Hauptzellen, außerdem ist der Mikrovillibesatz wesentlich kürzer.

Regelmäßig kommen Basalzellen vor, die der Basalmembran sehr breit aufsitzen. Sie enthalten Vakuolen mit elektronendichten Granula. Der Kern der Basalzellen ist meist etwas eingebuchtet und enthält zwei oder mehrere Nucleoli.

Ebenfalls in der Nähe der Basalmembran treten Lymphozyten auf, die auch rER und Vakuolen unterschiedlicher Größe enthalten, sowie einzelne Makrophagen.

Außerhalb der Basalmembran sieht man längliche, zur Basalmembran parallel liegende glatte Muskelzellen, die eine zwei- oder mehrlagige Muskelschicht bilden. Das Interstitium ist gut vaskularisiert, außerdem finden sich hier viele Fibrozyten sowie Lymphozyten.

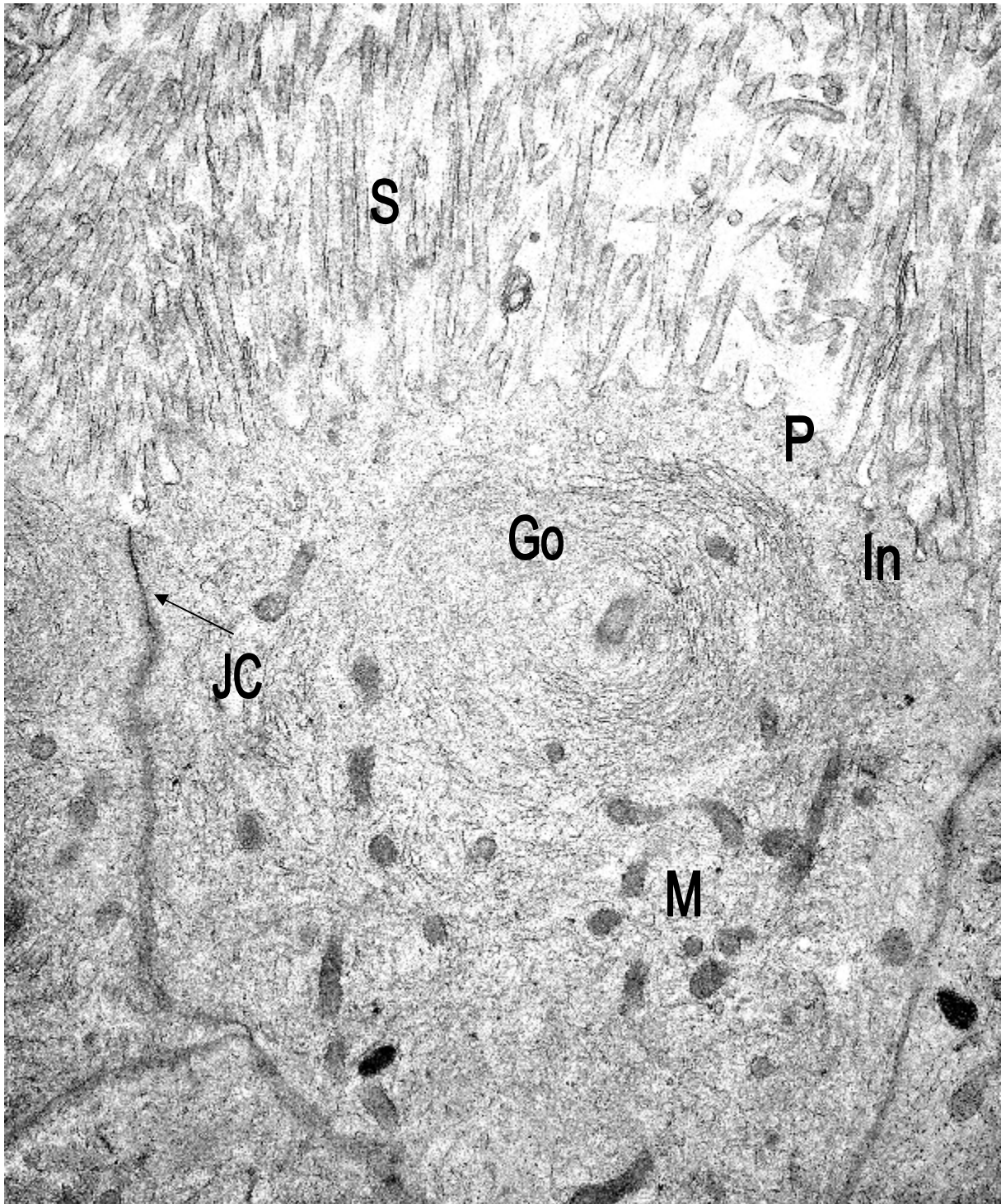


Abb. 28

Apikaler Bereich von Segment 2: Stereozilien (S), Protrusionen (P) und Invaginationen (In), apikal gelegener Golgi-Apparat (Go), darunter zahlreiche Mitochondrien, Verbindung durch "Junctional complexes" (JC), 5500 x

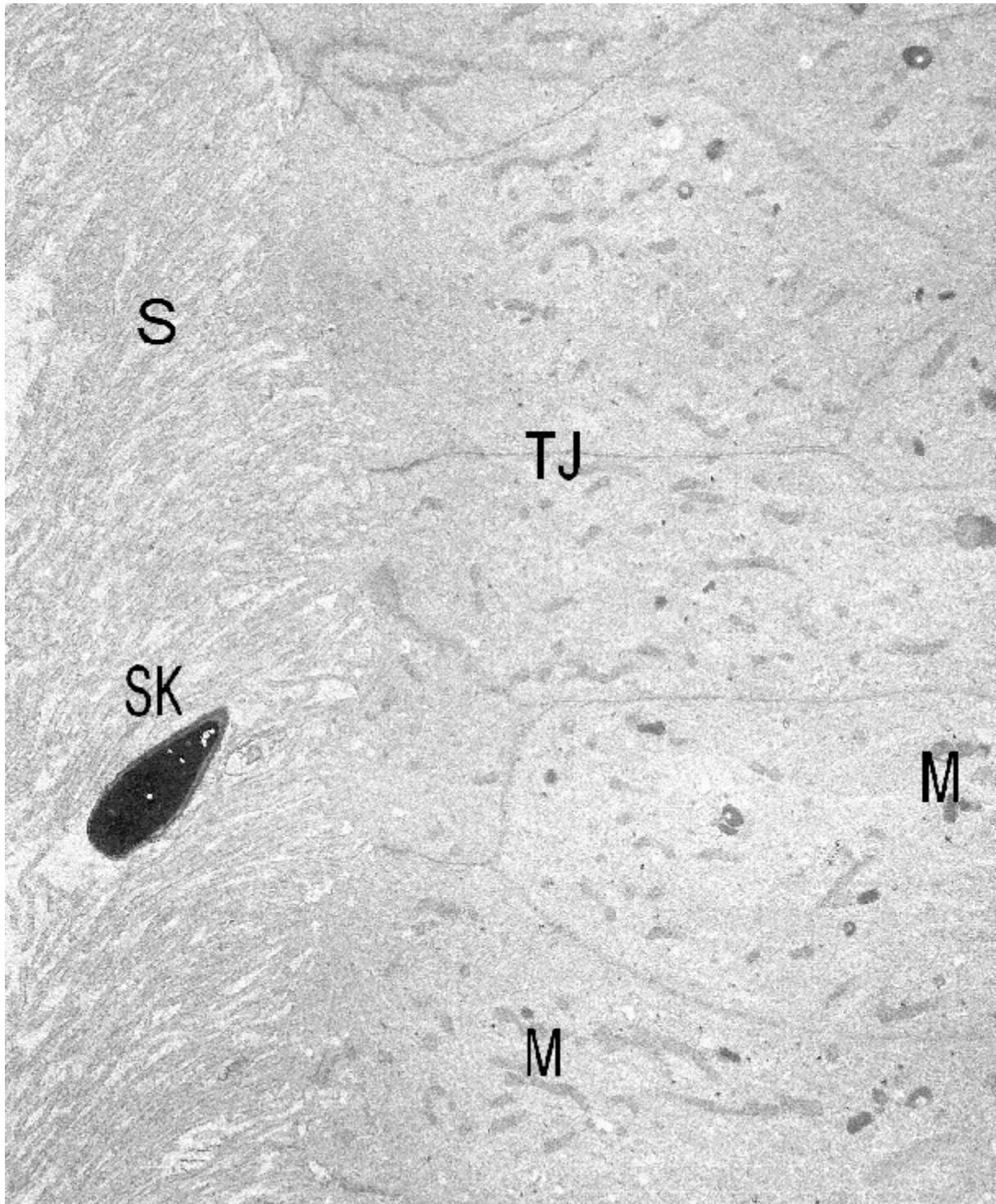


Abb. 29

Apikaler Bereich von Segment 2: Spermienkopf (SK) zwischen Stereozilien, "Tight junctions" (TJ), Mitochondrien (M), 2400 x



Abb. 30

Basaler Bereich von Segment 2: unter Zellkern (ZK) gelegener Golgi-Apparat (Go), Lymphozyt (LZ), anschließend Muskelzelle (MZ), 3500 x

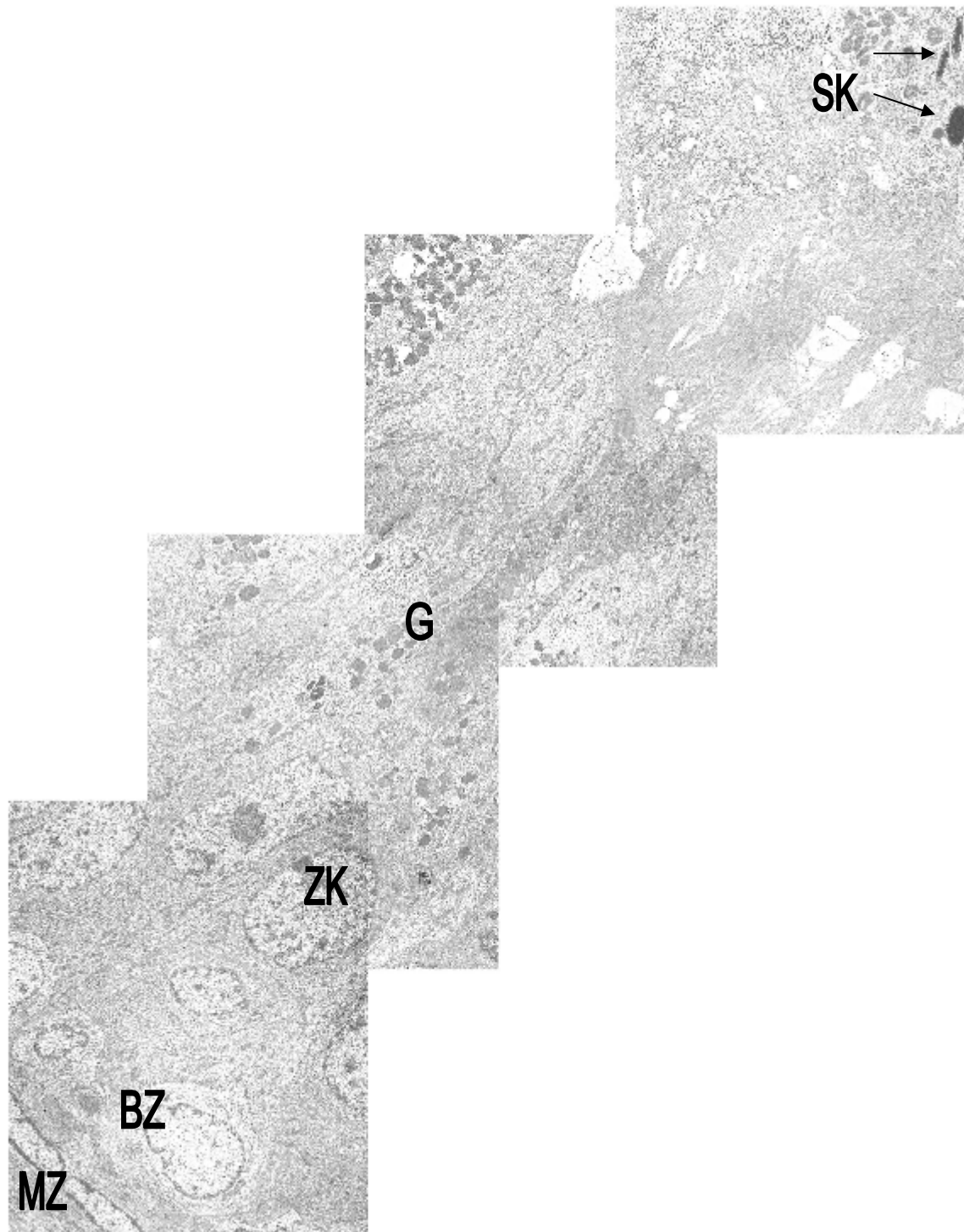


Abb. 31

Übersicht über das Epithel des Segment 2 des Ductus epididymidis, 800 x
Im basalen Bereich sind glatte Muskelzellen (MZ) und Basalzellen (BZ) zu erkennen, darüber die Zellkerne (ZK) der Hauptzellen umgeben von Granula (G). Im Lumen sieht man Spermienköpfe (SK).

4.2.4. Ultrastruktur von Segment 3

Die Stereozilien sind mit etwa 5,1 μm in Segment 3 des Ductus epididymidis relativ kurz. Protrusionen kommen kaum mehr vor. Invaginationen der Plasmamembran mit sich ins Zytoplasma abschnürenden Vesikeln sind dagegen zahlreich vorhanden.

Auffällig sind auf den ersten Blick die zahlreichen Spermien im Lumen sowie phagozytierte Spermien im Epithel. Sehr deutlich sind die Verbindungen zwischen benachbarten Epithelzellen durch fingerartige Verzahnung ausgebildet.

Apikal in den Hauptzellen erkennt man ganze Spermienköpfe, bzw. Anschnitte der Spermien, sowie Vesikel, jedoch bedeutend weniger als in den vorangegangenen Abschnitten. Einige lagern sich auch hier zu „multivesicular bodies“ zusammen.

Daneben findet man in dieser Zone Zisternen von rER, die sich auch um den relativ apikal gelegenen Goli-Apparat lagern. Außerdem kommen im gesamten Zytoplasma kurze, rundliche Mitochondrien vor.

In der iuxtannukleären Zone fallen wenig Granula unterschiedlicher Elektronendichte auf. Ihre Anzahl ist im Vergleich zu vorangegangenen Abschnitten jedoch gering.

Der Zellkern liegt im basalen Drittel und hat eine längsovale Form. Er enthält in diesem Abschnitt einen oft schwer abgrenzbaren Nucleolus. Das Heterochromatin ist schollig im gesamten Karyoplasma verteilt. Die Zytoplasmazone neben dem Kern ist schmal und enthält in großer Menge rER und Mitochondrien. Diese Organellen dominieren das Zytoplasma auch in der Basalregion.

Deutlich erkennt man die Abgrenzung zu den Basalzellen, die wenige Organellen enthalten und wesentlich heller erscheinen. Der Kern der Basalzellen ist rundlich und teilweise unregelmäßig. Sein Heterochromatin ist hier hauptsächlich in die Peripherie des Karyoplasmas verlagert. Auffällig sind hier die stark verschlungenen Zell-Zell-Verbindungen. Die Basalzellen sitzen der Basalmembran breit auf, während die Hauptzellen meist nur durch einen schmalen Zytoplasmabereich Kontakt mit ihr haben.

An diese Schicht anschließend findet man schmale, langgestreckte glatte Muskelzellen, die den kontraktilen Teil der Wand des Ductus epididymidis bilden. Die Kerne dieser Zellen sind wie die Zelle selbst langgestreckt und verlaufen parallel zur Basalmembran. Sie enthalten sehr elektronendichtes Heterochromatin, das hauptsächlich peripher der Kernmembran angelagert ist.

Lymphozyten und Makrophagen kommen im Epithel kaum vor.
Im Interstitium sind wenige Lymphozyten vorhanden, außerdem ist es gut vaskularisiert.

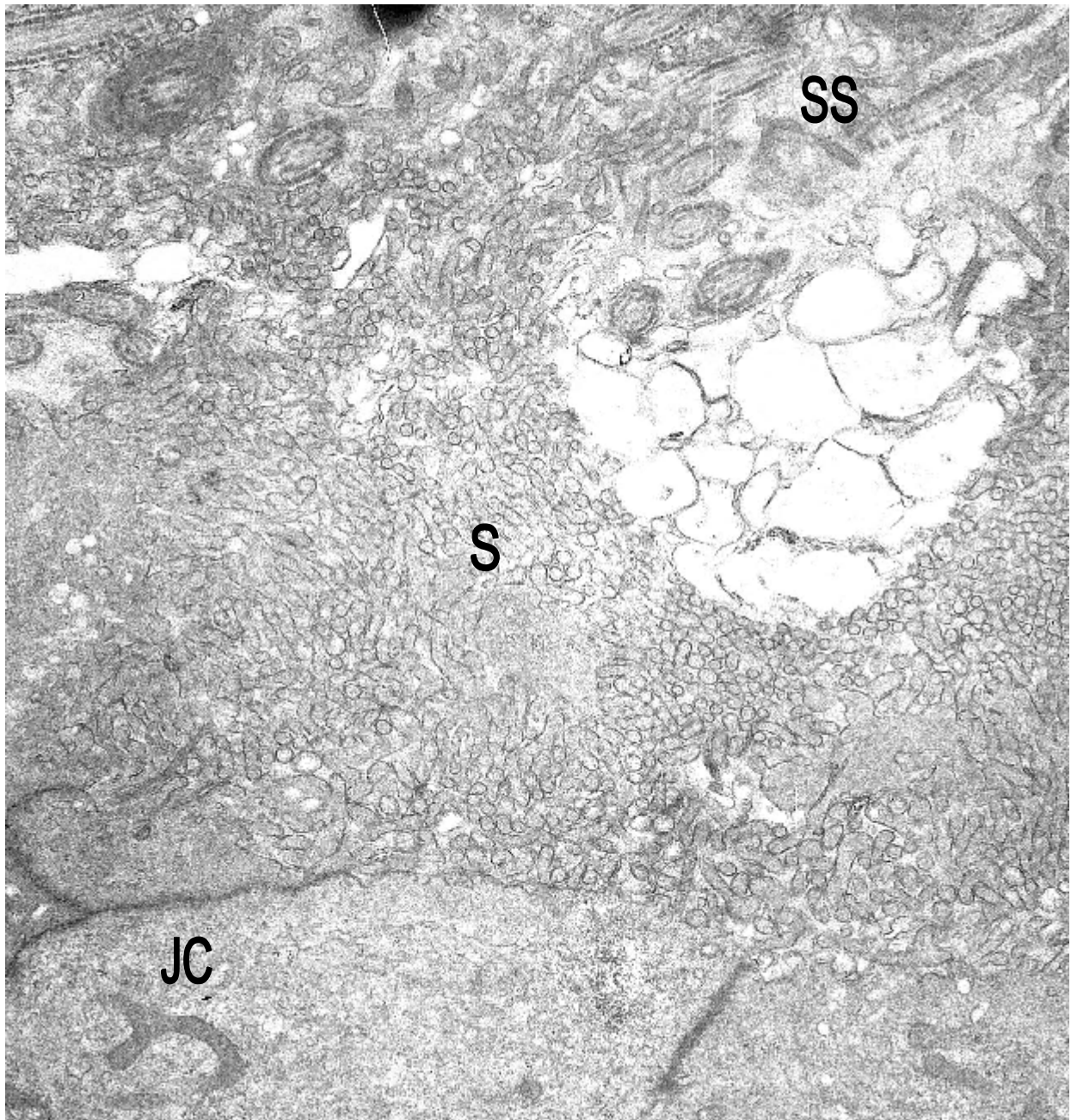


Abb. 32

Apikaler Bereich von Segment 3: Stereozilien (S), meist im Querschnitt, im Lumen Spermischwänze (SS) mit 9x2+2-Struktur der Spermiengeißel, deutliche "Junctional complexes" (JC), 5500 x

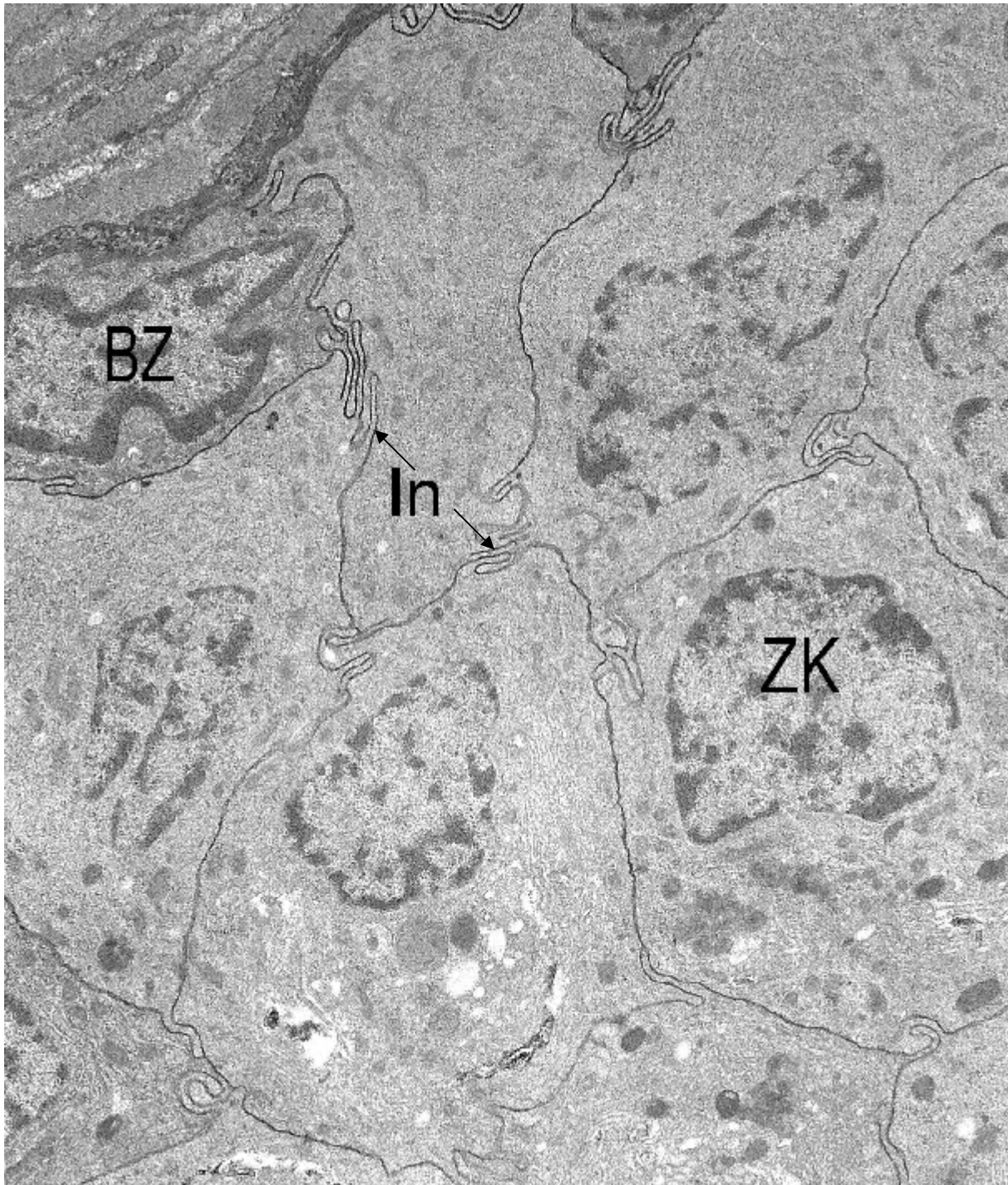


Abb. 33

Basaler Bereich von Segment 3, Querschnitt durch das Epithel: große Zellkerne (ZK), Verbindungen durch Invaginationen (In) der Plasmamembran, Basalzelle (BZ), 3500 x

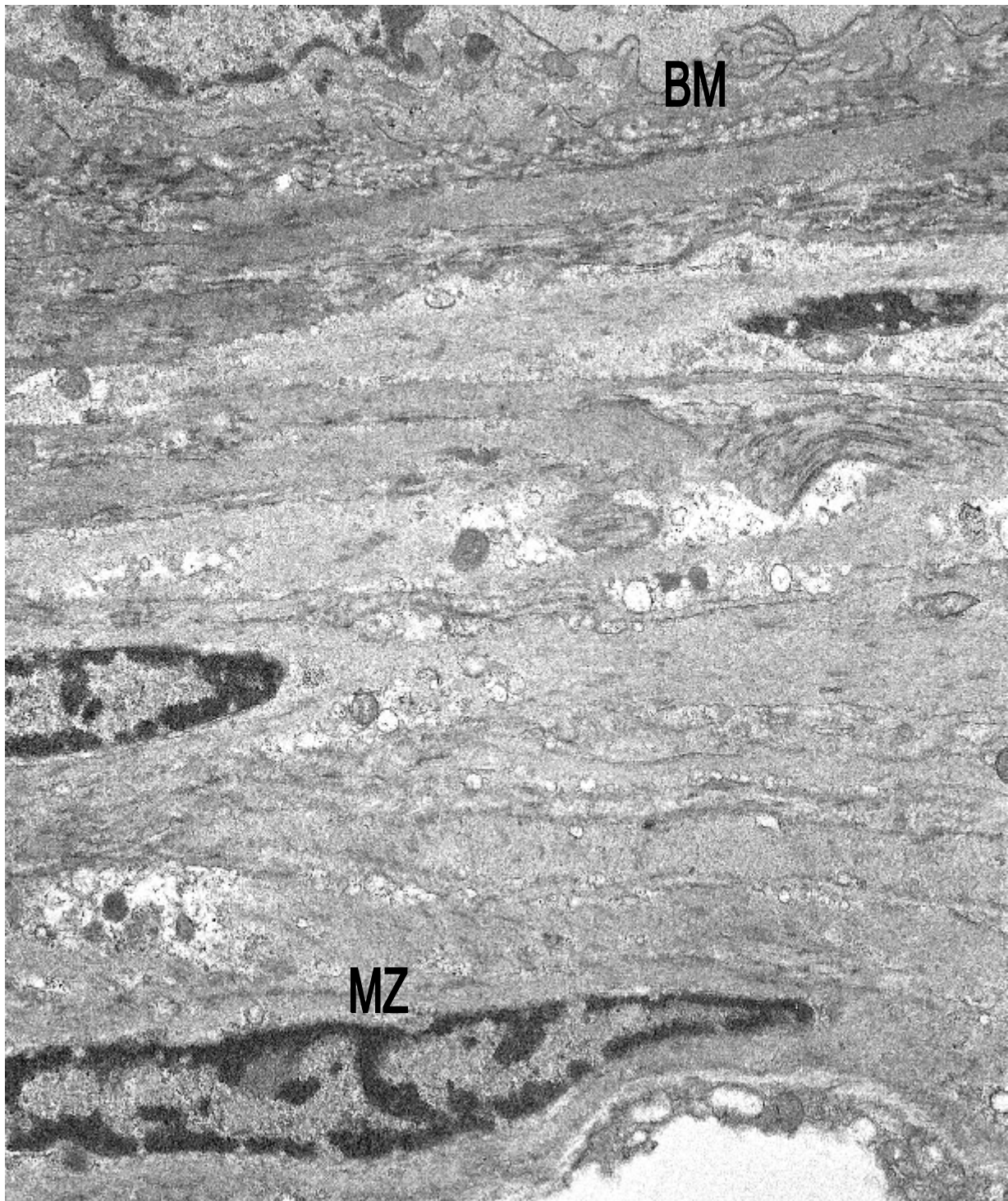


Abb. 34

Basaler Bereich von Segment 3: Basalmembran (BM), daran anschließend glatte Muskulatur (MZ), 3500 x

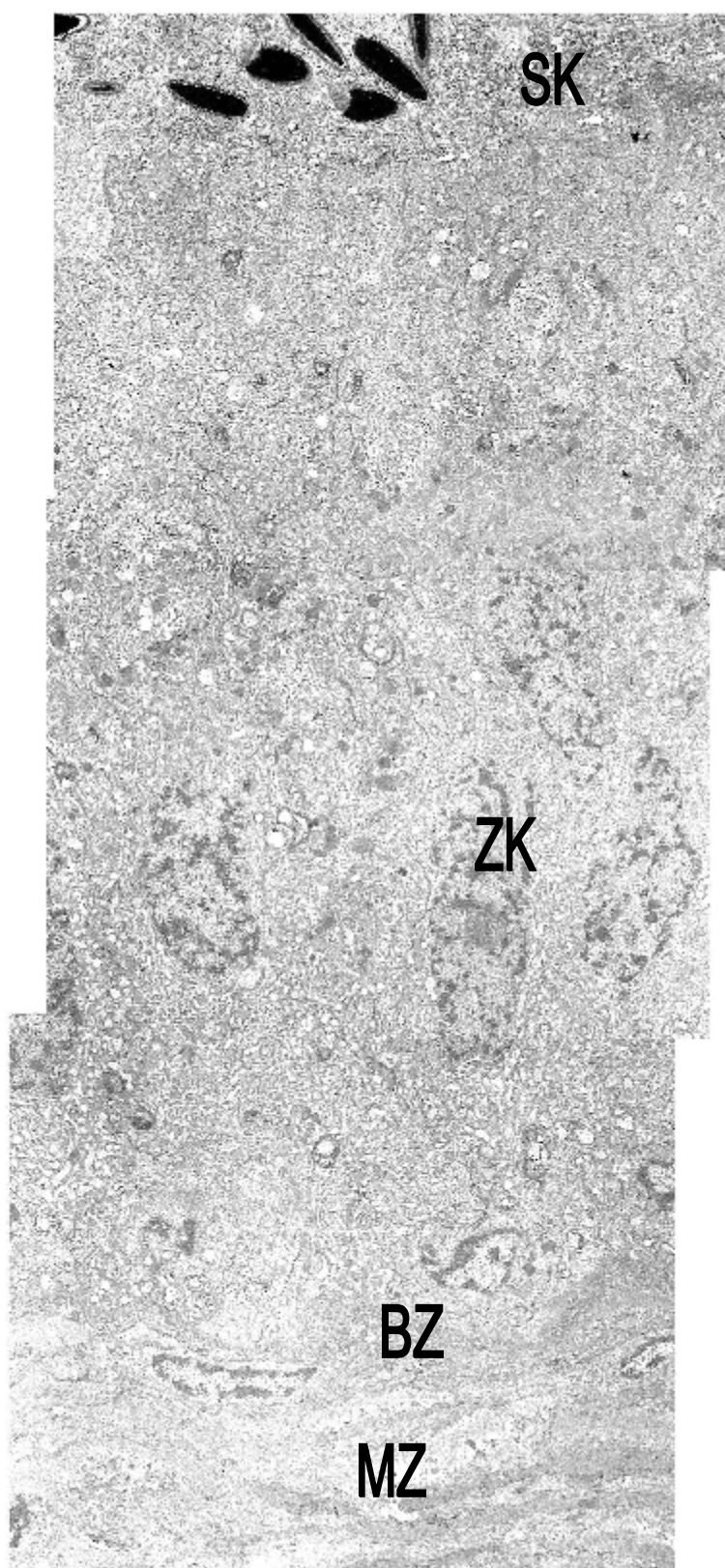


Abb. 35

Übersicht über das Epithel des Segment 3 des Ductus epididymidis, 1200 x

Im basalen Bereich sind glatte Muskelzellen (MZ) und Basalzellen (BZ) zu erkennen, darüber die Zellkerne (ZK) der Hauptzellen, im Lumen sieht man Spermienköpfe (SK)

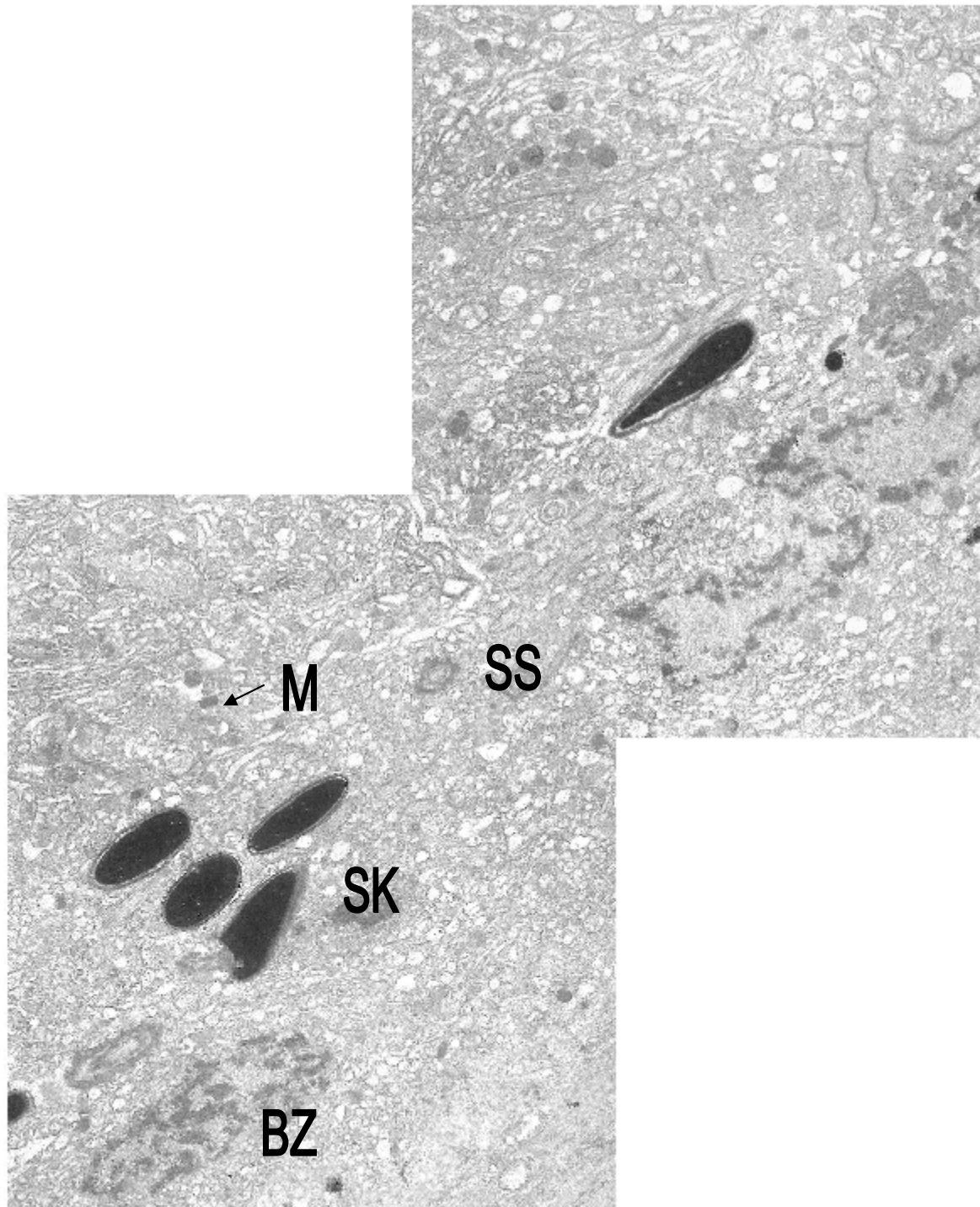


Abb. 36

Übersicht über die basale Zone des Epithels des Segment 3 des Ductus epididymidis, 2200 x

SK = Spermienköpfe, SS= Spermischwänze, M= Mitochondrien, BZ= Basalzelle

4.2.5. Ultrastruktur von Segment 4

In Segment 4 sind im Lumen zahlreiche Spermien enthalten. Der Stereozilienbesatz ist mit 5,4 µm etwas länger als im vorigen Abschnitt, Protrusionen und Invaginationen kommen nur vereinzelt vor. Die Hauptzellen stehen untereinander sowie mit den Basalzellen wieder durch ausgeprägte Invaginationen in Kontakt.

Im apikalen Zytoplasma zeigen sich Granula sowie Netzwerke von glattem und rauem ER. Sehr auffällig sind in diesem Abschnitt Mitochondrien unterschiedlicher Größe und Form. Sie kommen vereinzelt in der iuxt nukleären Zone vor, werden dann sich um den Golgi-Apparat zahlreicher und breiten sich bis unter den Zellkern aus. Ihre Gestalt ist rundlich oder oval. Außerdem treten über dem Kern dunkle Granula sowie Vakuolen auf.

Der Zellkern hat eine rundliche Gestalt und liegt weit basal. Das Heterochromatin ist schollig im Karyoplasma verteilt. Teilweise ist ein Nucleolus deutlich ausgeprägt.

In der supranukleären Zone ist wiederum rEr in großer Menge vorhanden. Die Mitochondrien sind vom Cristae-Typ. Sie sind teilweise sehr lang oder hufeisenförmig.

Im basalen Bereich engen Basalzellen das Zytoplasma der Hauptzellen auf einen schmalen Bereich ein. Der Zellkern der Basalzellen ist rund und enthält schollige Ansammlungen elektronendichten Materials.

Im Anschluss an die Basalmembran kommen langgestreckte Muskelzellen vor, die in vier Lagen verlaufen.

Makrophagen und Lymphozyten sind im Epithel selten vertreten und entsprechen in ihrer Erscheinung den vorigen Abschnitten.

Das Interstitium enthält viele Fibrozyten, Lymphozyten und Mastzellen. Das gesamte Gewebe ist erscheint verglichen mit den vorherigen Segmenten locker strukturiert.

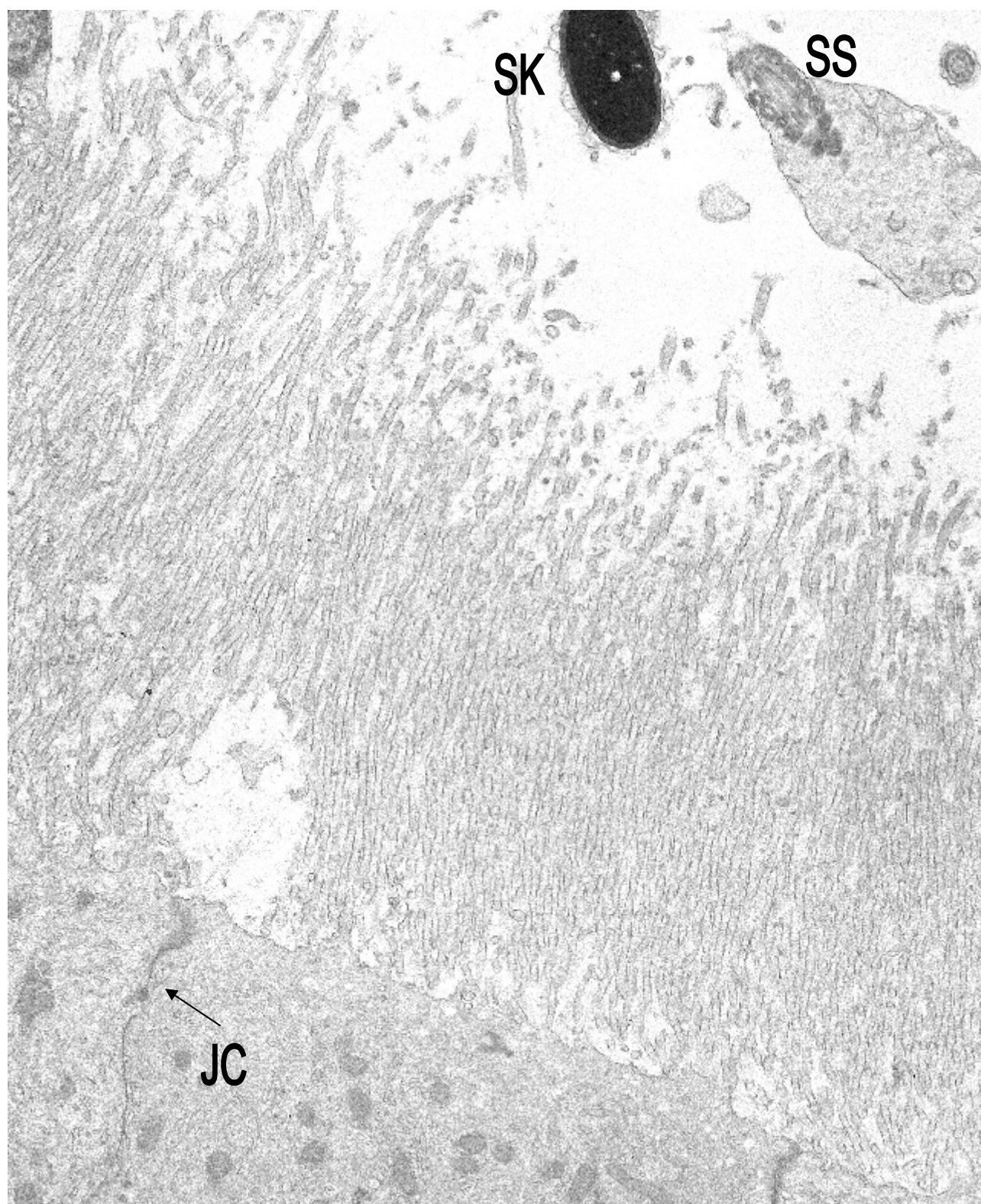


Abb. 37

Apikaler Bereich von Segment 4: Stereozilien (S) mit Spermienköpfen (SK) und –schwänzen (SS), Zellverbindungen durch “Junctional complex“ (JC), 3500 x

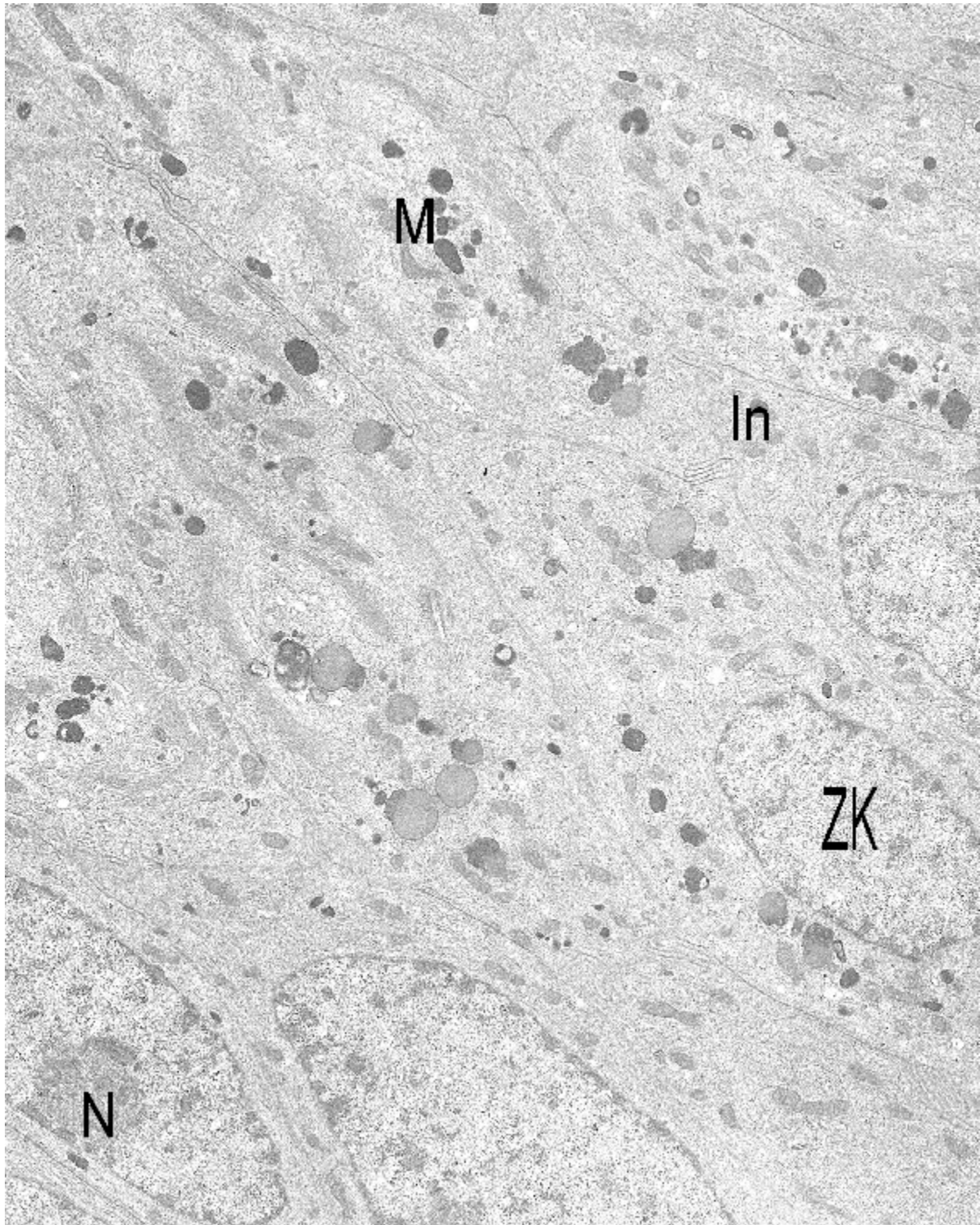


Abb. 38

Segment 4: Längliche Zellkerne der Hauptzellen enthalten teilweise deutlich sichtbaren Nucleoli (N), die Verbindung der benachbarten Hauptzellen erfolgt durch Invaginationen (In). Über dem Zellkern liegen verschieden geformte Mitochondrien (M), 2400 x

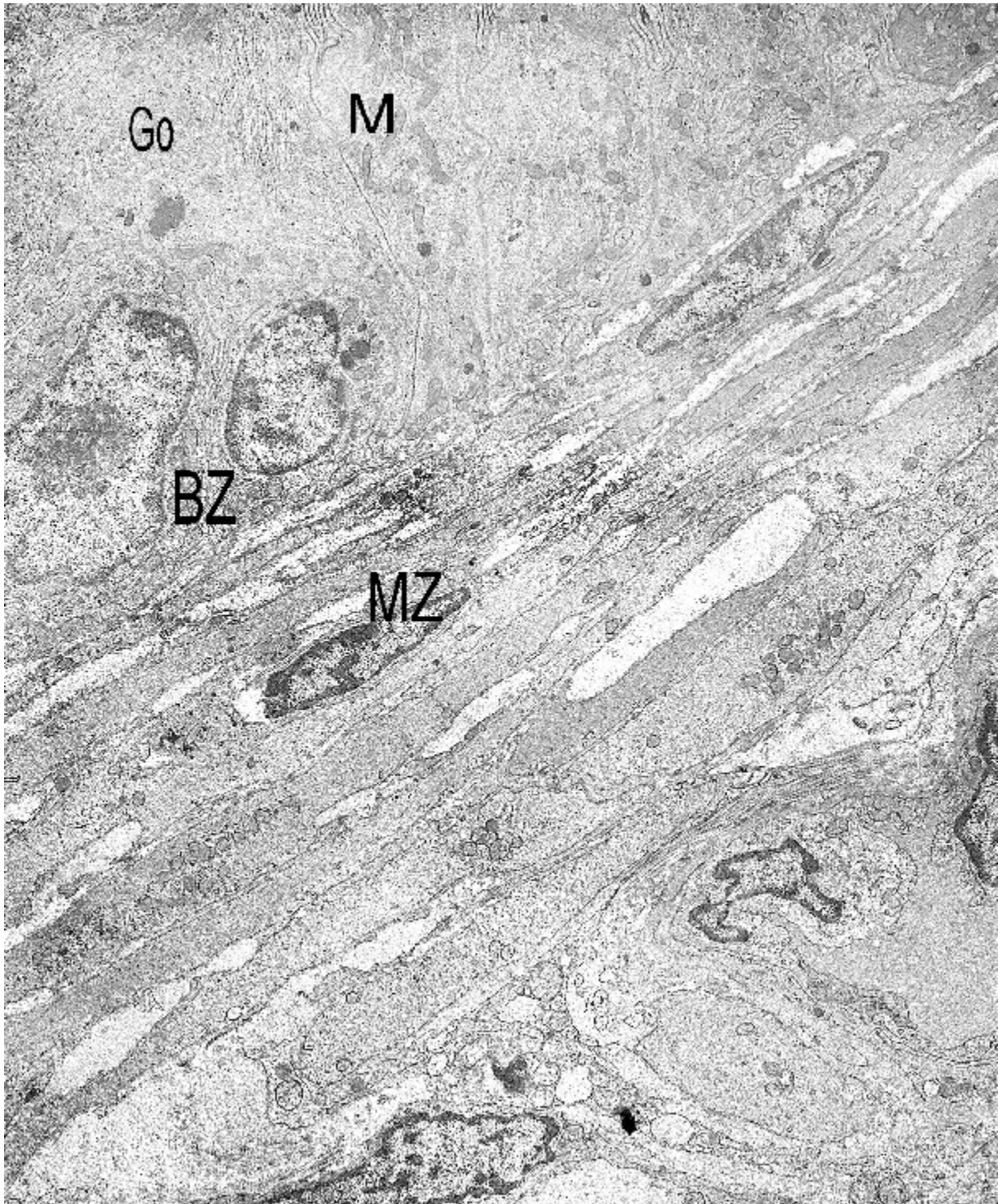


Abb. 39

Basaler Bereich von Segment 4: Basal gelegener Golgi-Apparat (Go), umgeben von Mitochondrien (M), BZ =Basalzellen, MZ =Muskelzelle, 2400 x

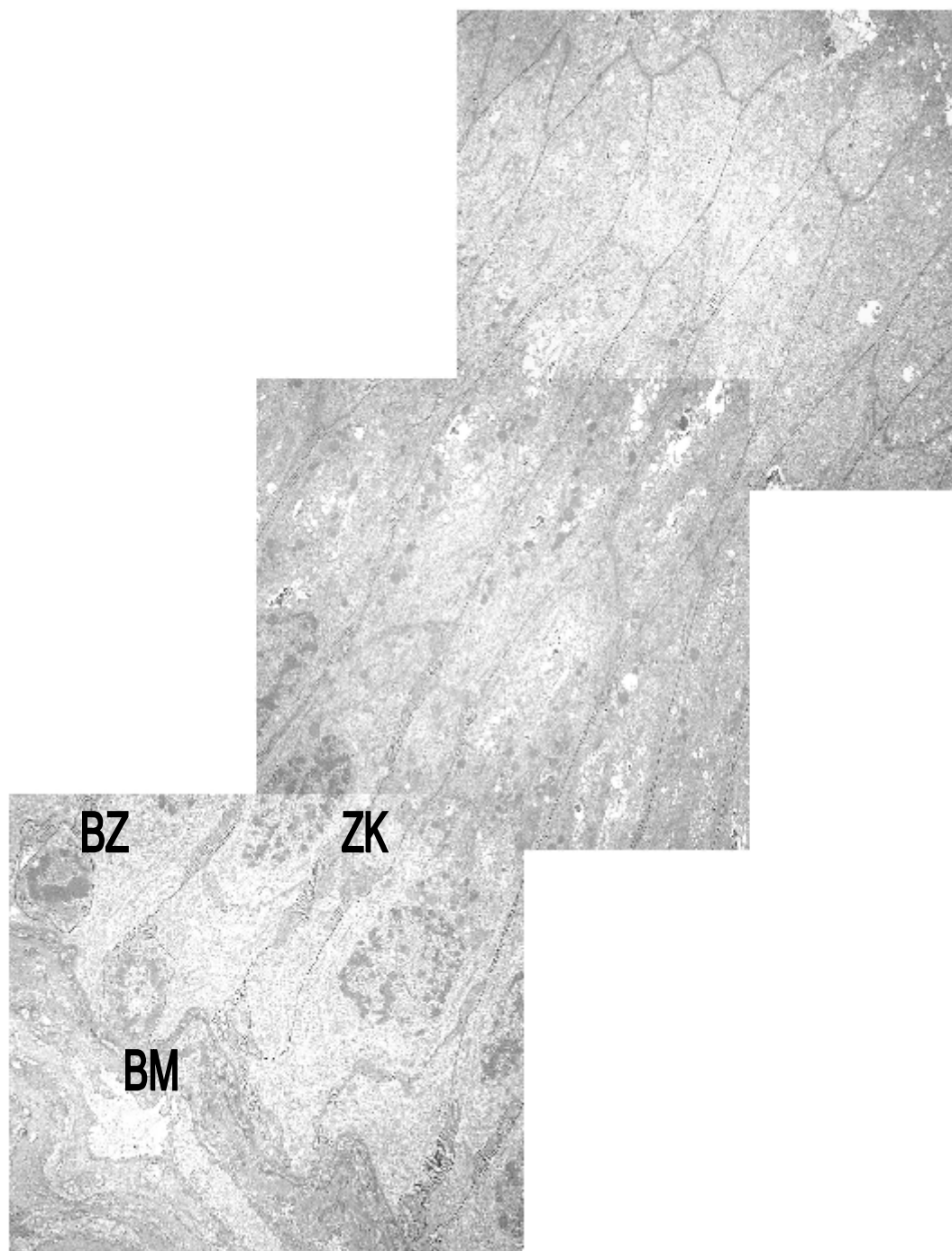


Abb. 40

Übersicht über das Epithel des Segment 4 des Ductus epididymidis, 1500 x

BM = Basalmembran, ZK = Kerne der Hauptzellen, BZ= Basalzelle

4.2.6. Ultrastruktur von Segment 5

Das Lumen in Segment 5 ist mit bis zu einer Länge von durchschnittlich 540 μm und einer Breite von 337,5 μm wesentlich größer als im Corpus epididymidis. Die Höhe des Epithels beträgt 29,7 μm . Die Stereozilien sind mit ebenfalls 5,4 μm genauso kurz wie in Segment 4 und oft miteinander verwachsen. Protrusionen kommen dazwischen kaum vor.

Im Lumen des Nebenhodenschwanzes kommen neben zahlreichen Spermien auch frühe Keimzellen sowie abgeschilferte Epithelzellen vor.

Im apikalen Zytoplasma der Hauptzellen sieht man neben einigen Vakuolen und einzelnen Vesikeln viele "multivesicular bodies". Dort lassen sich auch große Blasen finden, die fast die ganze Breite der Zelle einnehmen können.

Auffällig sind außerdem die gut ausgebildeten "tight junctions" im apikalen Zellbereich benachbarter Hauptzellen.

Im gesamten Zytoplasma der Hauptzellen sind dunkle Mitochondrien vom Cristae-Typ in unterschiedlicher Größe und Form zu finden.

Ebenso kommen Zisternen von rER sowohl im supranukleären als auch im infranukleären Zytoplasma größerer Zellen vor.

Der Kern der Hauptzellen ist oval bis rund und sitzt sehr weit basal. Er enthält große Mengen an dunklem, schollig verteiltem Heterochromatin.

Unmittelbar darüber liegt der Golgi-Apparat, der zahlreiche Vesikel umschließt. Zwischen Golgi-Zone und Kern lagert sich eine große Anzahl von großen, elektronendichten Vakuolen.

Die Basalzellen besitzen wiederum einen großen rundlichen Kern, der heller als der der Hauptzellen erscheint. Unter den Basalzellen verläuft die Basallamina gewellt.

Lymphozyten und Makrophagen kommen im Epithel kaum vor.

Das Interstitium ist gut vaskularisiert, sehr aufgelockert und enthält einige Lymphozyten.

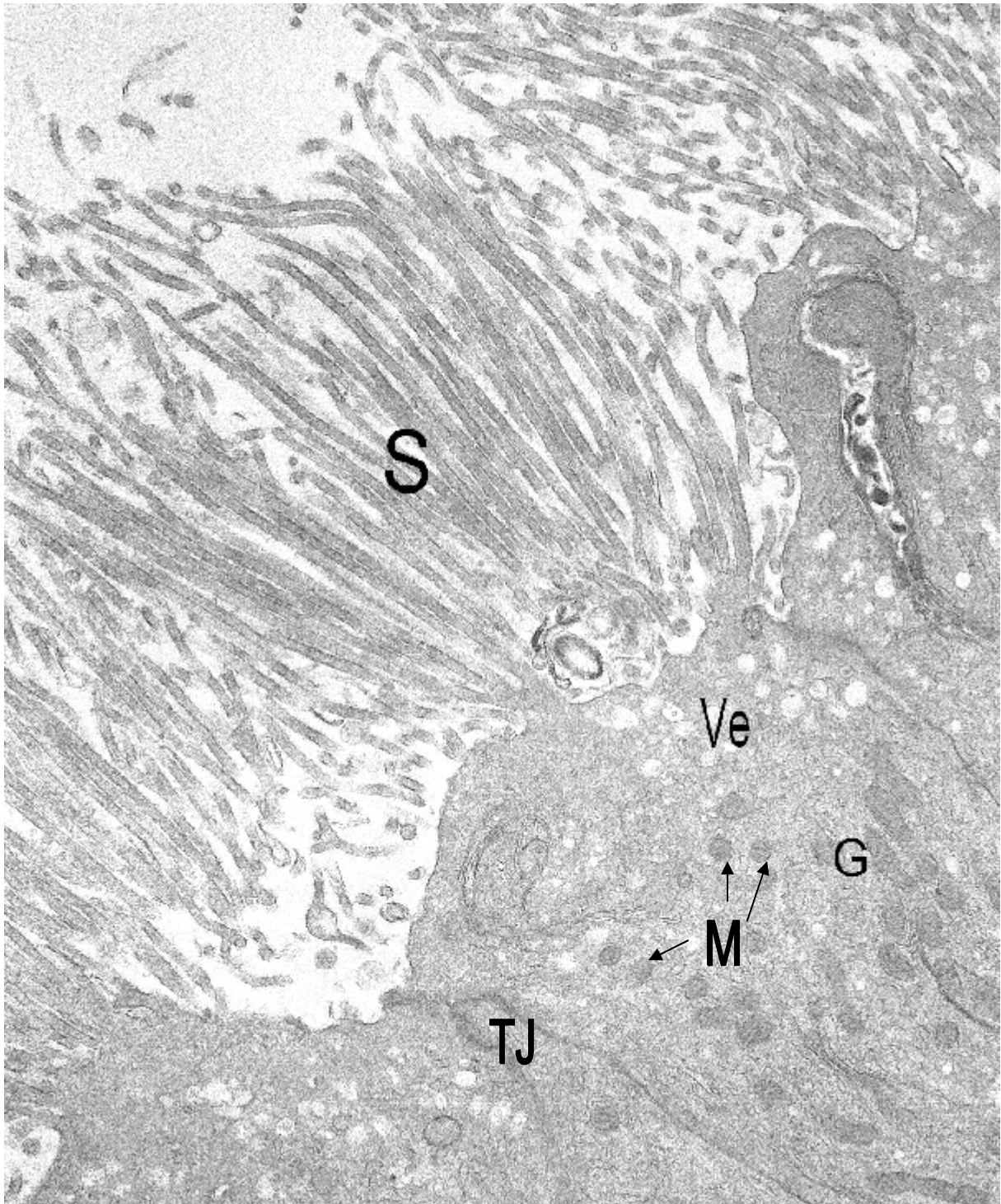


Abb. 41

Apikaler Bereich von Segment 5: Stereozilien (S), im apikalen Zytoplasma Vesikel (Ve) und Sekretgranula (G) und Mitochondrien (M). Die Hauptzellen sind durch "Tight junctions" (TJ) verbunden. 5500 x

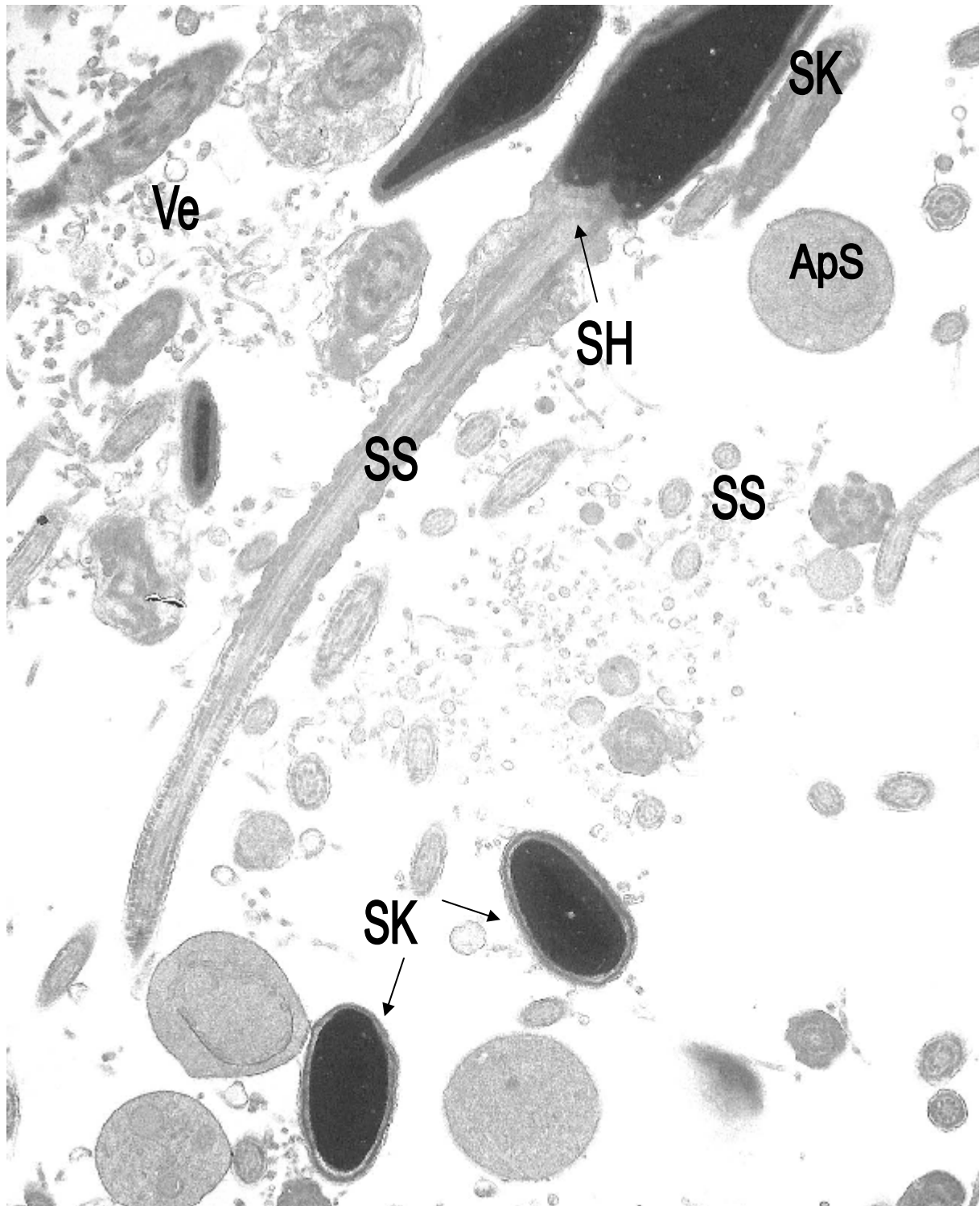


Abb. 42

Segment 5, Lumen: Spermium im Längsschnitt mit Kopf (SK), Hals (SH) und Schwanz (SS). Daneben zeigen sich zahlreiche Anschnitte von Spermischwänzen mit deutlich erkennbarer 9 x 2+2-Struktur, Vesikel (Ve) und apokrines Sekret (ApS), 3500 x

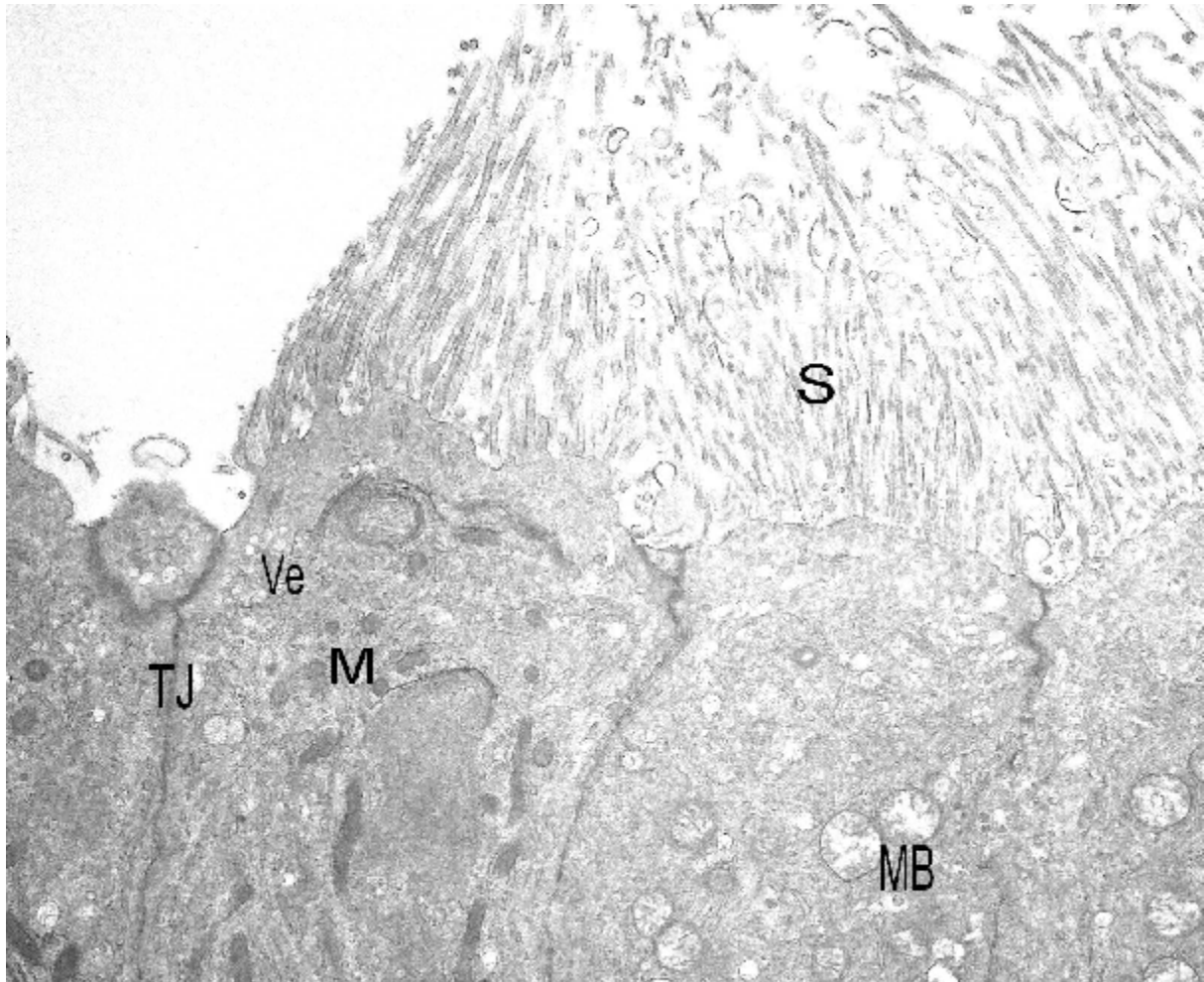


Abb. 43

Apikaler Bereich von Segment 5: Stereozilien (S), einige Mitochondrien (M), Verbindung durch "Tight junctions" (TJ), einzelne Vesikel (Ve), viele "Multivesicular bodies"(MB), 2500 x

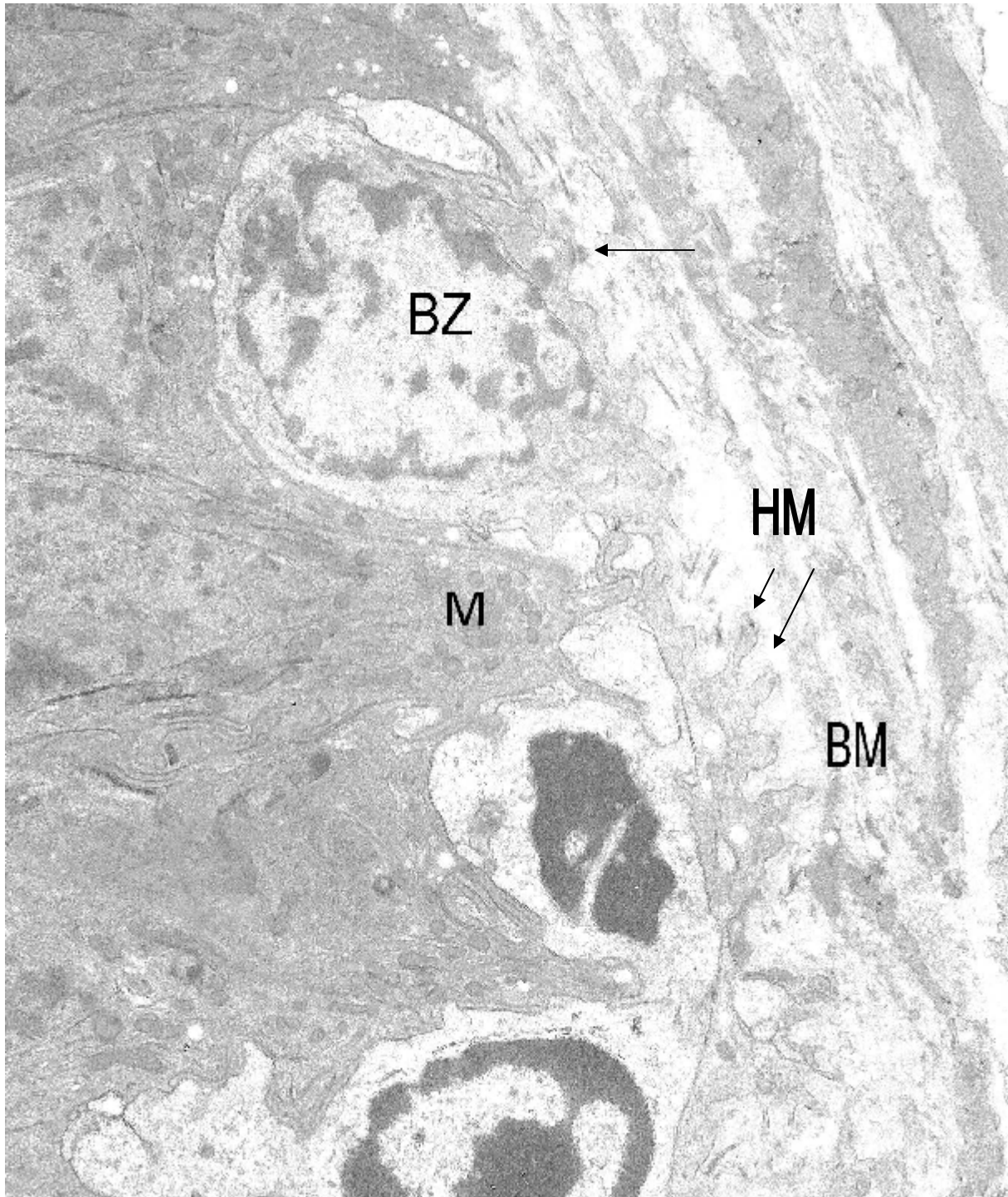


Abb. 44

Basaler Bereich von Segment 5: Basalzellen (BZ), dazwischen Zellausläufer der Hauptzellen mit Mitochondrien (M). hemidesmosomenartige (HM) Verbindung (—>) der Basalzellen mit der Basalmembran (BM), 3500 x

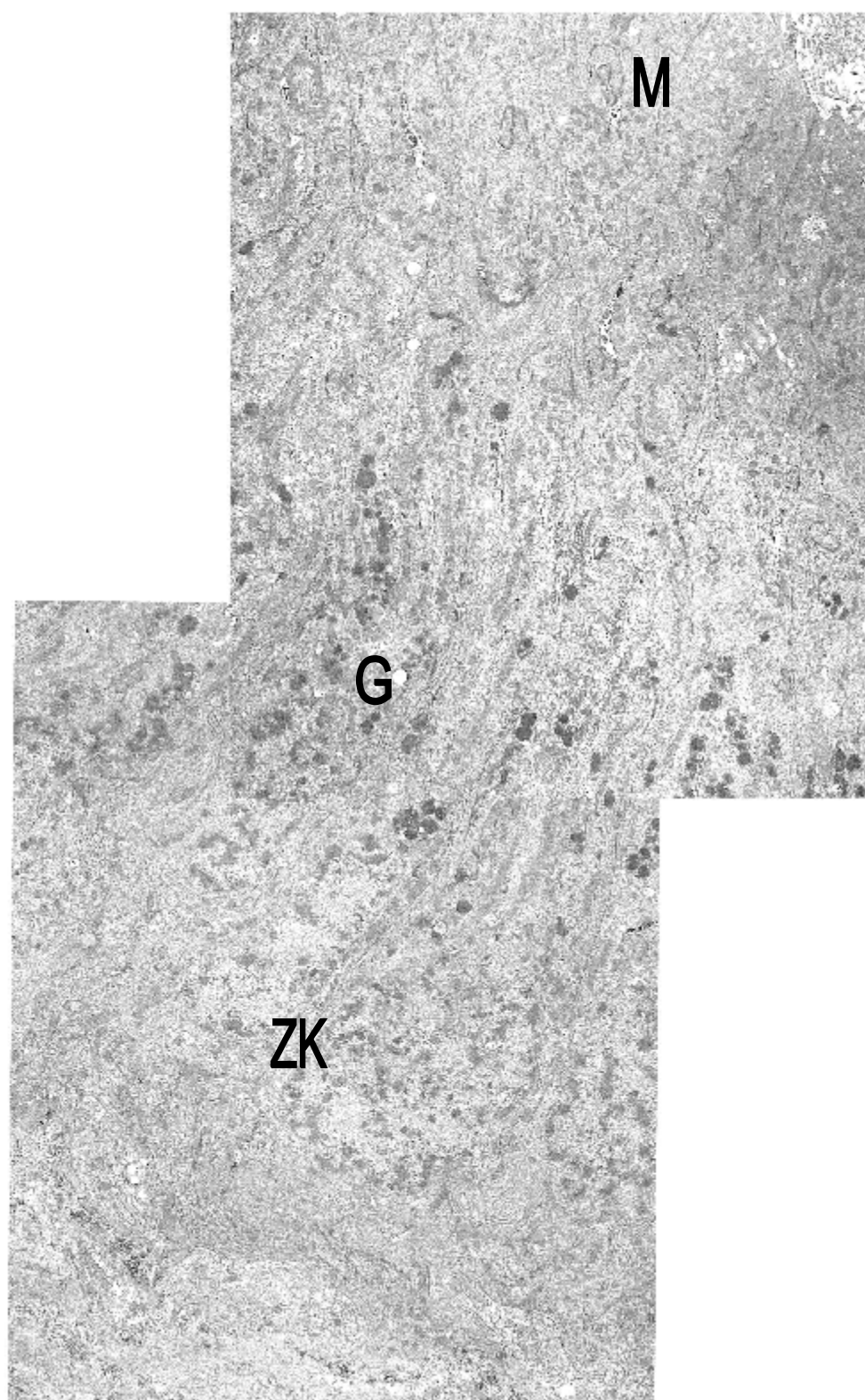


Abb. 45

Übersicht über das Epithel des Segment 5 des Ductus epididymidis, 1500 x

ZK = Kerne der Hauptzellen, BZ= Basalzelle, M = Mitochondrien, G = Granula

4.3. Immunhistochemische Untersuchung des Nebenhodens des Katers

Tab. 5

Übersicht über die immunhistologischen Reaktionen der Ductuli efferentes

	VEGF	KDR	GHR	Vim	Cytok	Lam	SMA	AR	ER	PR
Epithel										
Zytoplasma der Zellen mit Kinozilien	+/-	-	+	+	+++	+	-	-	-	-
Zytoplasma der Zellen mit Mikrovilli	+/-	-	+	+++	-	-	-	-	-	-
Kerne der Zellen mit Kinozilien	-	-	+	-	-	-	-	+/-	+++	-
Kerne der Zellen mit Mikrovilli	-	-	+	-	-	-	-	+/-	+++	-
Zellbesatz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Basalmembran	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Muskulatur	+/-	-	+	+	-	+	++	-	-	-
Interstitium	+/-	-	+/-	+	-	-	-	+	-	-
Gefäße	+/-	-	+	+	-	+	++	-	-	+
Spermien	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
EZ+KZ im Lumen	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-

(- = keine Reaktion, +/- = fragliche Reaktion, + = schwach positive Reaktion, ++ = deutlich positive Reaktion, +++ = stark positive Reaktion; EZ = Epithelzellen; KZ = unreife Keimzellen)

4.3.1. Immunhistochemischer Nachweis von VEGF im Nebenhoden des Katers

VEGF zeigt in allen drei Verdünnungen (1:800, 1:200, 1:100) des Antikörpers keine eindeutige Reaktion. Die Stereozilien und das Zytoplasma der Hauptzellen färbt sich geringfügig in allen Abschnitten an, ebenso Interstitium, Muskulatur und Gefäße. Spermien sind negativ und nehmen nur die blaue Kernfärbung an.

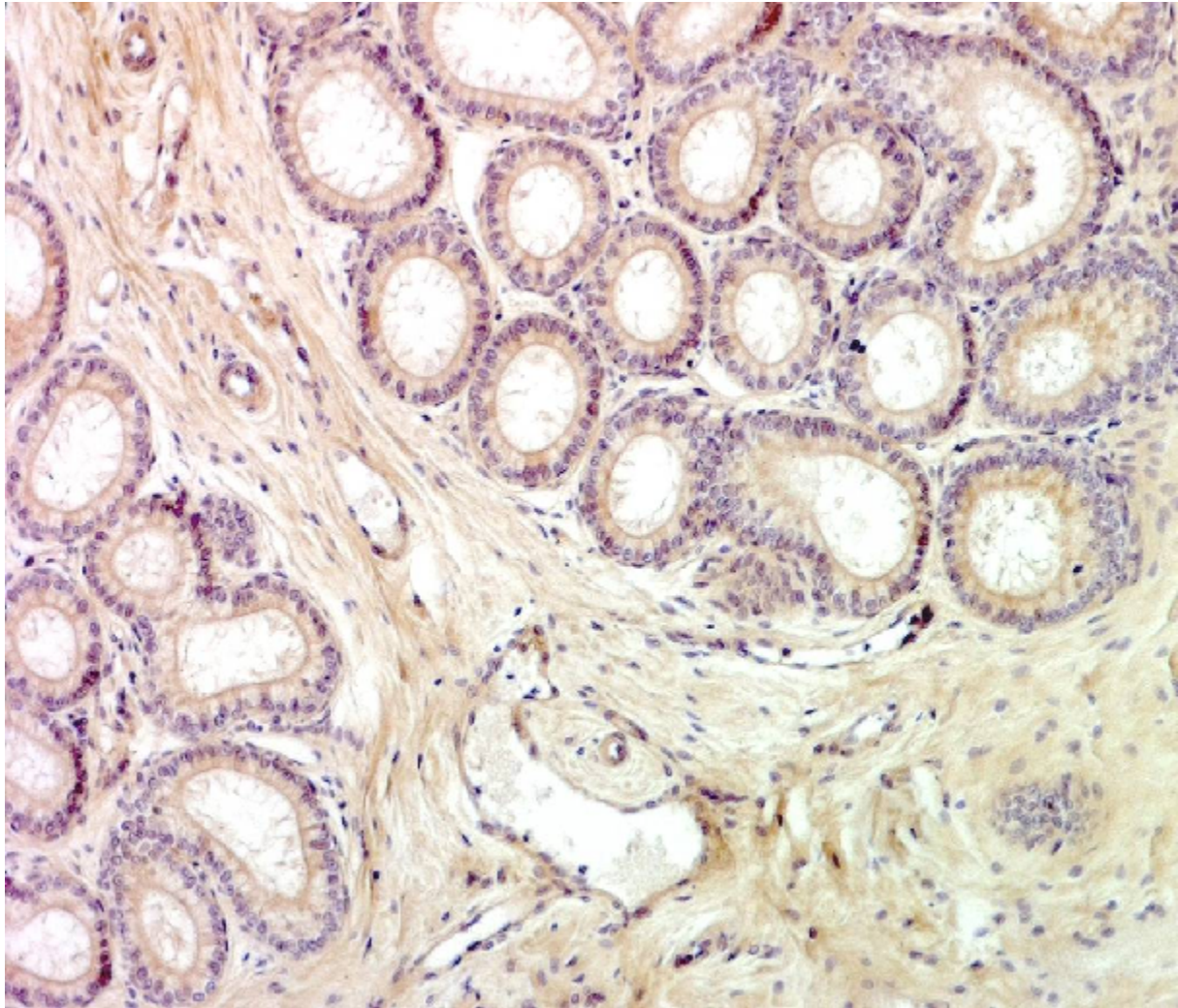


Abb. 46

Ductuli efferentes, immunhistochemischer Nachweis von VEGF, 310 x

Tab. 6

Immunhistochemischer Nachweis von VEGF im Nebenhoden des Katers

	S1	S2	S3	S4	S5
Epithel					
Zytoplasma	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Zellbesatz	-	-	-	-	-
Kerne EZ	-	-	-	-	-
Kerne AZ		-			-
Basalmembran	-	-	-	-	-
Muskulatur	+/	+/-	+/-	+/-	+/-
Interstitium	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Gefäße	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Spermien	-	-	-	-	-
EZ + KZ im Lumen	-	-	-	-	-

(- = keine Reaktion, +/- = fragliche Reaktion, + = schwach positive Reaktion, ++ = deutlich positive Reaktion, +++ = stark positive Reaktion; EZ = Epithelzellen; AZ = Apikalzellen, KZ = unreife Keimzellen)

4.3.2. Immunhistochemischer Nachweis von VEGF-Rezeptor (KDR) im Nebenhoden des Katers

KDR zeigt im Ductus epididymidis eine positive Reaktion der Zellkerne sowie eine geringfügige Reaktion des Zytoplasmas. Die Ductuli efferentes verhalten sich negativ. Der Bereich des Caput epididymis färbt sich dagegen stark an, wobei neben den Kernen auch supranukleär darüber teilweise deutlich positive granuläre Strukturen vorkommen, die dem Golgi-Apparat entsprechen dürften.

Der Nebenhodenkörper zeigt insgesamt eine schwache Reaktion.

Im Nebenhodenschwanz sind wieder die Kerne angefärbt, allerdings deutlich weniger als im Nebenhodenkopf. Eine Ausnahme bilden die Apikalzellen, deren Kerne eine ausgeprägt positive Reaktion zeigen

Alle anderen Strukturen einschließlich der luminalen Spermien sind negativ, nur einige abgeschilferte Epithelzellen geben im Lumen eine positive Reaktion.

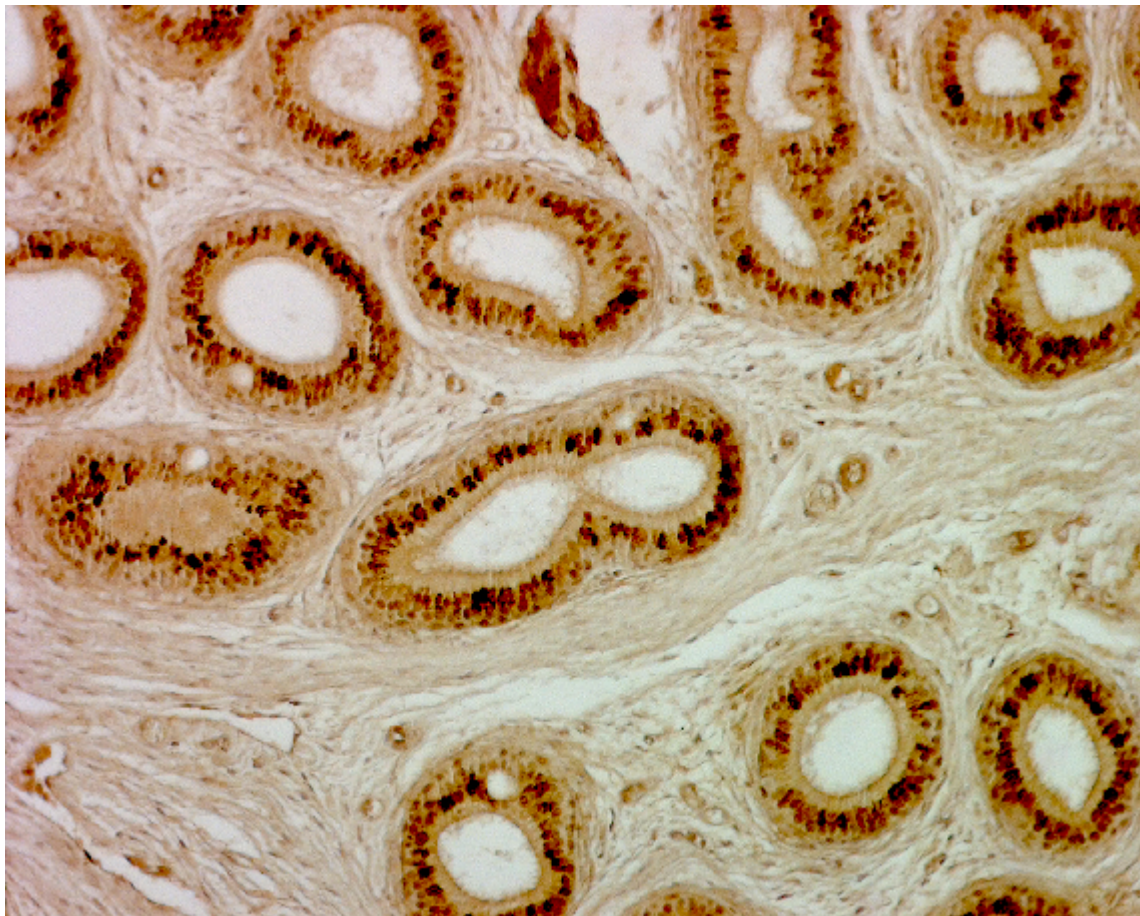


Abb. 47

Segment 4 des Ductus epididymidis, immunhistochemischer Nachweis von KDR,

200 x

Tab. 7

Immunhistochemischer Nachweis von KDR im Nebenhoden des Katers

	S1	S2	S3	S4	S5
Epithel					
Zytoplasma	+	+	+/-	+/-	+
Zellbesatz	-	-	-	-	-
Kerne EZ	++	++	+	+	++
Kerne AZ		+			+++
Basalmembran	-	-	-	-	-
Muskulatur	-	-	-	-	-
Interstitium	-	-	-	-	-
Gefäße	-	-	-	-	-
Spermien	-	-	-	-	-
EZ + KZ im Lumen	+	+	+	+	+

(- = keine Reaktion, +/- = fragliche Reaktion, + = schwach positive Reaktion, ++ = deutlich positive Reaktion, +++ = stark positive Reaktion; EZ = Epithelzellen; AZ = Apikalzellen, KZ = unreife Keimzellen)

4.3.3. Immunhistochemischer Nachweis von GHR im Nebenhoden des Katers

GHR lässt sich im gesamten Zytoplasma der Hauptzellen nachweisen. Die Intensität der Reaktion nimmt im Nebenhoden von proximal nach distal zu. Die glatte Muskulatur färbt sich ebenfalls schwach an. Auch die Muskulatur der Gefäße ist deutlich positiv. Spermien zeigen keine immunhistochemische Reaktion bei GHR-Nachweis, Epithelzellen im Lumen färben sich schwach positiv an.

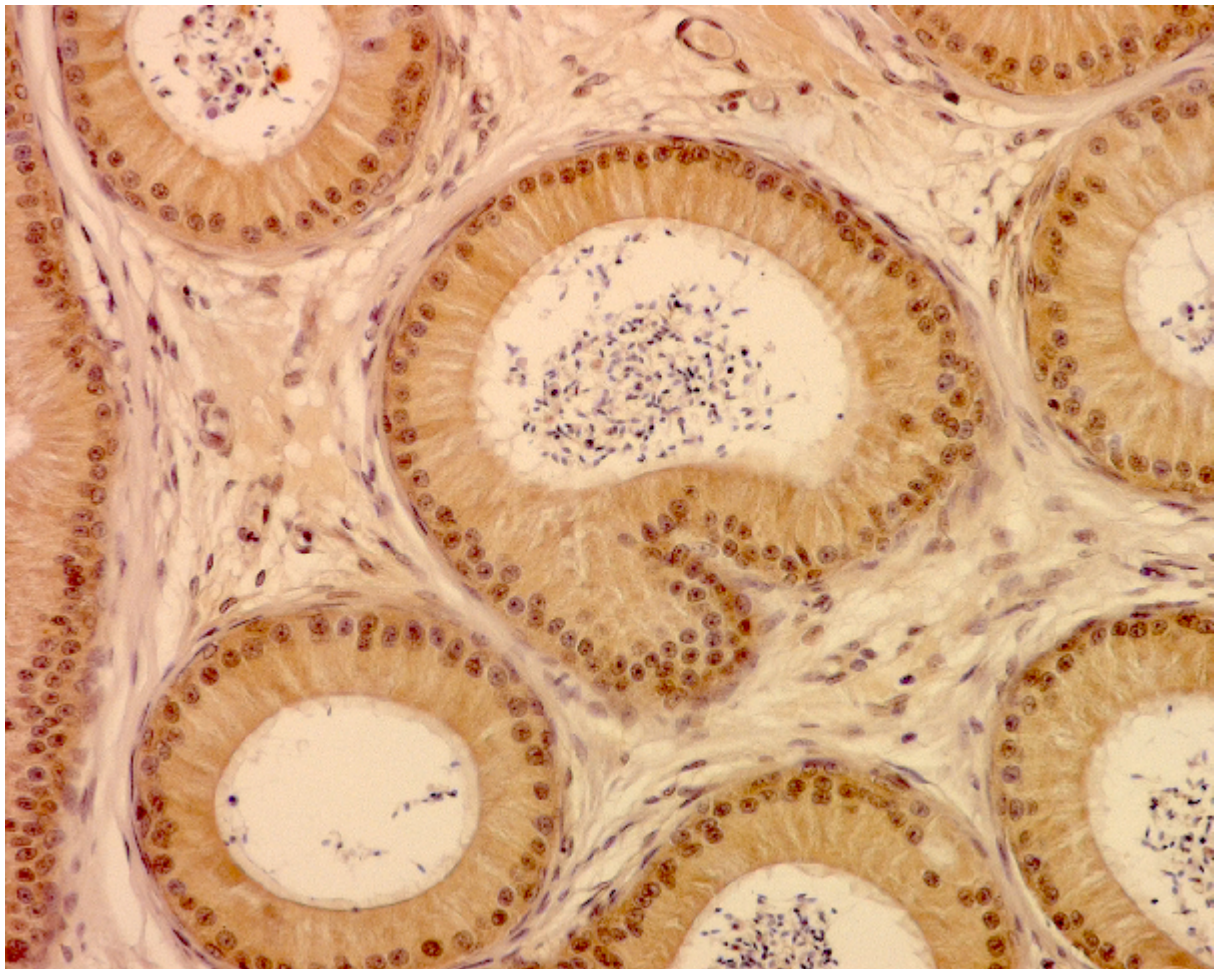


Abb. 48

Segment 3 des Ductus epididymidis, immunhistochemischer Nachweis von GHR,
450 x

Tab. 8

Immunhistochemischer Nachweis von GHR im Nebenhoden des Katers

	S1	S2	S3	S4	S5
Epithel					
Zytoplasma	+	+	++	++	+++
Zellbesatz	-	-	-	-	-
Kerne EZ	+	+	+	+	+
Kerne AZ		+			+
Basalmembran	-	-	-	-	-
Muskulatur	+	+	+	+	+
Interstitium	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Gefäße	+	+	+	+	+
Spermien	-	-	-	-	-
EZ + KZ im Lumen	+	+	+	+	+

(- = keine Reaktion, +/- = fragliche Reaktion, + = schwach positive Reaktion, ++ = deutlich positive Reaktion, +++ = stark positive Reaktion; EZ = Epithelzellen; AZ = Apikalzellen, KZ = unreife Keimzellen)

4.3.4. Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin im Nebenhoden des Katers

Nur im Epithel der Ductuli efferentes reagieren die Hauptzellen positiv auf Vimentin. Die Reaktion zeigt sich vorwiegend im basalen Bereich des Zytoplasmas zilienloser Zellen. Auch in Segment 1 zeigen einige Präparate noch eine schwache perinukleäre Anfärbung, alle anderen Epithelzellen sind negativ.

Vimentin ist über die ganze Länge des Nebenhodenganges in den Basalzellen und der Basallamina positiv, am stärksten in Segment 1. In den distalen Anteilen ist die Intensität etwas schwächer.

Außerhalb des Epithels reagieren Fibrozyten, Muskelzellen und sehr deutlich auch Gefäßendothelien positiv.

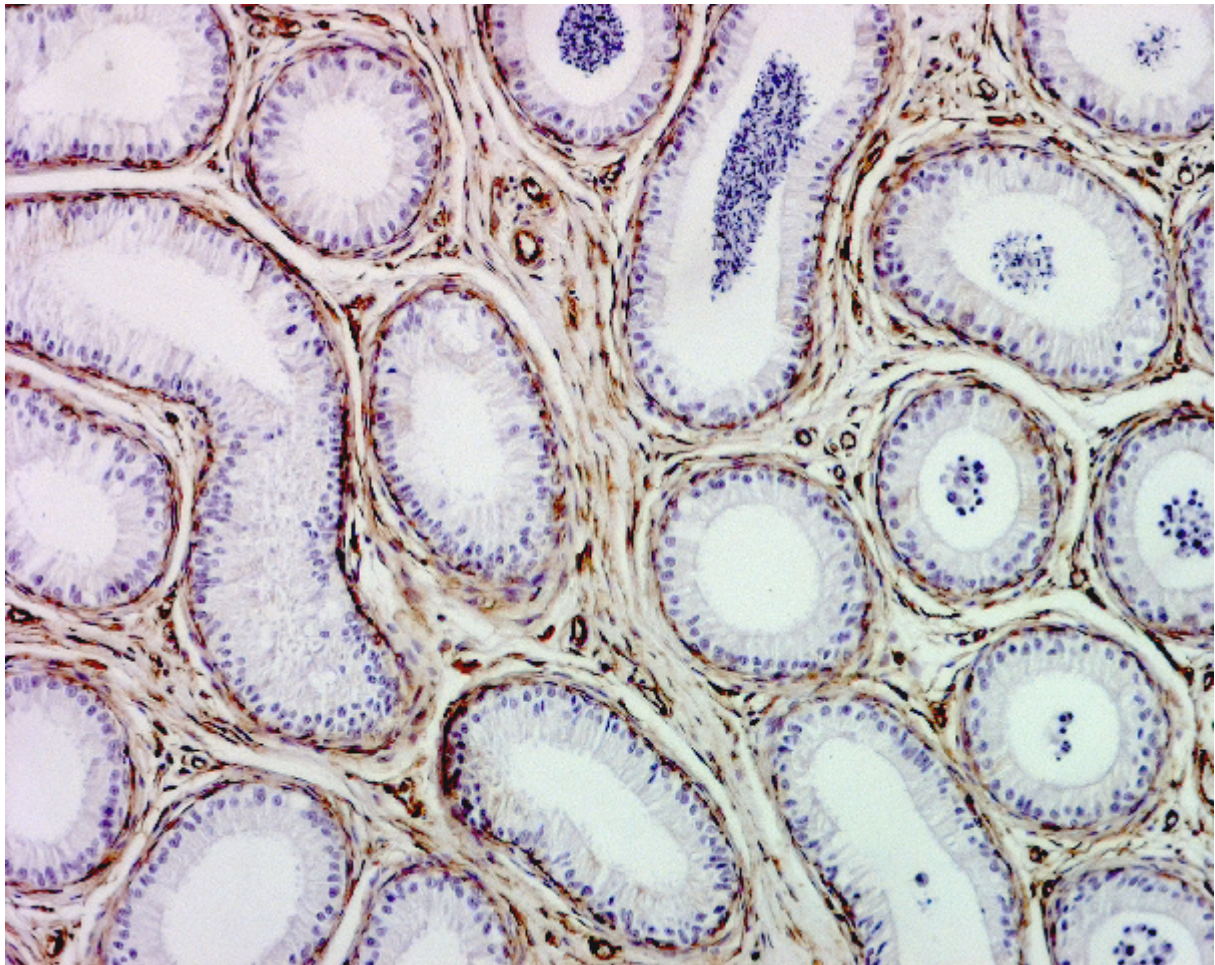


Abb. 49

Segment 5 des Ductus epididymidis, immunhistochemischer Nachweis von Vimentin, 150 x

Tab. 9

Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin im Nebenhoden des Katers

	S1	S2	S3	S4	S5
Epithel					
Zytoplasma	+/-	-	-	-	-
Zellbesatz	-	-	-	-	-
Kerne EZ	-	-	-	-	-
Kerne AZ		-			-
Basalmembran	+++	++	++	+	+
Muskulatur	+	+	+	+	+
Interstitium	+	+	+	+	+
Gefäße	++	++	++	++	++
Spermien	-	-	-	-	-
EZ + KZ im Lumen	-	-	-	-	-

(- = keine Reaktion, +/- = fragliche Reaktion, + = schwach positive Reaktion, ++ = deutlich positive Reaktion, +++ = stark positive Reaktion; EZ = Epithelzellen; AZ = Apikalzellen, KZ = unreife Keimzellen)

4.4.5. Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin im Nebenhoden des Katers

Im Gegensatz zu Vimentin zeigen bei Cytokeratin die zilienbesetzten Epithelzellen der Ductuli efferentes eine ausgeprägt positive Reaktion im gesamten Zytoplasma. Auch die Zellen des extratestikulären Rete testis färben sich an. Segment 1 zeigt eine noch ausgeprägtere Reaktion in allen Epithelzellen. Ab Segment 2 lässt sich eine Konzentration der Reaktion auf den luminalen Bereich erkennen, hier sind die Apikalzellen negativ, die Basalzellen sowie intraluminal Epithelzellen reagieren schwach positiv. Erst im Nebenhodenschwanz reagieren die Zellen ähnlich wie in Segment 1 wieder mit der Anfärbung des kompletten Zytoplasms. Alle Strukturen außerhalb des Epithels reagieren nicht auf diesen immunhistochemischen Nachweis.



Abb. 50

Segment 1 des Ductus epididymidis, immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin, 320 x

Tab. 10

Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin im Nebenhoden des Katers

	S1	S2	S3	S4	S5
Epithel					
Zytoplasma	+++	+	+/-	+/-	+++
Zellbesatz	-	-	-	-	-
Kerne EZ	-	-	-	-	-
Kerne AZ		-			-
Basalmembran	-	-	-	-	-
Muskulatur	-	-	-	-	-
Interstitium	-	-	-	-	-
Gefäße	-	-	-	-	-
Spermien	-	-	-	-	-
EZ + KZ im Lumen	-	+	+	+	+

(- = keine Reaktion, +/- = fragliche Reaktion, + = schwach positive Reaktion, ++ = deutlich positive Reaktion, +++ = stark positive Reaktion; EZ = Epithelzellen; AZ = Apikalzellen, KZ = unreife Keimzellen)

4.3.6. Immunhistochemischer Nachweis von Laminin im Nebenhoden des Katers

Beim der immunhistologischen Nachweis von Laminin wurde wie bei allen anderen Immunreaktionen eine Kernfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt. Die Kerne färbten sich aber nur schwach an. Wahrscheinlich wurde durch Vorbehandlung mit Protease die Kernstruktur beeinträchtigt.

Zusätzlich färbt sich in den Ductuli efferentes das Zytoplasma in der subapikalen Region der Zilienzellen unspezifisch an.

Laminin zeigt eine positive Reaktion in der Basallamina, der Ductuli efferentes.

Im gesamten Nebenhoden sind neben der Basalmembran des Epithels auch die glatten Muskelzellen positiv.

Auch die Endothelien aller Gefäße reagieren beim immunzytochemischen Nachweis von Laminin deutlich positiv.

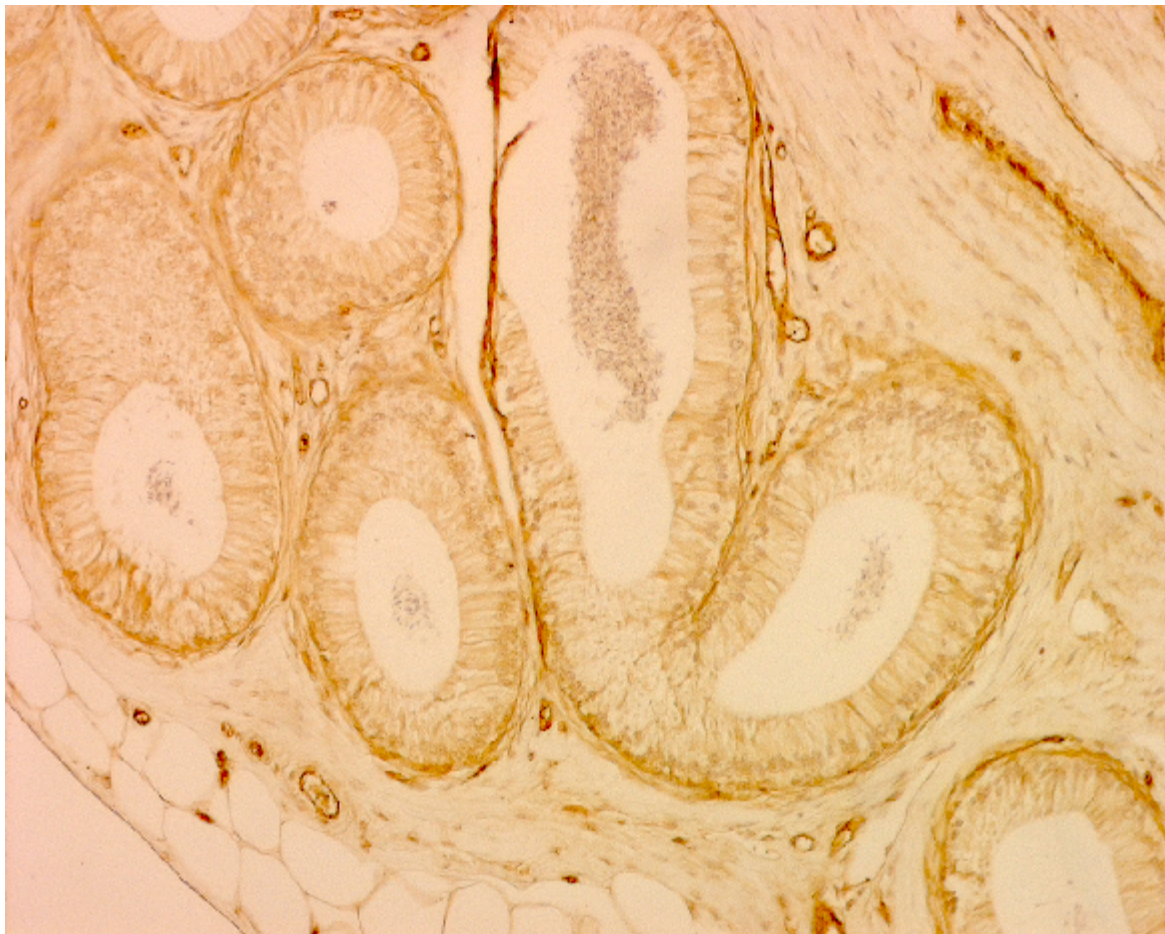


Abb. 51

Segment 4 des Ductus epididymidis, immunhistochemischer Nachweis von Laminin, 240 x

Tab. 11

Immunhistochemischer Nachweis von Laminin im Nebenhoden des Katers

	S1	S2	S3	S4	S5
Epithel					
Zytoplasma	-	+/-	+/-	+/-	+/-
Zellbesatz	-	-	-	-	-
Kerne EZ	-	-	-	-	-
Kerne AZ		-			-
Basalmembran	++	++	++	++	++
Muskulatur	++	++	++	++	++
Interstitium	-	-	-	-	-
Gefäße	++	+	+	+	+
Spermien	-	-	-	-	-
EZ + KZ im Lumen	-	-	-	-	-

(- = keine Reaktion, +/- = fragliche Reaktion, + = schwach positive Reaktion, ++ = deutlich positive Reaktion, +++ = stark positive Reaktion; EZ = Epithelzellen; AZ = Apikalzellen, KZ = unreife Keimzellen)

4.3.7. Immunhistochemischer Nachweis von "α-smooth muscle actin" (SMA) im Nebenhoden des Katers

α-SMA lässt sich nur in glatten Muskelzellen nachweisen. Man erkennt deshalb besonders gut die Dicke der Muskelschicht, die in den Ductuli efferentes aus einer bzw. wenigen Lagen glatter Muskelzellen besteht und im Verlauf des Ductus epididymidis deutlich zunimmt.

Auch die glatten Muskelzellen der Gefäße zeigen eine deutliche Reaktion beim Nachweis von α-SMA.

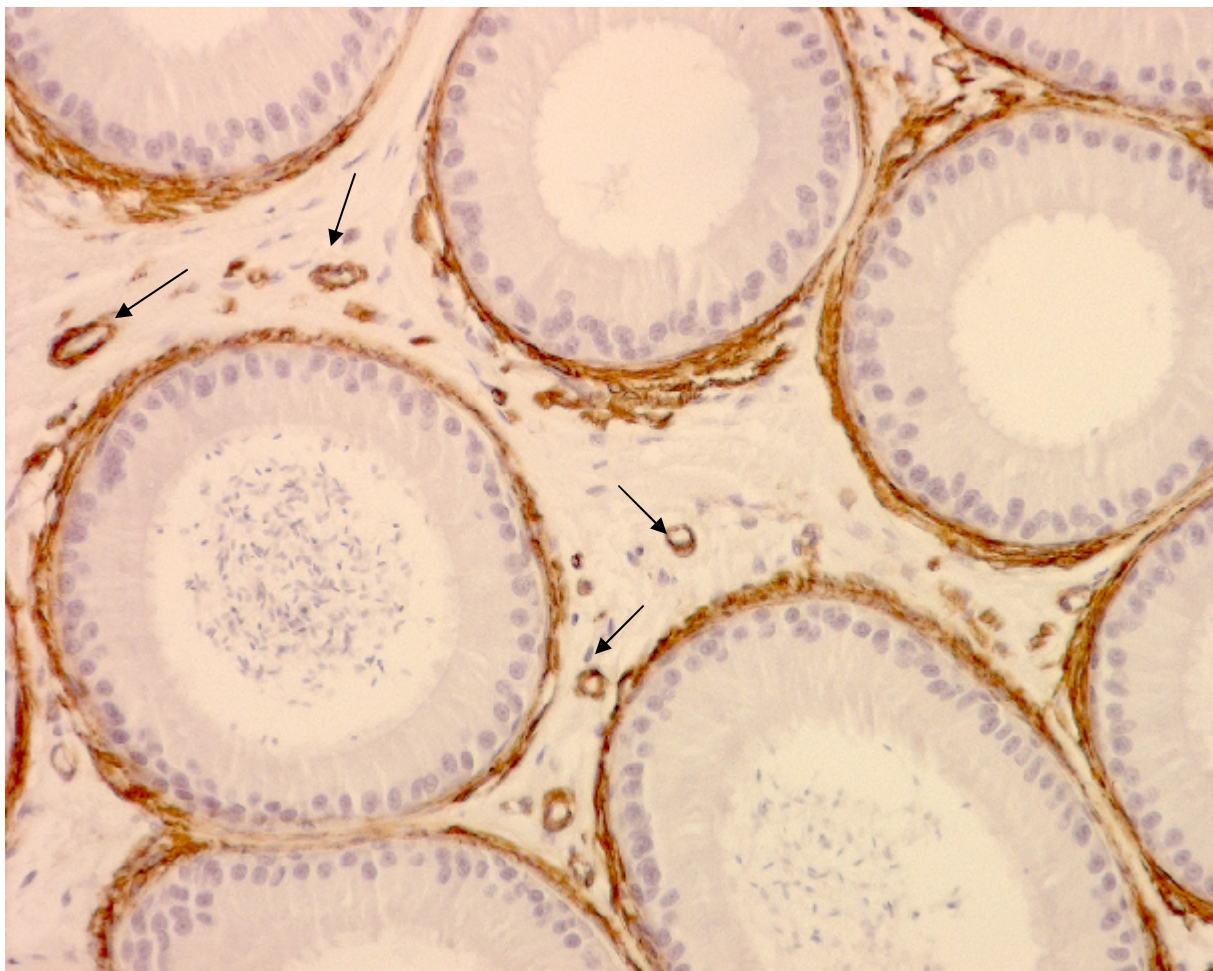


Abb. 52

Segment 4 des Ductus epididymidis, immunhistochemischer Nachweis von α-SMA, deutliche Reaktion der glatten Muskulatur des Ductus epididymidis sowie der Gefäße (→), 400 x

Tab. 12Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA im Nebenhoden des Katers

	S1	S2	S3	S4	S5
Epithel					
Zytoplasma	-	-	-	-	-
Zellbesatz	-	-	-	-	-
Kerne EZ	-	-	-	-	-
Kerne AZ		-			-
Basalmembran	-	-	-	-	-
Muskulatur	++	++	++	++	++
Interstitium	-	-	-	-	-
Gefäße (Muskelzellen)	++	++	++	++	++
Spermien	-	-	-	-	-
EZ + KZ im Lumen	-	-	-	-	-

(- = keine Reaktion, +/- = fragliche Reaktion, + = schwach positive Reaktion, ++ = deutlich positive Reaktion, +++ = stark positive Reaktion; EZ = Epithelzellen; AZ = Apikalzellen, KZ = unreife Keimzellen)

4.3.8. Immunhistochemischer Nachweis von Androgen-Rezeptor im Nebenhoden des Katers

Beim immunhistochemischen Nachweis von Androgen-Rezeptor zeigen sich die Kerne der Ductuli efferentes negativ bis schwach positiv. Ab Segment 1 des Ductus epididymidis ist eine deutliche Reaktion in den Kernen aller Hauptzellen erkennbar. Auch die Kerne der Apikalzellen in Segment 5, sind deutlich positiv. Die Intensität der immunhistochemischen Reaktion nimmt zur Cauda epididymidis hin ab.

Die Zellkerne vieler Fibroblasten im Interstitium reagieren in allen Segmenten positiv. In den Kernen der Basalzellen des Ductus epididymidis, den Muskelzellen und den Gefäße lässt sich immunhistochemisch kein Androgen- Rezeptor nachweisen.



Abb. 53

Immunhistochemischer Nachweis von Androgen-Rezeptor in den Kernen der Hauptzellen am Übergang Ductuli efferentes (De) und Segment 1 (S1), 270 x

Tab. 13

Immunhistochemischer Nachweis von Androgen-Rezeptor im Nebenhoden des Katers

	S1	S2	S3	S4	S5
Epithel					
Zytoplasma	-	-	-	-	-
Zellbesatz	-	-	-	-	-
Kerne EZ	+++	+++	+++	++	+/-
Kerne AZ		-			++
Basalmembran	-	-	-	-	-
Muskulatur	-	-	-	-	-
Interstitium (Fibroblasten)	++	++	++	++	++
Gefäße	-	-	-	-	-
Spermien	-	-	-	-	-
EZ + KZ im Lumen	-	-	-	-	-

(- = keine Reaktion, +/- = fragliche Reaktion, + = schwach positive Reaktion, ++ = deutlich positive Reaktion, +++ = stark positive Reaktion; EZ = Epithelzellen; AZ = Apikalzellen, KZ = unreife Keimzellen)

4.3.9. Immunhistochemischer Nachweis von Östrogen-Rezeptor- α im Nebenhoden des Katers

Beim immunhistochemischen Nachweis von Östrogen-Rezeptor- α färben sich vorwiegend die Kerne der Ductuli efferentes sehr deutlich an, wobei die Kerne der Zilienzellen und der zilienlosen Zellen gleiche Reaktionsintensität zeigen.

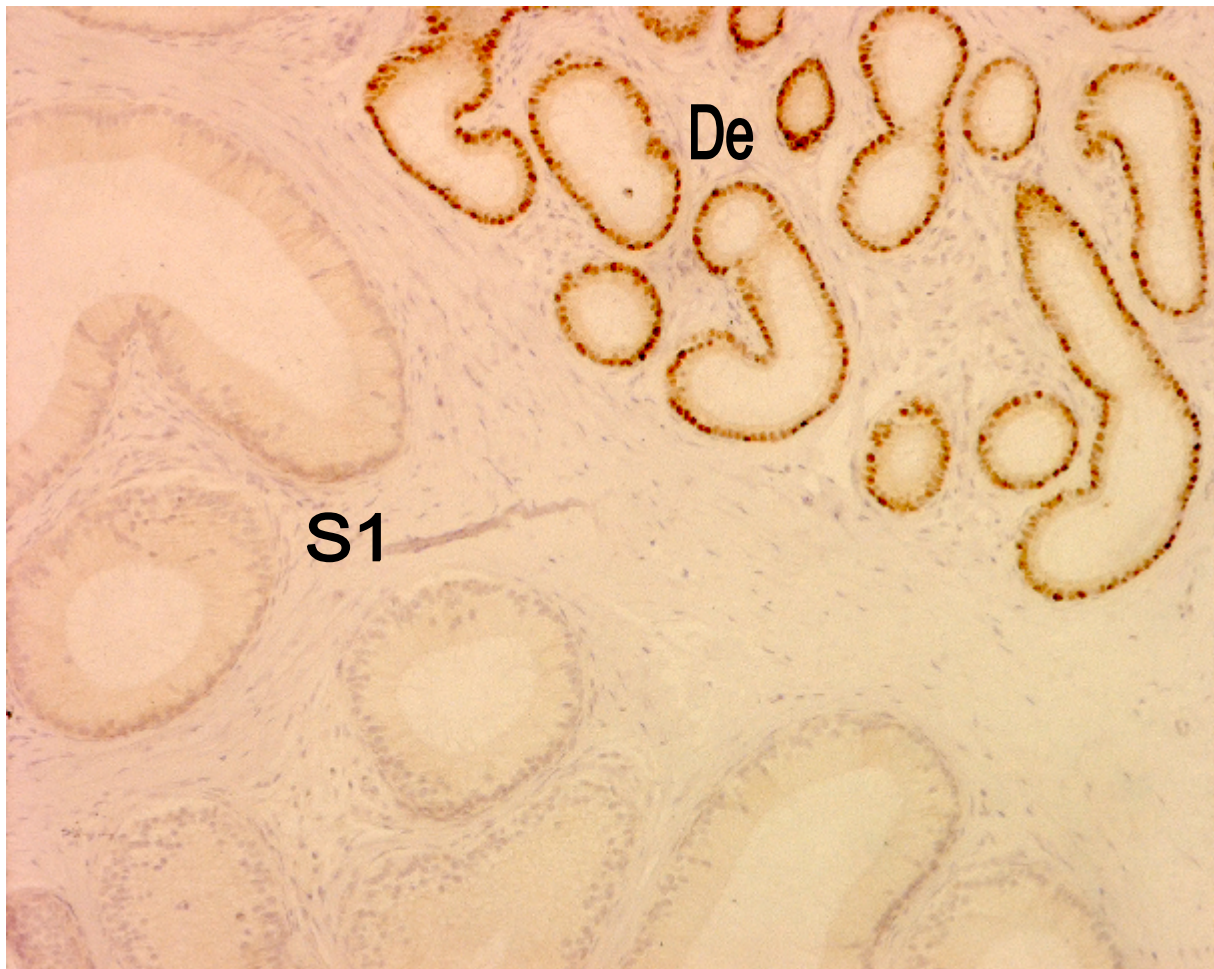


Abb. 54

Beim immunhistochemischen Nachweis von Östrogen-Rezeptor- α am Übergang der Ductuli efferentes (De) zu Segment 1(S1) des Ductus epididymidis zeigen die Kerne der Epithelzellen in den Ductuli efferentes eine deutlich positive Reaktion, 270 x

Tab. 14

Immunhistochemischer Nachweis von Östrogen-Rezeptor im Nebenhoden des Katers

	S1	S2	S3	S4	S5
Epithel					
Zytoplasma	-	-	-	-	-
Zellbesatz	-	-	-	-	-
Kerne EZ	-	-	-	-	-
Kerne AZ		-			-
Basalmembran	-	-	-	-	-
Muskulatur	-	-	-	-	-
Interstitium	-	-	-	-	-
Gefäße	-	-	-	-	-
Spermien	-	-	-	-	-
EZ + KZ im Lumen	-	-	-	-	-

(- = keine Reaktion, +/- = fragliche Reaktion, + = schwach positive Reaktion, ++ = deutlich positive Reaktion, +++ = stark positive Reaktion; EZ = Epithelzellen; AZ = Apikalzellen, KZ = unreife Keimzellen)

4.3.10. Immunhistochemischer Nachweis von Progesteron-Rezeptor im Nebenhoden des Katers

Im Nebenhoden des Katers lassen sich immunzytochemisch in den sich die Ductuli efferentes und in Segment 1 des Ductus epididymidis keine Progesteron-Rezeptoren nachweisen.

In Segment 2 bis 5 sind deutlich die Zilien positiv, wobei die Reaktion im Nebenhodenschwanz schon wieder etwas schwächer ausfällt. Ebenfalls positiv reagieren die intraluminalen Spermien sowie vereinzelte Fibrozyten und Kerne von Gefäßendothelzellen. Alle anderen Strukturen sind negativ.

Da der Progesteron-Rezeptor wie schon beschrieben zu den intranukleären Steroidrezeptoren gehört, müssten sich eigentlich wie bei Androgen und Östrogen die Kerne anfärben. Um der Herkunft der Progesteron-Rezeptoren im Lumen des Nebenhodens nachzugehen wurde hier auch der Hoden untersucht. Es zeigt sich eine leicht positive Reaktion der Spermien und deren Vorstufen, sonstige Zellen sind negativ.

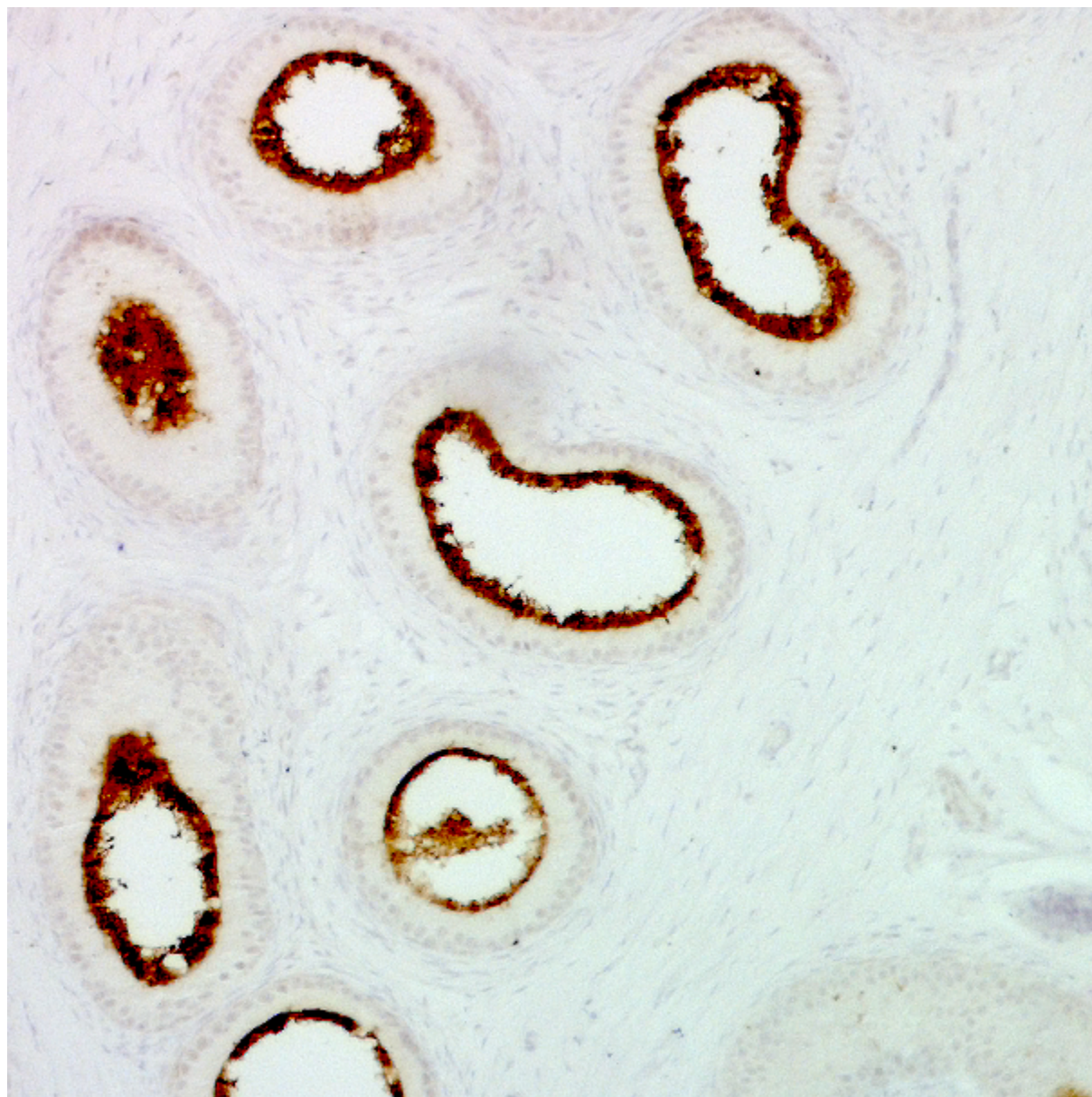


Abb. 55

Segment 5 des Ductus epididymidis, immunhistochemischer Nachweis von Progesteron-Rezeptor, 130 x

Tab. 15

Immunhistochemischer Nachweis von Progesteron-Rezeptor im Nebenhoden des

	S1	S2	S3	S4	S5
Epithel					
Zytoplasma	-	-	-	-	-
Zellbesatz	-	+++	+++	+++	++
Kerne EZ	-	-	-	-	-
Kerne AZ		-			-
Basalmembran	-	-	-	-	-
Muskulatur	-	-	-	-	-
Interstitium (Fibrozyten)	-	+	+	+	+
Gefäße	-	+	+	+	+
Spermien	-	++	++	++	++
EZ + KZ im Lumen	-	-	-	-	-

(- = keine Reaktion, +/- = fragliche Reaktion, + = schwach positive Reaktion, ++ = deutlich positive Reaktion, +++ = stark positive Reaktion; EZ = Epithelzellen; AZ = Apikalzellen, KZ = unreife Keimzellen)

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem histologischen und ultrastrukturellen Aufbau sowie der Histochemie des Nebenhodens des Katers.

Der anatomische Aufbau entspricht dem von anderen Tierarten, in der Ultrastruktur sowie bei histochemischen Reaktionen weichen die Ergebnisse oftmals von den an anderen Spezies erfassten Daten ab.

Der Hoden entlässt an seinem cranialen Pol aus dem extratestikulärem Rete testis zwischen 14 und 18 Ductuli efferentes. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Hemeida et al. (1978) überein.

Aus der heterogenen zellulären Ausstattung der Abschnitte des Nebenhodens ergibt sich das typische Bild der einzelnen Segmente des Ductus epididymidis. Der Nebenhodenkopf besteht beim Kater aus den Ductuli efferentes, die den unmittelbar an den Hoden anschließenden Teil darstellen, sowie zum großen Teil aus den Segmenten 1 und 2 des Ductus epididymidis. Danach schließt das Corpus epididymidis an, das die Segmente 3 und 4 umfasst. Der Nebenhodenschwanz beinhaltet Segment 5 des Ductus epididymidis.

Meine Ergebnisse bestätigen die von Prem (1992) vorgeschlagene Einteilung des Ductus epididymidis. Sanchez et al. (1998) unterteilen das Corpus hingegen nicht, da ihrer Meinung nach das Epithel von Segment 3 und 4 zu große Gemeinsamkeiten aufweist.

Die Anzahl von Segmenten kann bei verschiedenen Tierarten sehr unterschiedlich sein. So findet man beim Affen (Ramos et al., 1977) und beim Hund vier (Chandler et al., 1981), beim Hamster (Calvo et al., 1995), und bei der Maus fünf (Abou-Haila et al., 1984), beim Eber (Wrobel et al., 1974), Hengst, Bullen und Schafbock sechs (Nicander, 1958), beim Meerschweinchen sieben (Greenberg, 1979) beim Menschen acht (Holstein, 1969) und bei der Ratte neun (Zunke et al., 1981) Segmente.

Es gibt deutliche Unterschiede beispielsweise in der Zellausstattung und der sekretorischen Aktivität, die Funktion ist aber bei allen Tierarten gleich und somit nicht von der Anzahl der Segmente abhängig.

Das Epithel der Ductuli efferentes ist einschichtig und iso- bis hochprismatisch. Es ist mit durchschnittlich 14,4 µm wesentlich niedriger als im Nebenhodengang. Es wird von zwei verschiedenen Arten von Zellen gebildet. Es besteht aus Zellen, die mit Kinozilien von etwa 13,5 µm Länge ausgestattet sind mit längsovalen Kern, sowie aus sekretorischen, mit Bürstensaum besetzten Hauptzellen mit rundlichem Kern. Die beiden Zelltypen sind oft bezüglich ihres Färbeverhaltens sowie ihrer histochemischen Reaktion unterschiedlich. Die Zilienzellen färben sich in der HE-Färbung sowie bei der PAS-Reaktion deutlich stärker an. Die unterschiedliche Anfärbbarkeit bei den histochemischen Reaktionen lässt darauf schließen, dass bestimmte Funktionen nur von einem Zelltyp ausgeführt werden.

Die Lumina der Ductuli efferentes sind sehr unterschiedlich groß, aber hauptsächlich drei Größen zuzuordnen. Die durchschnittlich 94,5 µm, 40,5 µm und 27 µm messen. Sie enthalten fast immer massenhaft Spermien.

Das Epithel des Nebenhodenganges besteht aus Hauptzellen mit Stereozilien, Basalzellen und Lymphozyten. Daneben kommen vereinzelt Makrophagen vor. In Segment zwei und fünf treten Apikalzellen auf, die relativ schmal sind und einen weit lumenwärts gelegenen Kern haben.

Der Übergang von den Ductuli efferentes zu Segment 1 des Ductus epididymidis ist deutlich erkennbar. Das Epithel des Nebenhodenganges ist dort zweireihig, hochprismatisch und etwa 38,8 µm hoch. Die Stereozilien weisen eine Länge von 16 µm auf. Im Lumen des ersten Segmentes sind kaum Spermien zu finden.

Einige Autoren (Hoffer und Hamilton, 1974; Crabo et al., 1971) versuchten durch Ligatur des Ductus epididymidis zu eruieren, an welcher Stelle des Nebenhodens defekte Spermien resorbiert werden. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass dafür das Epithel im Caput verantwortlich ist, im Besonderen zilienlose Zellen.

Eventuell wird beim Kater diese Aufgabe vom Epithel der Ductuli efferentes übernommen, da im Lumen der Ductuli efferentes meist massenhaft Spermien zu finden sind, in Segment 1 treten dagegen sehr wenige bis keine mehr auf.

Im folgenden Segment 2 ist das Epithel mit durchschnittlich 32 µm etwas niedriger. Es enthält neben den Hauptzellen auch Apikalzellen, die sich durch einen weit apikal gelegenen keulenförmigen Kern auszeichnen. Die Stereozilien sind mit 20 µm etwas länger als in Segment 1. Im Lumen kommen wiederum kaum Spermien vor. Die

Basalzellen dieses Segments besitzen einen langgestreckten Kern, der parallel zur Basalmembran liegt.

Segment 3 unterscheidet sich als erster Abschnitt des Corpus epididymidis vor allem durch seinen sehr kurzen Stereozilienbesatz der Hauptzellen (5,1 µm) und Basalzellen mit weitgehend rundem Kern vom Caput epididymidis.

Segment 4 weist prägnante intraepitheliale Hohlräume auf, deren Funktion unklar ist. Diese sind von Stereozilien ausgekleidet, gelegentlich findet man darin auch Spermien. Die Stereozilien sind in Segment 4 mit durchschnittlich 5,4 µm überwiegend kurz, gelegentlich lassen sich auch lange Stereozilien nachweisen. Des Weiteren treten zwischen den Stereozilien Protrusionen auf.

Dies deutet darauf hin, dass an diesen Zellen verstärkt apokrine Sekretion stattfindet. Auch in Segment 5, dem Nebenhodenschwanz, liegt ein hochprismatisches Epithel vor. Hier ist das Lumen sehr weit und mit vielen Spermien gefüllt. Dies weist darauf hin, dass auch beim Kater die Cauda epididymidis der Hauptort der Spermien-speicherung ist (Foldsey und Bedford, 1982).

Die Zahl der Muskelzellen nimmt im Verlauf des Ductus epididymidis deutlich zu. Während die Muskulatur in den Ductuli efferentes meist einlagig ist, besteht sie im Nebenhodenschwanz etwa aus sieben Lagen glatter Muskelzellen und hat eine Dicke von durchschnittlich 54 µm. Beim Rind beträgt die Dicke der Muskelschicht in der Cauda epididymidis sogar über 80 µm (Sinowatz, 1981).

Bei der elektronenmikroskopischen Betrachtung werden die Unterschiede im Zellaufbau der einzelnen Segmenten noch deutlicher.

Die hochprismatischen Hauptzellen zeigen hinsichtlich ihrer Höhe und Ausstattung mit Organellen in den einzelnen Segmenten des Ductus epididymidis charakteristische Unterschiede, die auf spezielle Aufgaben der einzelnen Abschnitte hindeuten. Meine Untersuchungen zeigen, dass im Nebenhoden besonders aktive Sekretions- und Resorptionsprozesse in den Segmenten 1 und 2 des Ductus epididymidis ablaufen.

Dies wurde auch beim Kaninchen (Nicander, 1965) und Menschen (Cooper, 1986) festgestellt. Von den Hauptzellen der Ductuli efferentes und den ersten Abschnitten des Nebenhodenkanals werden 90% der im Hoden gebildeten Flüssigkeit resorbiert (Sinowatz, 1992).

Zahlreiche Granula und intraepitheliale Vakuolen, ein gut ausgeprägter Golgi-Apparat, sowie ein stark ausgebildetes raues endoplasmatisches Retikulum sprechen für Sekretion. Invaginationen der Zellmembran oder „coated vesicles“ deuten sowohl auf sekretorische (Flickinger, 1981) als auch auf resorptive Vorgänge hin (Hoffer et al., 1972).

Innerhalb des Lumens des Ductus epididymidis befindet sich eine unterschiedlich große Anzahl an Spermien, sowie Ansammlungen von apokrinem Sekret. Die Zahl der Spermien nimmt von Segment 1, wo sie sich nur vereinzelt sammeln, zu. Ein Grund für die verstärkte Ansammlung der Spermien in den distalen Abschnitten könnte das stark vergrößerte Lumen und die daraus resultierende verringerte Strömungsgeschwindigkeit sein (Holstein, 1964).

Bei den histochemischen Nachweisen reagieren meist die verschiedenen Abschnitte des Nebenhodens sehr unterschiedlich. Dies weist wiederum auf eine regionale Spezialisierung der einzelnen Segmente des Ductus epididymidis hin. Die licht- und elektronenmikroskopische Einteilung des Nebenhodenganges des Katers konnte histochemisch bestätigt werden.

In meinen Untersuchungen ließ sich VEGF in den Ductuli efferentes und im Ductus epididymidis nicht eindeutig nachweisen. Beim Menschen hingegen konnten Ergün et al., (1998) im Nebenhoden eine deutliche Konzentration von VEGF beobachten. Brown et al. (1995) wiesen VEGF in menschlichem Sperma nach. Die Konzentration stieg allerdings nach Vasektomie an. Sie schlossen daraus, dass VEGF im männlichen Geschlechtstrakt nicht vorwiegend in Hoden oder Nebenhoden gebildet wird, sondern zum Großteil aus Samenblasendrüse und Prostata stammt. Felines VEGF wurde von Koga et al. (2002) geklont und sequenziert. Es stimmt demnach zwischen 94,2 und 98,4% mit caninem, bovinem oder humanem VEGF überein und konnte immunhistologisch mit Antikörpern gegen humanes VEGF₁₆₅ nachgewiesen werden. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass VEGF auch im Nebenhoden des Katers vorhanden ist, sich jedoch durch den verwendeten Antikörper nicht nachweisen ließ.

Im Gegensatz zu VEGF zeigt KDR (VEGF-Rezeptor-2) eine deutliche Reaktion im Nebenhoden des Katers. KDR reagiert in den Ductuli efferentes nicht. Dafür färben sich im Caput die Kerne der Epithelzellen des Ductus epididymidis und das

perinukleäre Zytoplasma sehr deutlich an. Im gesamten Corpus ist eine Reaktion der Kerne der Hauptzellen vorhanden, sie ist aber schwach. Im Nebenhodenschwanz ist die immunzytochemische Reaktion auf KDR wieder deutlich positiv, wenn auch etwas schwächer als im Caput epididymidis. KDR ließ sich beim Menschen in den Ductuli efferentes bzw. im Caput epididymidis in Endothelzellen großer Gefäße, sowie in zilienlosen Epithelzellen des Nebenhodenganges nachweisen. Im Corpus reagierten einige Basalzellen und kapillären Endothelzellen positiv (Ergün et al., 1998).

Da sich der VEGF-Rezeptor im Nebenhoden des Katers deutlich nachweisen lässt, gehe ich davon aus, dass auch VEGF vorhanden sein könnte, das sich aber wie erwähnt durch den verwendeten Antikörper nicht nachweisen ließ.

Des Weiteren wurde der Nebenhoden des Katers auf seinen Gehalt an "Growth hormone receptor" (GHR) untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass alle Hauptzellen im gesamten Ductus epididymidis eine starke Reaktion, die von proximal nach distal zunimmt, zeigen. Die umgebende Muskelschicht färbt sich schwach an, die Spermien bleiben hingegen negativ.

Eine ähnliche Lokalisation des GHR ließ sich auch bei der Ratte nachweisen (Lobie et al., 1990a). Allerdings färben sich bei der Ratte nicht alle hochprismatischen Epithelzellen an und die Intensität der Reaktion war im Verlauf des Ductus epididymidis gleichbleibend.

Die stärkste Immunreaktivität war sowohl bei Lobie et al. (1990a+b) als auch bei meinen Untersuchungen in den Epithel- und Endothelzellen vorhanden, was vermuten lässt, dass GH in diesen Zellen zumindest teilweise an der Steuerung der Reproduktion beteiligt ist.

Zu Vimentin im Nebenhoden gibt es zahlreiche Untersuchungen und ebenso viele unterschiedliche Ergebnisse. In der vorliegenden Arbeit zeigten vor allem die Basalzellen eine deutliche Anfärbung im gesamten Nebenhoden. Am stärksten war die Reaktionsintensität in Segment 1, weiter distal wurde sie schwach. Außerdem zeigten auch die Epithelzellen der Ductuli efferentes eine positive Reaktion beim immunzytochemischen Nachweis von Vimentin, wobei das basale Zytoplasma der sekretorischen Zellen eine deutlichere Anfärbung zeigte.

Kasper und Stosiek (1989) beschreiben in ihrer Arbeit über den Nebenhoden des Menschen, dass in den Ductuli efferentes sowohl die zilienbesetzten als auch die zilienlosen Zellen positiv auf den Vimentin-Nachweis reagieren. Am stärksten reagiert nach ihrer Beobachtung das proximale Corpus, weiter distal nimmt die Intensität ab. Die distalen Nebenhodenanteile sind, mit Ausnahme einiger Basalzellen und Makrophagen, negativ. Dinges et al. (1991) kamen ebenfalls beim Menschen dagegen zu dem Ergebnis, dass eher die distalen Anteile des Nebenhodens und zwar das basale Zytoplasma der Hauptzellen deutlich auf Vimentin reagiert. Palacios et al. (1993) beschreiben eine abnehmende Intensität der Reaktion der Hauptzellen des menschlichen Nebenhodens nach distal. Bei ihren Untersuchungen konnten sie Vimentin nicht in den Apikalzellen nachweisen. Der Nebenhoden des Hundes wurde von Wakui et al. (1994) untersucht. Hier wird beschrieben, dass das Zytoplasma der Hauptzellen beim Nachweis von Vimentin positiv reagiert. Im Caput epididymidis ist die Reaktion sehr ausgeprägt, im Corpus weniger deutlich und im Nebenhodenschwanz sehr schwach bis negativ. Sanchez et al. (1998) untersuchten den Nebenhoden des Katers. Nach ihren Befunden kommt Vimentin in Hauptzellen und Apikalzellen überhaupt nicht vor. Basalzellen und Muskelzellen reagieren dagegen im gesamten Ductus epididymidis deutlich positiv. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Befunde verschiedener Autoren ist davon auszugehen, dass Vimentin im Nebenhoden ein tierartsspezifisches Verteilungsmuster hat. Die abweichenden Ergebnisse innerhalb einer Spezies lassen sich möglicherweise auf Unterschiede bei den verwendeten Antikörpern, unterschiedliche Fixierung und Probengewinnung zurückführen.

Auch beim immunzytochemischen Nachweis von Cytokeratin dürften Speziesbesonderheiten eine wichtige Rolle spielen. In der vorliegenden Arbeit reagierten in den Ductuli efferentes ebenfalls wie bei Wakui et al. (1994) beschrieben, die zilienbesetzten Zellen. Im ersten Segment des Ductus epididymidis reagiert das gesamte Zytoplasma aller Epithelzellen stark positiv. Ab Segment 2 färbt sich vorwiegend das apikale Zytoplasma der Hauptzellen an, die Basalzellen erscheinen schwach positiv. Im Nebenhodenschwanz färbt sich wieder das gesamte Zytoplasma der Hauptzellen deutlich an. Muskelzellen sind in Übereinstimmung mit Sanchez et al. (1998) negativ.

Laut Kasper und Stosiek (1989) ist der Nachweis von Cytokeratin beim Menschen auf ganzer Länge des Nebenhodens in glatten Muskelzellen in gleichbleibender Intensität vorhanden. Dinges et al. (1991) wiesen Cytokeratin in den Hauptzellen des Ductus epididymidis im apikalen Zytoplasma nach. Palacios et al. (1993) kamen zu dem Ergebnis, dass Cytokeratin vom Caput zur Cauda hin zunimmt und hauptsächlich in Basalzellen und Apikalzellen vorkommt.

Wakui et al. (1994) fanden Cytokeratin beim Hund in den Ductuli efferentes in den zilienbesetzten Zellen. Im Ductus epididymidis waren vor allem die Apikalzellen, weniger die Haupt- und Basalzellen positiv. In der Cauda epididymidis sind die Basalzellen negativ.

Sanchez et al. (1998) beschreiben beim Kater im Gegensatz zu Kasper und Stosiek (1989), dass alle Muskelzellen negativ sind. Dagegen reagieren Basalzellen und Apikalzellen durchweg positiv. Die Hauptzellen des Ductus epididymidis zeigen im Caput eine sehr schwache, im Schwanz hingegen eine ausgeprägte Reaktion. Demnach ist die Verteilung von Cytokeratin im Nebenhoden bei Hund und Katze sehr ähnlich, beim Menschen jedoch davon unterschiedlich.

Ein weiterer immunzytochemischer Nachweis wurde mit Laminin durchgeführt, das Bestandteil der Basalmembran ist.

Beim Kater reagiert vorwiegend die Basalmembran des Ductus epididymidis positiv. Allerdings nimmt die Intensität der Reaktion von proximal nach distal ab.

Eine Besonderheit lässt sich in Segment 1 des Ductus epididymidis erkennen, da sich hier die Stereozilien anfärben, die in allen anderen Segmenten negativ sind. Vermutlich handelt es sich dabei um eine unspezifische Reaktion. Neben der Basalmembran des Ductus epididymidis reagieren auch die Basalmembranen der umgebenden Gefäße deutlich positiv.

Auch bei der Geschlechtsreifen Ratte wurde Laminin in der Basalmembran durchgehend im gesamten Ductus epididymidis und Ductus deferens nachgewiesen, dagegen scheint die Basalmembran bei 13 Tage alten Feten noch diskontinuierlich. Außerdem kommt Laminin in der Basalmembran der glatten Muskelzellen vor, weshalb die Reaktion in Richtung Cauda deutlicher erscheint (Gelly et al., 1989).

Demnach steht die Intensität der Reaktion auf den immunzytochemischen Nachweis von Laminin im direkten Zusammenhang mit der Entwicklung der Wand des Nebenhodenganges und damit auch der Fortpflanzungsfähigkeit.

Steroidhormonrezeptoren wurden bereits im Nebenhoden verschiedener Spezies untersucht (Pujol und Bayard, 1979; Klinefelter und Amann, 1980; Toney und Danzo, 1988; Tekpetey et al., 1989; Sar et al., 1990; Roselli et al., 1991; Cooke et al., 1991; Ergün et al., 1997).

Beim Kater reagieren die Ductuli efferentes nicht beim immunzytochemischen Nachweis von Androgen-Rezeptor (AR). In den Segmenten des Ductus epididymidis reagieren die Hauptzellen positiv, wobei die Intensität von proximal nach distal abnimmt. In der Cauda epididymidis sind einige Hauptzellen sogar negativ. Hier färben sich jedoch die Kerne der Apikalzellen an. Außerdem sind im gesamten Verlauf die Fibrozyten des Interstitiums positiv. Muskelzellen, Basalzellen und Gefäße zeigen keine Reaktion.

Pujol und Bayard (1979) stellten bei der Ratte fest, dass sich die meisten Androgen-Rezeptoren im Epithel des Caput befinden, die geringste Zahl enthält das Corpus epididymidis. Eine Ligatur der Ductuli efferentes veränderte den Gehalt an Androgen-Rezeptoren nicht. Bei der Ratte befindet sich der Großteil von DHT-Rezeptoren in den Hauptzellen (Sar und Wilson, 1989). Laut Klinefelter und Amann (1980) liegt dies vermutlich daran, dass die 5α -Reduktase, die Testosteron in DHT umwandelt, ebenfalls in den Hauptzellen vorkommt.

Tekpetey und Amann (1988), fanden bei Untersuchungen des Schafbock-Nebenhodens heraus, dass die Affinität der Androgen-Rezeptoren zu Dihydrotestosteron zehn Mal höher ist als zu Testosteron. Beim Schafbock sind die Ductuli efferentes Androgen-Rezeptor-negativ, das restliche Caput epididymidis sowie das zentrale Corpus epididymidis zeigen beim immunhistochemischen Nachweis von Androgen-Rezeptor eine deutlich positive Reaktion. Die Rezeptoren kommen auch hier vorwiegend in den Hauptzellen des Ductus epididymidis vor. In geringerem Maße enthalten auch die glatten Muskelzellen und Fibroblasten des Interstitiums Androgen-Rezeptoren (Tekpetey et al., 1989).

Ein unterschiedlicher Gehalt an Androgen-Rezeptoren in den verschiedenen Abschnitten des Nebenhodens wurden auch beim Rhesus-Affen (Roselli et al.,

1991), und beim Kaninchen (Toney und Danzo, 1988) beschrieben.

Interessanterweise verhalten sich beim Rhesus- Affen die Ductuli efferentes positiv (Roselli et al., 1991). Bei Ratte (Sar et al., 1990), Rhesus-Affe (Roselli et al., 1991) und Maus (Cooke et al., 1991) reagieren außerdem die Stroma-Zellen positiv.

Ungefroren et al. (1997) untersuchten den Nebenhoden des Menschen. Sie fanden Androgen-Rezeptoren in Hauptzellen und in geringer Konzentration in den Basalzellen des Ductus epididymidis. Die Stärke der Reaktion nimmt von proximal nach distal ab. Die Ductuli efferentes waren negativ.

Damit decken sich die Ergebnisse beim Kater mit denen von anderen Tierarten mit Ausnahme des Rhesus –Affen.

Auch der Östrogen- Rezeptor (ER) wurde im Nebenhoden einiger Tierarten nachgewiesen. Beim Kater kommt ER α in den Kernen aller Hauptzellen der Ductuli efferentes vor, wobei kein Unterschied zwischen Zilienzellen und zilienlosen Zellen beobachtet werden konnte. Im Epithel des Ductus epididymidis ließ sich dagegen keine nennenswerte Konzentration von ER nachweisen.

Beim Menschen erfolgt die Expression des Östrogen-Rezeptors (ER) gegensätzlich zum Androgen–Rezeptor. Die Ductuli efferentes und das Rete testis zeigen eine deutliche Reaktion auf den immunzytochemischen Nachweis von ER, der Nebenhodengang nur eine sehr schwache.

Außerdem ist der Östrogen –Rezeptor auch in Endothelzellen der Nebenhoden-Gefäße vorhanden (Ergün et al., 1997). Tekpetey und Amann (1988) wiesen Östrogen-Rezeptor beim Schafbock im gesamten Nebenhoden in den Zellkernen der Hauptzellen des Ductus epididymidis nach. Vom Caput zur Cauda epididymidis war die Reaktionsintensität ansteigend.

Zhou et al. (2002) untersuchten am Nebenhoden der Maus die Verteilung von Östrogen–Rezeptor α (ER α) und Östrogen–Rezeptor β (ER β). ER α konnte in den Hauptzellen der Ductuli efferentes und in Stroma-Zellen nachgewiesen werden, außerdem in Apikalzellen, Basalzellen und Hauptzellen des Caput epididymidis. ER β konnten sie dagegen über die ganze Länge des Epididymis in den Kernen der Hauptzellen nachweisen.

Die Expression von AR und ER α in verschiedenen Zellen lässt sich durch die unterschiedliche embryonale Herkunft erklären. Die Ductuli efferentes entwickeln

sich aus den Kanälchen des Mesonephros, der Ductus epididymidis dagegen aus dem Wolff'schen Gang.

Der Nebenhoden des Katers wurde weiterhin auf seinen Gehalt an Progesteron-Rezeptoren untersucht.

Es reagieren die Ductuli efferentes sowie Segment 1 nicht mit dem Progesteron-Rezeptor-Antikörper. Ab Segment 2 färben sich deutlich die Stereozilien an. Diese positive Reaktion wird im Nebenhodenschwanz allerdings wieder schwächer.

Außerdem reagieren die intraluminalen Spermien zwischen Segment 1 und Segment 5.

Progesteron ist ein Hormon, das den weiblichen Organismus auf eine Trächtigkeit vorbereitet und diese erhält. Da es aber auch in der Nebennierenrinde gebildet wird, kommt es auch bei männlichen Tieren vor (Silbernagl und Despopoulos, 1991).

Im menschlichen Nebenhoden konnte Progesteron nur in den Ductuli efferentes nachgewiesen werden. Der Gehalt an Progesteron im Nebenhodensekret soll den Spermientransport und die sekretorische Aktivität der Epithelzellen der Ductuli efferentes günstig beeinflussen (Ergün et al., 1997).

Um zu klären, woher der Progesteron-Rezeptor im Lumen des Nebenhodens des Katers stammt, wurde hier zusätzlich auch der Hoden untersucht.

Es zeigt sich eine leichte Anfärbung der Spermien und deren Vorstufen, alle anderen Zellen sind negativ.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden 45 Nebenhoden von klinisch gesunden Katern im Alter zwischen fünf Monaten und zehn Jahren im Hinblick auf Morphologie, Ultrastruktur und Histochemie untersucht. Es wurden zehn verschiedene Immunhistologische Reaktionen auf verschiedene Proteine bzw. Hormonrezeptoren durchgeführt.

Der Nebenhoden des Katers entspricht in seinem anatomischen Aufbau dem anderer Tierarten. Durch das Auftreten verschiedener Zellarten, unterschiedlicher Epithelhöhe und der Länge des Zellbesatzes sowie Form und Lage des Nukleus kann der Epididymidis des Katers in fünf verschiedenen Segmente unterteilt werden. Die Ductuli efferentes bilden mit Segment 1 und 2 den Nebenhodenkopf, Segment 3 und 4 entsprechen dem Corpus epididymidis und der Nebenhodenschwanz besteht aus Segment 5.

Die Ductuli efferentes besitzen zilienbesetzte und zilienlose Zellen, die in verschiedenen Färbungen und immunhistologischen Reaktionen auch unterscheiden.

Das Epithel des Ductus epididymidis des Katers besteht aus Hauptzellen, Basalzellen und Lymphozyten, sowie Apikalzellen in Segment 2 und 5.

Neben den genannten Zellarten bzw. ihrer Kerne oder des Zytoplasmas wurden bei den immunhistologischen Reaktionen Spermien, luminale Epithelzellen, Muskulatur, Gefäße und die Basallamina beurteilt.

VEGF ("Vascular endothelial growth factor") ist immunhistochemisch nur schwach nachweisbar, dafür zeigt sich der VEGF-Rezeptor KDR deutlich positiv, vor allem in den Zellkernen der Hauptzellen von Nebenhodenkopf und -schwanz. GHR ("Growth hormone receptor") reagiert in Kernen der Hauptzellen und Apikalzellen des gesamten Nebenhodens, sowie deren Zytoplasma. Außerdem ist es in den Gefäßen und der Muskulatur nachweisbar. Vimentin kommt im Zytoplasma der Ductuli efferentes sowie in Muskulatur, Interstitium, Gefäßen und Basallamina des Ductus epididymidis vor. Cytokeratin färbt das Zytoplasma der Zilienzellen der Ductuli efferentes und der Hauptzellen in Segment 1 und 5 an. Laminin kommt vorwiegend in der Muskulatur, den Gefäßen und der Basallamina, in geringer Menge auch im Zytoplasma der Hauptzellen vor. α -SMA ("Smooth muscle actin") zeigt sich

ausschließlich in den glatten Muskelzellen der Ductuli efferentes, des Nebenhodenganges und der Gefäße, ohne regionale Unterschiede. Androgen-Rezeptor ist in den Kernen aller Hauptzellen, vorwiegend aber von Segment 1 bis 4 sowie im Interstitium nachweisbar. Östrogen-Rezeptor α reagiert dagegen nur in den Kerne der Ductuli efferentes und färbt in Segment 4 und 5 den Zellbesatz und die Spermien an. Progesteron-Rezeptor reagiert im gesamten Nebenhodengang positiv im Interstitium, den Gefäßen und den luminalen Spermien. Außerdem färbt es den Zellbesatz von Segment 2 bis 5 an.

7. Summary

Ultrastructural and immunohistochemical studies of the epididymis of the tomcat (*Felis silvestris* “*familiaris*”)

In the present work, 45 epididymes from healthy tomcats between five month and ten years of age were examined using light and electron microscopical methods as well as immunohistochemistry.

Ten different histochemical reactions to various proteins and hormone receptors were studied.

It was found that the structure of the feline epididymidis basically corresponds to that of other mammalian species and can be divided into five distinct segments on the basis of morphological differences.

The ductuli efferentes together with segment 1 and 2 of the epididymal duct are forming the caput epididymidis, segment 3 and 4 belong to the corpus epididymidis and segment 5 corresponds to the cauda epididymidis.

The epithelium of the efferent ductules shows two different cell types: cells with long cilia and cells with short microvilli which react in different ways in several immunohistochemical stainings.

The epithelium of the ductus epididymidis consists of principal cells, basal cells, lymphocytes and macrophages. In segment 2 and 5 an additional cell type, mitochondria rich apical cells, are found.

Using immunohistochemical techniques, the distribution of following functional proteins were studied: VEGF (vascular endothelial growth factor) shows a light unspecific staining, but the VEGF receptor KDR reacts positive in the nuclei of principal cells in the caput and cauda epididymidis. Immunoreactivity of GHR (growth hormone receptor) is found in the nuclei and cytoplasm of principal and apical cells as well as in the endothelium of blood vessels and in smooth muscle cells. Vimentin is found in the cytoplasm of ductuli efferentes as well as in muscle cells and vessels.

Antibodies to cytokeratin lead to a strong positive reaction in the epithelium of the efferent ductules and in the principal cells of segments 1 and 5 of the ductus epididymidis. Laminin could be immunohistochemical demonstrated in the basal lamina of the epithelium of the ductuli efferentes and the ductus epididymidis, in the

basal lamina around smooth muscle cells and the basal lamina of the endothelium of blood vessels. The immunostaining for α SMA (smooth muscle actin) is seen in smooth muscle cells of efferent ductules, the ductus epididymidis and of blood vessels. Immunoreactive AR (androgen receptor) was found in the nuclei of the principal cells in the whole epididymidis as well as in the fibroblasts of the interstitium. Antibodies to ER α (estrogen receptor α) immunostained the nuclei of the epithelium of the ductuli efferentes, but did not react with the epithelium of the ductus epididymidis. Immunostaining for PR (progesterone receptor) is seen in the fibroblasts in the interstitium of the whole epididymis.

8. Literaturverzeichnis

Abou- Heila A, Fain-Maurel MA, 1984

Regional differences of the proximal part of mouse epididymis: morphological and histochemical characteristics.

Anat Rec 60:276-92

Acott TS, Carr DW, 1984

Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and quiescence factor.

Biol Reprod 30:926-35

Acott TS, Katz DF, Hoskins DD, 1983

Movement characteristics of bovine epididymal spermatozoa: effects of forward motility protein and epididymal maturation.

Biol Reprod 29:389-99

Adamis AP, Shima DT, Yeo KT et al., 1993

Synthesis and secretion of vascular permeability factor vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells.

Biochem Biophys Res Commun 193:631-38

Axner E, Holst BS, Linde-Forsberg C, 1998

Morphology of spermatozoa in the cauda epididymidis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat.

Theriogenology 50:973-79

Axner E, Linde-Forsberg C, Einarsson S, 1999

Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididymal duct in the domestic cat.

Theriogenology 52:767-78

Axner E, Pukazhenti BS, Wildt DE, Linde-Forsberg C, Spindler RE, 2002

Creatine phosphokinase in domestic cat epididymal spermatozoa

Mol Reprod Dev 62:265-70

Banai S, Shweiki D, Pinson A, Chandra M, Lazarovici G, Keshet E, 1994

Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis.

Cardiovasc Res 28:1176-79

Bedford JM, 1965

Changes in fine structure of the rabbit sperm head during passage through the epididymis.

J Anat 99:891-906

Bedford JM, 1967

Effects of duct ligation on the fertilizing ability of spermatozoa from different regions of the rabbit epididymis.
J Exp Zool 166:271-81

Bedford JM, 1975

Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis.
aus: Greep RO, Astwood EB: Handbook of physiology,
American Physiological Society, Bethesda:308-18

Bedford JM, Calvin H, Cooper GW, 1973

The maturation of spermatozoa in the human epididymis.
J Fertil, Suppl 18:199-213

Bedford JM, Nicander L, 1971

Ultrastructural changes in the acrosome and sperm membranes during maturation of spermatozoa in the testis and epididymis of the rabbit and monkey.
J Anat 108: 527-43

Benoit MJ, 1926

Recherches anatomiques, cytologiques et histophysiologiques sur les voies excrétrices du testicule, chez les mammifères.
Arch Anat-Histol Embryol 5:173-412

Bentvelsen FM, Brinkmann AO, van der Schoot P et al., 1995

Developmental pattern and regulation by androgen and androgen receptor expression in the urogenital tract of the rat.
Mol Cell Endocrinol 113:245-53

Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR, 1992

Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors.
Mol Biol Cell 3:211-20

Bose AR, Kar AB, Dasgupta PR, 1966

Siliac acid in the genital organs of the male rat.
Curr Sci 35:336-37

Brooks DE, Means AR, Wright EJ, Singh SP, Tiver KK, 1986

Molecular cloning of the cDNA for androgen-dependent sperm-coating glycoproteins secreted by the rat epididymis.
Eur J Biochem 161:13-18

Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF., 1993

Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract.
Cancer Res 53:4727-35

Brown LF, Berse B, Tognazzi K, Manseau EJ, Van de Water L, Senger DR, Dvorak HF, Rosen S, 1992

Vascular permeability factor mRNA and protein expression in human kidney.
Kidney Int 42:1457-61

Brown LF, Harrist TJ, Yeo KT, Stahle-Backdahl M, Jackman RW, Berse B, Tognazzi K, Dvorak HF, Detmar M, 1995a

Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in bullous pemphigoid, dermatitis herpetiformis, and erythema multiforme.
J Invest Dermatol 104:744-49

Brown LF, Yeo KT, Berse B, Morgentaler A, Dvorak HF, Rosen S, 1995b

Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is strongly expressed in the normal male genital tract and is present in substantial quantities in semen.

J Urol 154(2 Pt 1):576-79

Brown PDC, Waites GMH, 1972

Regional blood flow in the epididymis of the rat and rabbit: effect of efferent duct ligation and orchidectomy.

J Reprod Fertil 28:221-33

Buff S, Donze A, Guerin P, Guillaud J, Fontbonne A, Menezo Y, 2001

Taurine and hypotaurine in spermatozoa and epididymal fluid of cats.

J Reprod Fertil Suppl 57:93-95

Burgos MH, Tovar ES, 1974

Sperm motility in the rat epididymis.

Fertil Steril 25(11):985-91

Calvo A, Pastor LM, Horn R, Pallares J, 1995

Histochemical study of glycoconjugates in the epididymis of the hamster (*Mesocricetus auratus*).

Histochem J 27:670-80

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Ebenhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A, 1996

Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele.

Nature 380:435-39

Carr DW, Acott TS, 1984

Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: I. Studies of a sperm motility quiescence factor.

Biol Reprod 30:913-25

Carson-Jurica MA, Schrader WT, O'Malley BW, 1990

Steroid receptor family: Structure and functions.

Endocrine Rev 11:201-20

Casillas ER, Erickson BJ, 1975

Studies on carnitine synthesis in the rat epididymidis.
J Reprod Fert 44:287-91

Chandler JA, Sinowatz F, Pierrepoint CG, 1981

The ultrastructure of dog epididymis.
Urol Res 9:33-44

Cooke PS, Young P, Cunha GR, 1991

Androgen receptor expression in developing male reproductive organs.
Endocrinology 128:2867-73

Cooper D, Schermer A, Sun T-T, 1985

Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratin: strategies, applications and limitations.
Lab Invest 52:243-56

Cooper TG, 1986

The epididymis. Sperm maturation and fertilization.
Springer Verlag

Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson J, Korach KS, 1997

Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor α (ER α) and estrogen receptor β (ER β) messenger ribonucleid acid in wild-type and ER α knock-out mice.
Endocrinology 138:4613-21

Crabo B, Gustafsson B, Nicander L, Rao AR, 1971

Subnormal testicular function in a bull concealed by phagocytosis of abnormal spermatozoa in the efferent ductules.
J Reprod Fert 26:393-96

Detmar M, Brown LF, Claffey KP, Yeo KT, Kocher O, Jackman RW, Berse B, Dvorak HF, 1994

Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis.
J Exp Med 180:1141-46

Dinges HP, Zatloukal K, Schmid C, Mair S, Wirnsberger G, 1991

Co-expression of cytokeratins and vimentin filaments in rete testis and epididymis. An immunohistochemical study.
Virchows Archiv A Pathol Anat 418:119-27

Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM, 1995

Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis.
Am J Pathol 146:1029-39

Edens A, Talamantes F, 1998

Alternative processing of growth hormone receptor transcripts.
Endocr Rev 19:559-82

Elcock LH, Schoning P, 1984

Age-related changes in the cat testis and epididymis.

Am J Vet Res 45:2380-84

Enholm B, Paavonen K, Ristimaki A, et al., 1997

Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia.

Oncogene 14:2475-83

Ergün S, Luttmmer W, Fiedler W, Holstein AF, 1998

Functional expression and localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in the human epididymis.

Biol Reprod 58:160-68

Ergün S, Ungefroren H, Holstein AF, Davidoff MS, 1997

Estrogen and progesterone receptors and estrogen receptor related antigen (ER-D5) in human epididymis.

Mol Reprod Dev 47:448-55

Fava RA, Olsen NJ, Spencer-Green G, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Senger DR, Dvorak HF, Brown LF, 1994

Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue.

J Exp Med 180:341-46

Faye JC, Duguet L, Mazzuga M, Bayard F, 1980

Purification, radio immunoassay and immunohistochemical localization of a glycoprotein produced by the rat epididymis.

Biol Reprod 23:423-32

Ferrara N, Henzel WJ, 1989

Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells.

Biochem Biophys Res Commun 161:851-58

Ferrara N, Houk K, Jakeman L, Leung DW, 1992

Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins

Endocr Rev 13:18-32

Finidori J, Kelly PA, 1995

Cytokine receptor signalling through two novel families of transduce molecules: Janus kinases, and signal transducers and activators for transcription.

J Endocrinol 147:11-23

Finidori J, Postel-Vinay MC, Kleinknecht C, 1980

Lactogenic and somatotropic binding sites in liver membranes of rats with renal insufficiency.

Endocrinology 106:1960-65

Flickinger CJ, 1981

Regional differences in synthesis, intracellular transport, and secretion of protein in the mouse epididymis.

Biol Reprod 25:871-83

Foldesy RG, Bedford JM, 1982

Biology of the scrotum. I. Temperature and androgen as determinants of the sperm storage capacity of the rat cauda epididymidis.

Biol Reprod 26:673-82

Folkman J, Shing Y, 1992

Angiogenesis

J Biol Chem 267:10931-34

Francavilla S, De Martino C, Scorza Barcellona P, Natali PG, 1983

Ultrastructural and immunohistochemical studies of rat epididymidis.

Cell Tissue Res 233:523-37

Gabbiani G, 1992

The biology of the myofibroblast.

Kidney Int 41:530-32

Garner A, 1994

Vascular diseases. Pathobiology of ocular disease.

Dekker, New York

Gasparini G, Toi M, Gion M, Verderio P, Dittadi R, Hanatani M, Matsubara I, Vinante O, Bonoldi E, Boracchi P, Gatti C, Suzuki H, Tominaga T, 1997

Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma.

J Natl Cancer Inst 89:139-47

Gelly JL, Richoux JP, Leheup BP, Grignon G, 1989

Immunolocalization of type IV collagen and laminin during rat gonadal morphogenesis and postnatal development of the testis and epididymis.

Histochemistry 93:31-37

Gerber H-P, Dixit V, Ferrara N, 1998

Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells.

J Biol Chem 273:13313-16

Giangrande PH, Mc Donnell DP, 1999

The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene.

Recent Proc Horm Res 54:291-314

Goldberg MA, Schneider TJ, 1994

Similarities between the oxygen-sensing mechanism regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin.

J Biol Chem 269:4355-61

Greenberg J, 1979

Zur Morphologie der Segmentabschnitte im Nebenhoden.
Verh Anat Ges 73:701-703

Guesdon JL, Ternyck T, Avrameas S, 1979

The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques.
J Histochem Cytochem 27:1131-1139

Haig D, Mc Innes C, Deanes D, et al., 1996

Cytokines and their inhibitors in orf virus infection.
Vet Immunol Immunopathol 54:261-67

Hay MA, Goodrowe KL, 1993

Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymidis and vasa deferentia of the domestic cat.
J Reprod Fertil Suppl 47:297-305

Hemeida, N.A., Sack W.O., Mc Entee K ,1978

Ductuli efferentes in the boar, goat, ram, bull and stallion.
Am J Vet Res 39:1892-1900

Hib J, Ponzio RO, 1977

Effect of efferent duct ligation, gonadectomy and testosterone replacement on epididymal contractility in the rat.
J Reprod Fertil 50:327-29

Hinton BT, Brooks DE, Dott HM, Setchell BP, 1981

Effects of carnitine and some related compounds on the motility of rat spermatozoa from the caput epididymidis.
J Reprod Fertil 61:59-64

Hoffer AP, Hamilton DW, Fawcett DW, 1972

The ultrastructure of the principal cells and the intraepithelial leucocytes in the initial segment of the tail epididymis.
Anat Rec 175:169-202

Hoffer AP, Hamilton DW, 1974

Phagozytosis of sperm by epithelial cells in ductuli efferentes of experimental rats.
Anatomical Record 178:376-77

Holstein AF, 1964

Electron microscopic studies on the epididymidis in rabbits.
Verh Anat Ges 59:53-61

Holstein AF, 1969

Spermatogenesis in *Acanthias vulgaris* Risso, new approach to an old model
Verh Anat Ges 63:213-14

Holtz W, Foote RH, 1972

Sperm production, output and urinary loss in the rabbit.
Proc Soc Exp Biol Med 141:958-62

Houk KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, 1991

The vascular endothelial growth factor family: Identification of a 4th molecular species and characterisation of alternative splicing of RNA.
Mol Endocrinol 5:1806-14

Houk KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N, 1992

Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms.
J Biol Chem 267:26031-37

Hsu SM, Raine L, Fanger H, 1981

Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.
J Histochem Cytochem 29:577-80

Jocelyn HD, Setchell BP, 1972

Regnier de Graaf on the human reproductive organs. An annotated translation of Tractatus de Virorum Organis Generationi Inservientibus (1668) and De Mulierub Organis Generationi Inservientibus Tractatus Novus (1962).
J Reprod Fertil Suppl 17:1-222

Jones R, 1974

Absorption and secretion in the cauda epididymidis of the rabbit and the effects of degenerating spermatozoa on epididymal plasma after castration.
J Endocrinol 63:157-65

Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, Breitman M, Alitalo K, 1995

Expression of fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development.
Proc Natl Acad Sci USA 92:3566-70

Kasper M, Karsten U, 1988

Coexpression of cytokeratin and vimentin in Rathke's cysts of the human pituitary gland.
Cell Tissue Res 253:419-24

Kasper M, Stosiek P, 1989

Immunohistochemical investigation of different cytokeratins and vimentin in the human epididymis from the fetal period up to adulthood.
Cell Tissue Res 257:661-64

Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT, 1989

Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF.
Science 246:1309-12

Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Ederly M, 1991

The prolactin/growth hormone receptor family.
Endocr Rev 12:235-51

Keyt BA, Nguyen HV, Berleau LT, Duarte CM, Park J, Chen H, Ferrara N, 1996

Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis.

J Biol Chem 271:5638-46

Klagsbrun M, D'Amore PA , 1996

Vascular endothelial growth factor and its receptors.

Cytokine Growth Factor Rev 7:259-70

Klinefelter GR, Amann RP, 1980

Metabolism of testosterone by principal and basal cells isolated from the rat caput epididymidis.

Biol Reprod 26:885-901

Koch AE, Harlow LA, Haines GK, Amento EP, Unemori EN, Wong WL, Pope RM, Ferrara N, 1994

Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis.

J Immunol 152:4149-56

Koga L, Kobayashi Y, Yazawa M, Maeda S, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H, 2002

Nucleotide sequence and expression of the feline vascular endothelial growth factor.

J Vet Sci 64:453-56

Korpelainen EI, Karkkainen MJ, Tenhunen A, Lakso M, Rauvala H, Vierula M, Parvinen M, Alitalo K, 1998

Overexpression of VEGF in testis and epididymis causes infertility in transgenic mice: evidence for nonendothelial targets for VEGF.

J Cell Biol 143:1705-12

Lane EB, Alexander CM, 1990

Use of keratin antibodies in tumor diagnosis.

Semin Cancer Biol 1:165-79

Lee VH, Britt JH, Dunbar BS, 1996

Localization of laminin proteins during early follicular development in pig and rabbit ovaries.

J Reprod Fertil 108:115-22

Liebich, H-G, 1990

Männliche Geschlechtsorgane

In: Funktionelle Histologie, Farbatlas und Kurzlehrbuch der mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere

Schattauer-Verlag, Stuttgart- New York

Lindholmer C, 1974

The importance of seminal plasma for human sperm motility.
Biol Reprod 10:533-42

Lobie PE, Breipohl W, Aragon JG, Waters MJ, 1990a

Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the male and female reproductive systems.
Endocrinology 126:2214-21

Lobie PE, Breipohl W, Lincoln DT, Garcia-Aragon J, Waters MJ, 1990b

Localization of the growth hormone receptor/binding protein in skin.
J Endocrinol 126:467-71

Löffler G, Petrides PE, 1997

Biochemie und Pathobiochemie, 5. Auflage
Springer- Verlag, Berlin und Heidelberg

Lymboussaki A, Olofsson B, Eriksson U, Alitalo K, 1999

Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C show overlapping binding sites in embryonic endothelia and distinct sites in differentiated adult endothelia.
Circ Res 85:992-99

Lymboussaki A, Partanen TA, Olofsson B, Thomas-Crusells J, Fletcher CDM, de Waal RMW, Kaipainen A, Alitalo K, 1998

Expression of vascular endothelial growth factor C receptor VEGFR-3 in lymphatic endothelium of the skin and in vascular tumors.
Am J Pathol 153:395-403

Maes M, De Hertogh R, Watrin-Granger P, Ketelslegers JM, 1983

Ontogeny of liver somatotropic and lactogenic binding sites in male and female rats.
Endocrinology 113:1325-32

Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG, 1991

Isolation of a human placenta c-DNA coding for a protein related to the vascular permeability factor.
Proc Natl Acad Sci USA 88:9267-71

Millar RP, 1972

Degradation of spermatozoa in the epididymis of a seasonally breeding mammal, the rock hyrax, *Procavia capensis*.
J Reprod Fertil 30:447-50

Millauer B, Wизigmann Voos S, Schnürch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A, 1993

High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis.
Cell 72:835-46

Morales A, Cavicchia JC, 1991

Release of cytoplasmic apical protrusions from principal cells of the cat epididymis, an electron microscopic study.
Tissue Cell 23:505-13

Nicander L, 1958

Studies on the regional histology and cytochemistry of the ductus epididymidis in stallions, rams and bulls.
Acta morph 1:337-62

Nicander L, 1965

An electron microscopical study of absorbing cells in the posterior caput epididymidis of rabbits.
Zellforsch Mikrosk Anat 66:829-47

Nickel R, Schummer A, Seiferle E, 2004

Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band II, Eingeweide, 9. Auflage,
Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg

Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U, Alitalo K, 1999

Current biology of VEGF-B and VEGF-C.
Curr Opin Biotechnol 10:528-35

Orgebin-Crist MC, 1965

Passage of spermatozoa labelled with thymidine-3-H through the ductus epididymidis of the rabbit.
J Reprod Fertil 10:241-51

Orgebin-Crist MC, 1967

Sperm maturation in rabbit epididymis.
Nature 216:816-18

Orgebin-Crist MC, 1968

Gonadal and epididymal sperm reserves in the rabbit: estimation of the daily sperm production.
J Reprod Fertil 15:15-25

Orgebin-Crist MC, 1998

The epididymis across 24 centuries.
J Reprod Fertil Suppl 53:285-92

Orgebin-Crist MC, Jahad N, 1978

The maturation of rabbit epididymal spermatozoa in organ culture: inhibition by antiandrogens and inhibitors of ribonucleic acid and protein synthesis.
Endocrinology 103:46-53

Palacios J, Regadera J, Paniagua R, Gamallo C, Nistal M, 1993

Immunohistochemistry of the human ductus epididymis.
Anat Rec 235:560-66

Paranko J, Kallajoki M, Pelliniemi LJ, Lehto VP, Virtanen I, 1986

Transient coexpression of cytokeratin and vimentin in differentiating rat Sertoli cells.

Dev Biol 117:35-44

Paris F, Weinbauer GF, Blum V, Nieschlag E, 1994

The effect of androgens on the immunohistochemical localization of the androgen receptor in accessory reproductive organs of the male rat.

J Steroid Biochem Mol Biol 48:129-137

Park JE, Keller G-A, Ferrara N, 1993

The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential disposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of ECM- bound VEGF.

Mol Biol Cell 4:1317-26

Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R, 1992

Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro.

Biochem Biophys Res Commun 189:824-31

Pepper MS, Montesano R, Mandriota SJ, Orci L, Vassalli JD, 1996

Angiogenesis: a paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis.

Enzyme Protein 49:138-62

Phillips HS, Hains J, Leung DW, Ferrara N, 1990

Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum.

Endocrinology 127:965-67

Postel-Vinay MC, Cohen-Tanugi E, Charrier J, 1982

Growth hormone receptors in rat liver membranes: effects of fasting and refeeding, and correlation with plasma somatomedin activity.

Mol Cell Endocrinol 28:657-69

Prem J, 1992

Histologische, ultrastrukturelle und histochemische Untersuchungen an Hoden und Nebenhoden der Katze (*Felis silvestris "familiaris"*).

Diss. Med. Vet., München

Pujol A, Bayard F, 1979

Androgen receptors in the rat epididymis and their hormonal control.

J Reprod Fert 56:217-22

Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT, 1993

Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium.

Proc Natl Acad Sci USA 90:7533-37

Ramaekers F, Feitz W, Moesker O, Schaart G, Herman C, Debruyne F, Vooijs P, 1985

Antibodies to cytokeratin and vimentin in testicular tumour diagnosis.
Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 408:127-42

Ramos AS Jr, Dym M, 1977

Fine structure of the monkey epididymis.
Am J Anat 149:501-31

Reid BL, Cleland KW, 1957

The structure and function of the epididymis, the histology of the rat epididymis.
Aust J Zool 5:223-46

Roberts WG, Palade GE, 1995

Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor.
J Cell Sci 108:2369-79

Romeis B, 1989

Mikroskopische Technik, 17. Auflage,
Urban & Schwarzenberg Verlag, München

Roselli CE, West NB, Brenner RM, 1991

Androgen receptor and 5 alpha-reductase activity in the ductuli efferentes and epididymis of adult rhesus macaques.
Biol Reprod 44:739-45

Roussel JD, Stallcup OT, Austin CR, 1967

Selective phagocytosis of spermatozoa in the epididymis of bulls, rabbits, and monkeys.
Fertil Steril 18:509-16

Rüsse I, 1998

Harn- und Geschlechtsorgane
aus: Rüsse I, Sinowatz F: Lehrbuch der Embryologie der Haustiere, 2. Auflage
Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg

Sanchez B, Flores JM, Pizarro M, Garcia P, 1998

Histological and immunohistochemical study of the cat epididymis.
Anat Histol Embryol 27:135-40

Sar M, Lubahn DB, French FS, Wilson EM, 1990

Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues.
Endocrinology 127:3180-86

Sar M, Wilson EM, 1989

Immunohistochemical localization of androgen receptors in rat brain, pituitary gland and reproductive tissues, mouse testis and human prostate.
Endocrinology 124: 69

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF, 1983
Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid.
Science 219:983-85

Shima DT, Deutsch U, D`Amore PA, 1995
Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability.
FEBS Lett 370:203-08

Shimazaki J, Yamanaka H, Taguchi I, Shida K, 1976
Free amino acids in the caput and the cauda epididymis of adult rats.
Endocrinol Jpn 23:149-56

Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E, 1995
Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implication for tumor angiogenesis.
Proc Natl Acad Sci USA 92:768-72

Silber SJ, 1989
Results of microsurgical vasoepididymostomy: role of epididymis in sperm maturation.
Hum Reprod 4:298-303

Silbernagl S, Despopoulos A, 1991
Taschenatlas der Physiologie, 4. Auflage,
Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York, Deutscher Taschenbuchverlag

Sinowatz F, 1981
Ultrastrukturelle und enzymhistochemische Untersuchungen am Ductus epididymidis des Rindes.
Fortschritte der Veterinärmedizin 32
Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg

Sinowatz F, 1992
Männliche Geschlechtsorgane
aus: Herbert Hees, Fred Sinowatz: Histologie, Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie, 2. Auflage,
Deutscher Ärzteverlag, Köln

Sinowatz F, Bamberg E, Lipp W, Stöckl W, 1975
Verteilung der N-Azetylhexosaminidase im Nebenhoden vom Stier.
Tierärztl Mschr, Wien 62:827-29

Skolek-Winnisch R, Sinowatz F, Lipp W, Spadiut H, 1979
Enzyme histochemical studies on the epithelium of the epididymis of the tomcat.
Anat Anz 145:65-70

Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M, 1998

Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor.
Cell 92:735-45

Stachecki JJ, Ginsburg KA, Armant DR, 1994

Stimulation of cryopreserved epididymal spermatozoa of the domestic cat using the motility stimulants caffeine, pentoxifylline, and 2'-deoxyadenosine.
J Androl 15:157-64

Stacker SA, Achen MG, 1999

The vascular endothelial growth factor family: Signalling for vascular development.
Growth Factors 17:1-11

Stavri GT, Hong Y, Zacchary IC, et al, 1995

Hypoxia and platelet derived growth factor synergistically upregulate the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells.
FEBS Lett 358:311-15

Sundström DE, Stigbrand TI, 1994

Cytokeratins and tissue polypeptide antigen.
Int J Biol Markers 9:102-08

Takeshita S, Pu LQ, Stein LA, Sniderman AD, Bunting S, Ferrara N, Isner JM, Symes JF, 1994

Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia.
Circulation 90(5 Pt 2):11228-34

Tekpetey FR, Amann RP, 1988

Regional and seasonal differences in androgen and estrogen receptors in ram epididymal tissue.
Biol Reprod 38:1051-60

Tekpetey FR, Veeramachaneni DN, Amann RP, 1989

Localization of androgen receptors in ram epididymal principal cells.
J Reprod Fertil 87:311-19

Tischer E, Mitchell R, Hartmann T et al., 1991

The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing.
J Biol Chem 266:11947-54

Toney TW, Danzo BJ, 1988

Developmental changes in and hormonal regulation of estrogen and androgen receptors present in the he rabbit epididymis.
Biol Reprod 39:818-28

Turla MB, Thompson MM, Corjay MH, Qwens GK, 1991

Mechanisms of angiotensin II- and arginine vasopressin-induced increases in protein synthesis and content in cultured rat aortic smooth muscle cells. Evidence for selective increases in smooth muscle isoactin expression. *Circ Res* 68:288-99

Turner TT, Jones CE, Howards SS, Ewing LL, Zegeye B, Gunsalus GL, 1984

On the androgen microenvironment of maturing spermatozoa. *Endocrinology* 115:1925-32

Turner TT, Reich GW, 1985

Cauda epididymal sperm motility: a comparison among five species. *Biol Reprod* 32:120-28

Ungefroren H, Ivell R, Ergün S, 1997

Region-specific expression of the androgen receptor in the human epididymis. *Mol Hum Reprod* 3:933-40

Usselman MC, Cone RA, 1983

Rat sperm are mechanically immobilized in the caudal epididymis by "immobilin," a high molecular weight glycoprotein. *Biol Reprod* 29:1241-53

Vandekerckhove J, Weber K, 1978

At least six different actins are expressed in higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol* 126:738-802

Vandekerckhove J, Weber K, 1981

Actin typing on total cellular extracts: a highly sensitive protein-chemical procedure to distinguish different actins. *Eur Biochem* 113:595-603

Veikkola T, Alitalo K, 1999

VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 9:211-20

Viotto MJ, Orsi AM, Vicentini CA, Camilli JA, 1993

Ultrastructure of the boundary tissue of the extratesticular rete and efferent ductules in the cat (*Felis domestica*, L.). *Rev Bras Biol* 53:555-60

Vu Hai MT, Warembourg M, Milgrom E, 1977

Hormonal control of progesterone receptors. *Ann NY Acad Sci* 286:199-209

Wakui S, Furusato M, Ushigome S, Kano Y, 1994

Coexpression of different cytokeratins, vimentin and desmin in the rete testis and epididymis in the dog. *J Anat* 184:147-51

White JG, 1973

Metabolism of spermatozoa with particular relation to the epididymis.
Aus: Raspe G, Bernhard S. Advances in Biosciences 10,
Pergamon Press, 157-68

Wizigmann-Voos S, Breier G, Risau W, Plate KH, 1995

Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its receptors in von Hippel-Lindau disease-associated and sporadic hemangioblastomas.
Cancer Res 55:1358-64

Woodcock-Mitchell J, Mitchell JJ, Low RB, Kiény M, Sengel P, Rubbia L, Skalli O, Jackson B, Gabbiani G, 1988

Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed in embryonic rat cardiac and skeletal muscles.
Differentiation 39:161-66

Wrobel K-H, 1990

Männliche Geschlechtsorgane
aus: Mosimann W, Kohler T:
Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere.
Parey-Verlag Berlin und Hamburg

Wrobel K-H , Fallenbacher E, 1974

Histologische und histochemische Untersuchungen am Nebenhodenepithel erwachsener Eber.
Zuchthyg 9:20-31

Young WC, 1929

The influence of high temperature on the reproductive capacity of guinea pig spermatozoa as determined by artificial insemination.
Physiol Zool 2:1

Zachmann M, 1992

Interrelation between growth hormone and sex hormones- physiology and therapeutic consequences.
Hormone Res 38:1-8

Zhou Q, Nie R, Prins GS, Saunders PT, Katzenellenbogen BS, Hess RA, 2002

Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract.
J Androl 23:870-81

Zhu LJ, Hardy MP, Inigo IV, Huhtaniemi I, Bardin CW, Moo-Young AJ, 2000

Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative immunohistochemical study.
Biol Reprod 63:368-76

Zunke U, Gossrau R, 1981

Morphology and zonal division of the ductus epididymidis of rats.
Investigation of semithin-sections.
Anat Anz 149:409-24

9. Anhang

Übersicht über die verwendeten Rezepte nach Romeis (1989)

H.E. Färbung (Hämalaun-Eosin)

- | | |
|--|--------|
| 1. Xylol | 10 min |
| 2. Xylol | 10 min |
| 3. Absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest. | |
| 4. Kernfärbung mit Hämalaun | 15 min |
| 5. Abspülen in Aqua dest. | |
| 6. fließend Leitungswasser zum Bläuen | 15 min |
| 7. Eosin | 10 min |
| 8. Abspülen in Aqua dest. | |
| 9. Aufsteigende Alkoholreihe | |
| 10. Xylol | 5 min |
| 11. Xylol | 5 min |
| 12. Eindeckeln mit Eukitt ® | |

Trichromfärbung nach Masson und Goldner

- | | |
|---|---------------|
| 1. Entparaffinieren | |
| 2. Absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest. | |
| 3. Eisenhämatoxylin nach Weigert | 1- 2 min |
| 4. Auswaschen in fließendem Leitungswasser | 10 min |
| 5. Azophloxin | 5min |
| 6. Abspülen in 1% Essigsäure | |
| 7. Differenzieren in Phosphormolybdänsäure-Orange | 15 sec-30 min |
| 8. Kurz abspülen in 1% Essigsäure | |
| 9. Gegenfärbung mit Lichtgrün | 5 min |
| 10. Auswaschen in 1% Essigsäure | |
| 11. 3 x absoluter Alkohol | |
| 12. Xylol, Eukitt ® | |

PAS- Reaktion nach McManus

1. Entparaffinieren bis Aqua dest.
2. Einstellen in 0,5%ige Lösung von Perjodsäure 5 min
3. Spülen in Aqua dest.
4. Fuchsinschweflige Säure (Schiff'sches Reagenz) 30 min
5. Auswaschen in 3 x SO₂ –Wasser 3 x 2 min
6. Auswaschen in fließendem Leitungswasser 15 min
7. Evtl. Kernfärbung mit Hämalan 3-5 min
8. Wässern in H₂O 15 min
9. Alkoholreihe, Xylol, Eukitt ®

PAS- Reaktion nach McManus mit Amylase

1. Entparaffinieren bis Aqua dest.
2. Auf jeden Schnitt 100 µl 0,5%ige Amylase
3. bei 37°C in den Wärmeschrank 10 min
4. Spülen in Wasser
5. weiter bei 2. wie bei PAS- Reaktion nach McManus ohne Amylase

Alcianblau- Färbung (pH 2,5)

1. Entparaffinieren bis Aqua dest.
2. in 3%ige Essigsäure einstellen 3 min
3. in 1% Alcianblau 8GX in 3%iger Essigsäure färben (pH 2,5) 30 min
4. Abspülen in 3% Essigsäure
5. Waschen in Aqua dest.
6. Gegenfärbung mit Kernechtrot 3-5 min
7. Waschen in Aqua dest
8. Entwässern, Xylol, Eukitt ®

Alcianblau- Färbung (pH 1,0)

1. Entparaffinieren bis Aqua dest.
2. in 0,1N HCl einstellen 3 min
3. in 1% Alcianblau 8GX in 0,1N HCl färben (pH 1,0) 30 min
4. Abspülen in 0,1N HCl
5. Waschen in Aqua dest.
6. Gegenfärbung mit Kernechtrot 3-5 min
7. Waschen in Aqua dest
8. Entwässern, Xylol, Eukitt ®

Durchführungsprotokoll Immunhistologie:

1. Entparaffinieren in Xylol und absteigender Alkoholreihe (2 x 30 min. Xylol, 2 x Isopropylalkohol, 90% Ethanol, 70% Ethanol, Aqua dest.)
2. zwei mal für jeweils fünf Minuten in einem auf pH 7,4-7,6 eingestellten PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline) waschen
3. Androgen-, Östrogen- und Progesteron-Rezeptor:
Die Schnitte werden in 10 mM Citratpuffer (hergestellt aus 9 ml 0.1M Zitronensäure + 41 ml 0,1M Natriumcitrat + 450 ml Aqua dest.) überführt. Die Schnitte werden für drei mal zehn Minuten in diesem Puffer bei 750 W in der Mikrowelle aufgekocht und nach 30 min Abkühlzeit wieder zweimal in PBS gewaschen.
4. Vimentin, Laminin und Cytokeratin:
Vimentin: Vorinkubation für 15 min. bei Raumtemperatur mit 0,1%iger Protease
Laminin: Vorinkubation für 30 min. bei Raumtemperatur mit 0,1%iger Protease
Cytokeratin: Vorinkubation für 30 min. mit Trypsin
5. Inkubation der Schnitte in einer 1:3- Lösung aus Hydrogenperoxid und Aqua dest. für zehn Minuten bei Raumtemperatur zur Hemmung der endogenen Peroxidase

6. Zehn Minuten Spülen unter fließendem Leitungswasser
7. Zwei mal für jeweils fünf Minuten in PBS- Puffer waschen
8. Auftragen von Normalserum (Dako Protein Block Serum-Free) 1:10 mit PBS verdünnt bei Raumtemperatur zehn Minuten zur Blockung unspezifischer Bindungsstellen
9. Abgießen des Normalserums und Auftragen des Primärantikörpers
10. Inkubation bei 4°C über Nacht in der Feuchtkammer
11. Zwei mal für jeweils fünf Minuten in PBS- Puffer waschen
12. Inkubation für 60 min. bei Raumtemperatur
13. Zwei mal für jeweils fünf Minuten in PBS- Puffer waschen
14. Inkubation der Schnitte mit dem Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:300 (mit Ausnahme von Laminin > 1:400) für 30 min bei Raumtemperatur
15. Zwei mal für jeweils fünf Minuten in PBS- Puffer waschen
16. Markierung des biotinylierten Sekundärantikörpers mit Streptavidin- Biotin- Meerrettichperoxidase- Komplex (ABC- Komplex, Streptavidin-Biotin Horseradish Peroxidase Complex, Dako), 30 min bei Raumtemperatur
17. Zwei mal für jeweils fünf Minuten in PBS- Puffer waschen
18. Entwicklung in Diaminobenzidin für zehn Minuten bei Raumtemperatur
19. Kurz waschen in Leitungswasser
20. Gegenfärbung der Kerne für 45 sec. in Hämalaun
21. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe, anschließend Xylol
22. Eindecken mit Eukitt ®

Negativkontrollen wurden durchgeführt, indem jeweils bei einem Schnitt der Primärantikörper durch ein Aliquot an Pufferlösung ersetzt wurde.

10. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz für die Überlassung des Themas und die freundliche theoretische und praktische Unterstützung.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts bedanken, im Besonderen bei Christine Neumüller und Margit Vermehren, für die freundliche Hilfe vor allem im praktischen Bereich.

Meinen Mitdoktorandinnen, besonders Yvonne Hirle, danke ich für die Einführung ins Labor und die Literaturrecherche und für alle nützlichen Antworten auf unzählige Fragen.

Martin Mai danke ich für viel Geduld und Hilfe beim Sammeln des Materials.

Bei Alexandra Šoba und meinen Freunden bedanke ich mich für die Motivation, und moralischen Beistand.

Außerdem bedanke ich mich bei meinen Eltern für ihre Unterstützung und die Durchsicht des Manuskripts, sowie bei meinen Großeltern für ihr Interesse und die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Meinem Mann Robert gilt mein Dank für ausdauernde technische und moralische Unterstützung.

11. Lebenslauf

Name: Tina Susanne Ruff, geb. Biermeier

Geburtsdatum: 21. Mai 1976

Geburtsort: München

Wohnort: Erding

Eltern: Manfred Biermeier
Edith Biermeier, geb. Schindele

1982 – 1985 Grundschole Berg am Laim, München

1985 - 1986 Grundschole Kirchheim I, Kirchheim b. München

1986 - 1995 Gymnasium Kirchheim
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1995 – 1996 Freiwilliges soziales Jahr, Die Malteser-
München Stadt

1996 – 2002 Studium Tiermedizin LMU München, 11 FS

Abschluss: Staatsexamen
Approbation erhalten am 25.03.02

Seit März 2002: Tätigkeit als Tierärztin in der Praxisgemeinschaft Dr. Mai/Ruff
in Erding im Bereich Kleintiere

6. Juli 2002: Eheschließung mit Robert Ruff, Tierarzt

2002-2004: Doktorandin am Institut für Tieranatomie II, LMU München