

Aus dem Institut für Tieranatomie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Tieranatomie II
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Dr. habil F. Sinowatz

IMMUNHISTOCHEMISCHE, ULTRASTRUKTURELLE UND
GLYKOHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AM NEBENHODEN
DES HUNDES
(*CANIS FAMILIARIS*)

INAUGURAL-DISSERTATION
Zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität

von Barbara Schick
aus Heilbronn

München 2006

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

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

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. B. Aigner

Tag der Promotion 28. Juli 2006

FÜR MAMA UND PAPA

1	EINLEITUNG	4
2	LITERATURÜBERSICHT	5
2.1	Nebenhoden (Epididymis)	5
2.1.1	Allgemeine Morphologie.....	5
2.1.2	Hodenkanälchen (Ductuli efferentes testis).....	5
2.1.3	Nebenhodenkanal (Ductus epididymidis)	6
2.1.4	Epididymale Spermienreifung.....	8
2.2	Morphologie der Spermien.....	9
2.3	Lektin histochemie	12
2.3.1	Definition.....	12
2.3.2	Molekulare Struktur	12
2.3.3	Zuckerbindungseigenschaften	13
2.3.4	Anwendung von Lektinen	16
2.3.5	Lektinbindungsstellen im Hoden und Nebenhoden.....	16
3	MATERIAL UND METHODEN	18
3.1	Untersuchungsmaterial.....	18
3.2	Probenentnahme und Fixierung	20
3.2.1	Probenentnahme	20
3.2.2	Fixierung für lichtmikroskopische Untersuchungen	20
3.2.3	Fixierung für elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	21
3.3	Konventionelle lichtmikroskopische Färbungen	21
3.3.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)	21
3.3.2	Trichromfärbung nach Masson-Goldner	22
3.3.3	Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach Mc Manus (PAS-Reaktion) mit und ohne Amylaseverdau	22
3.3.4	Alcianblau-Färbung.....	22
3.4	Immunhistochemische Färbungen.....	23
3.5	Glykohistochemische Färbungen	27
3.6	Transmissionselektronenmikroskopie	29

3.7	Auswertung morphometrischer Daten	29
4	ERGEBNISSE.....	30
4.1	Lichtmikroskopische Untersuchungen am Nebenhoden des Hundes.....	30
4.1.1	Ductuli efferentes testis	30
4.1.2	Ductus epididymidis.....	33
4.1.2.1	Initialsegment	33
4.1.2.2	Mittelsegment	35
4.1.2.3	Terminalsegment	37
4.1.3	Morphometrische Untersuchungen	40
4.2	Immunhistochemische Untersuchungen am Nebenhoden des Hundes	42
4.2.1	Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin.....	42
4.2.2	Immunhistochemischer Nachweis von Laminin	45
4.2.3	Immunhistochemischer Nachweis des Östrogen-Rezeptors α (ER α).....	48
4.2.4	Immunhistochemischer Nachweis des Progesteron-Rezeptors	50
4.2.5	Immunhistochemischer Nachweis von „ α -smooth-muscle-actin“ (α -sma).....	50
4.2.6	Immunhistochemischer Nachweis von Pancytokeratin.....	53
4.2.7	Immunhistochemischer Nachweis von Chromogranin A.....	56
4.2.8	Immunhistochemischer Nachweis des Androgen-Rezeptors	59
4.3	Glykohistochemische Untersuchungen am Nebenhoden des Hundes.....	63
4.3.1	Bindungsstellen für <i>Canavalia ensiformis</i> Agglutinin (Con A).....	63
4.3.2	Bindungsstellen für <i>Pisum sativum</i> Agglutinin (PSA).....	63
4.3.3	Bindungsstellen für <i>Ulex europaeus</i> Agglutinin (UEA)	63
4.3.4	Bindungsstellen für <i>Triticum vulgare</i> Agglutinin (WGA)	63
4.3.5	Bindungsstellen für <i>Triticum vulgare</i> Agglutinin (succinyliert) (WGAs)	64
4.3.6	Bindungsstellen für <i>Lens culinaris</i> Agglutinin (LCA).....	64
4.3.7	Bindungsstellen für <i>Phaseolus vulgaris E</i> Agglutinin (PHA E)	64
4.3.8	Bindungsstellen für <i>Phaseolus vulgaris L</i> Agglutinin (PHA L).....	65
4.3.9	Bindungsstellen für <i>Dolichos biflorus</i> Agglutinin (DBA)	65
4.3.10	Bindungsstellen für <i>Griffonia simplicifolia I</i> Agglutinin (GSL I).....	65
4.3.11	Bindungsstellen für <i>Ricinus communis</i> Agglutinin (RCA)	65
4.3.12	Bindungsstellen für <i>Glycine max</i> Agglutinin (SBA).....	66
4.3.13	Bindungsstellen für <i>Saphora japonica</i> Agglutinin (SJA).....	66
4.3.14	Bindungsstellen für <i>Arachis hypogaea</i> Agglutinin (PNA).....	66

4.4	Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Nebenhoden des Hundes.....	73
4.4.1	Ultrastruktur der Ductuli efferentes testis	73
4.4.2	Ultrastruktur des Initialsegmentes	79
4.4.3	Ultrastruktur des Mittelsegmentes.....	86
4.4.4	Ultrastruktur des Terminalsegmentes.....	97
5	DISKUSSION	107
6	ZUSAMMENFASSUNG	122
7	SUMMARY	123
8	VERZEICHNISSE	124
8.1	Literaturverzeichnis	124
8.2	Abkürzungsverzeichnis.....	137
8.3	Verzeichnis der Tabellen	140
8.4	Verzeichnis der Bilder.....	140
9	METHODIK	143
10	LEBENS LAUF	148
11	DANKSAGUNG	149

1 Einleitung

Die in den letzten Jahren stetig steigende Zahl von Untersuchungen am Nebenhoden verschiedener Spezies ist auf die große Bedeutung des Nebenhodens für die posttestikuläre Spermienreifung zurückzuführen. Hodenspermien fehlt nämlich noch die Fähigkeit zur gerichteten Vorwärtsbewegung und sie sind nicht befruchtungsfähig. Der Nebenhoden ist für den Transport, die Reifung und die Speicherung der Spermien verantwortlich. Während der Passage erfahren die noch unreifen Spermien zahlreiche biochemische, physiologische und morphologische Veränderungen, durch die sie ihre volle Befruchtungsfähigkeit erlangen (Bamberg, 1975).

Speziell am Nebenhoden des Hundes wurden schon früh verschiedene Untersuchungen zur Ultrastruktur (Chandler et al., 1981), zur Histologie (Orsi, 1983), zum Transport und der Speicherung von Spermien (Sinowatz et al., 1977), zur Lokalisation von Glykosidasen (Sinowatz et al., 1979), zur Koexpression verschiedener Cytokeratine (Wakui et al., 1994) und zur Lokalisation von Lektinbindungsstellen (Wakui, 1996) durchgeführt. Der genaue Mechanismus der epididymalen Spermienreifung ist jedoch trotz allem noch nicht zufrieden stellend geklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Morphologie des Nebenhodens des Hundes mit lichtmikroskopischen, ultrastrukturellen, immun- und glykohistochemischen Methoden untersucht, um weitere Aufschlüsse zur funktionellen Morphologie dieses Organes zu erhalten.

2 Literaturübersicht

2.1 Nebenhoden (Epididymis)

2.1.1 Allgemeine Morphologie

Der hantelförmige Nebenhoden liegt in charakteristischer Weise dem Hoden in Längsrichtung dicht an und ist an dessen Margo epididymalis mit ihm verwachsen beziehungsweise durch ein Gekröse (Mesepididymis) eng verbunden (Nickel et al., 1999).

Der Nebenhoden kann makroskopisch in den kranial liegenden Nebenhodenkopf (Caput epididymidis), den schlanken Nebenhodenkörper (Corpus epididymidis) und den kugeligen Nebenhodenschwanz (Cauda epididymidis) unterteilt werden (Chandler et al., 1981; Wrobel, 1990; Nickel et al., 1999). Der Nebenhodenschwanz entlässt den Samenleiter (Ductus deferens), der in das Beckenstück der Harnröhre mündet (Liebig, 2004).

Der Nebenhoden ist als multifunktionelles Organ für den Transport und die Speicherung der Spermien verantwortlich (Bamberg, 1975; Sinowatz et al., 1985). Außerdem erfahren die Samenzellen während der Passage zahlreiche biochemische, physiologische und morphologische Veränderungen, durch die sie erst ihre volle Befruchtungsfähigkeit erlangen (Epididymale Spermienreifung) (Busch et al., 2001). Sekretion und Resorption des Nebenhodenepithels sind androgenabhängig. Androgene erreichen ihre Wirkungsstätte über das Blut, die Lymphe und Rete testis-Flüssigkeit. Dabei sind sie an ein Androgen bindendes Protein gebunden.

Die Überleitung vom Hoden in den Nebenhoden erfolgt durch eine unterschiedliche Anzahl von in Schlingen liegenden Kanälchen, den Ductuli efferentes testis, die aus dem Rete testis hervorgehen (Nickel et al., 1999). Diese durchbrechen am Kopfende des Hodens die Tunica albuginea und gehen in den Nebenhodenkopf über. Sie vereinigen sich zum tierartig unterschiedlich langen Nebenhodenkanal, Ductus epididymidis (beim Rüden fünf bis acht Meter lang), der dann in den Samenleiter übergeht. Der Spermientransport vom Hoden in den Ductus epididymidis vollzieht sich auf der Grundlage des Flüssigkeitsstroms. Die freigesetzten, aber noch unbeweglichen Spermien werden über die Zilien der Ductuli efferentes in den Nebenhodengang transportiert.

2.1.2 Hodenkanälchen (Ductuli efferentes testis)

Bei den Ductuli efferentes handelt es sich um umgebildete Urnierenkanälchen, die aus dem Rete testis hervorgehen und am Kopfende des Hodens die Tunica albuginea durchbrechen (Nickel et al., 1999). 15 - 16 enge Kanälchen verbinden so beim Hund das Rete testis mit dem Anfangsabschnitt des Ductus epididymidis (Nickel et al., 1999; Liebig, 2004). Sie legen sich im Nebenhodenkopf geschlängelt zu durch Bindegewebe zusammengehaltene,

kegelförmige Läppchen (Lobuli epididymidis) zusammen. Finden Ductuli efferentes keinen Anschluss an den Nebenhodengang, spricht man von blind endenden Ductuli aberrantes. Der Durchmesser der Ductuli efferentes beträgt etwa 100 - 200 μm und sie sind ungefähr 12 - 20 cm lang (Busch et al., 2001), ihr Lumen ist rund oder leicht gebuchtet (Wrobel, 1990). Die Kanälchen werden von einem unterschiedlich hohen, mehrreihigen Epithel ausgekleidet. Es besteht aus resorptiv tätigen Hauptzellen mit einem apikalen dichten Mikrovillibesatz und Gruppen von Flimmerzellen, außerdem Lymphozyten und Makrophagen. Der Zilienschlag der Hauptzellen unterstützt den Transport von Spermien und Samenflüssigkeit zum Nebenhodengang. Dieser Vorgang wird außerdem von dünnen, zirkulären Schichten modifizierter glatter Muskelzellen (Stratum fibromusculare) gefördert, die die Ductuli efferentes umgeben und sich an die kräftige Basallamina des Epithels nach außen hin anschließen (Chandler et al., 1981).

Die Aufgaben der Ductuli efferentes sind vielfältig. Außer dem Transport der Spermien gehört die Rückresorption testikulär gebildeter Flüssigkeit und die Sezernierung spermiennährender Stoffe zu ihren Hauptfunktionen. Zudem werden vom Epithel durch Phagozytose Spermien aus dem Lumen aufgenommen (Spermiophagie) (Chandler et al., 1981; Rován, 2001).

2.1.3 Nebenhodenkanal (Ductus epididymidis)

Die Ductuli efferentes öffnen sich in den stark gewundenen Nebenhodenkanal. Die engen, durch Bindegewebe zusammen gehaltenen Schlingen des Ductus epididymidis bilden die Grundlage des distalen Nebenhodenkopfes, Nebenhodenkörpers und des Nebenhodenschwanzes. Die Länge des Ductus epididymidis ist tierartlich unterschiedlich und beträgt nach Nickel et al. (1999) beim Hund fünf bis acht Meter.

Die Epithelhöhe nimmt am Übergang der Ductuli efferentes zum Nebenhodenkopf nach Chandler et al. (1981) stark zu. Der Nebenhodengang ist durchgehend mit einem zweireihigen, hochprismatischen Epithel ausgekleidet. Es besteht aus kleinen, polygonalen Basalzellen und hochprismatischen Hauptzellen. Die Hauptzellen tragen schlanke, längliche Mikrovilli (Stereozilien), die zu Büscheln verklebt sind (Nickel et al., 1999). Sie dienen vor allem der Resorption von Samenflüssigkeit und zum Teil auch der Sekretion von Enzymen und Glykoproteinen. Das gut entwickelte raue endoplasmatische Retikulum und der über dem Zellkern angeordnete Golgi-Apparat deuten auf die Sekretionsfunktion der Hauptzellen hin. Die kleinen, rundlichen oder kegelförmigen Basalzellen liegen an der Epithelbasis und dienen dem Stoffaustausch. Neben diesen beiden Zellarten treten im Nebenhodenkanal vom Hund noch Lymphozyten auf (Orsi, 1983). Die Epithelhöhe nimmt nach distal in Richtung Nebenhodenschwanz kontinuierlich ab. Das Epithel des Ductus epididymidis wird von einer

dünnen, kapillarreichen, lockeren Bindegewebsschicht umgeben. Die spiralg angeordnete Muskelschicht, die der Bindegewebsschicht nach außen hin folgt, lässt hingegen vom Nebenhodenkopf zum Nebenhodenschwanz hin eine deutliche Stärkenzunahme erkennen. Sie spielt eine entscheidende Rolle für den Transport der zunächst noch unbeweglichen Spermien. Spontane peristaltische Kontraktionen sorgen für einen langsamen, aber gleichmäßigen Weitertransport. Auch der Gangdurchmesser nimmt nach distal kontinuierlich zu (Chandler et al., 1981).

Der Nebenhodengang erfüllt also mehrere Funktionen:

- Reifung und Vorratshaltung von Samenzellen.
- Weitergabe von Samenzellen in den Ductus deferens.
- Resorption testikulärer Flüssigkeit.
- Sekretion metabolisch aktiver Substanzen.

Die epididymale Spermienreifung vollzieht sich wahrscheinlich vor allem in den Anfangsabschnitten, im Caput und im Corpus epididymidis. Die bis zu 2 mm dicken Windungen des Ductus epididymis in der Cauda epididymidis dienen hingegen als Spermienpeicher. Hier können die Spermien dicht gepackt wochenlang überleben.

Makroskopisch wird der Nebenhodengang also in die drei Abschnitte Caput, Corpus und Cauda epididymidis unterteilt. Da diese Unterteilung jedoch nur unzureichend die strukturellen und funktionellen Besonderheiten des Nebenhodenganges berücksichtigt, wird er bei den verschiedenen Tierarten nach histologischen, histochemischen und ultrastrukturellen Gesichtspunkten in eine unterschiedliche Anzahl von Segmenten unterteilt. Dieser Einteilung liegen Kriterien wie die Epithelhöhe, die Höhe der Stereozilien und sekretorische Aktivität zu Grunde (Chandler et al., 1981; Schimming et al., 2001). Das histologische Bild eines Segmentes wird wesentlich durch die Ausstattung mit folgenden Zellen bestimmt: Basalzellen, hochprismatische Hauptzellen, Apikalzellen, Lymphozyten und Makrophagen. Die Anzahl und Gliederung der einzelnen Segmente ist tierartlich unterschiedlich und charakteristisch. Im Folgenden werden einige Beispiele genannt:

- Bei Katzen wird der Nebenhodengang nach Sanchez et al. (1998) in vier getrennte Regionen unterteilt. Diese Einteilung basiert auf der Morphologie und den Zellen des Epithels, der Lumenform und -größe.
- Nicander (1958) legt für Pferd, Schaf und Rind eine Einteilung in sechs Segmente zu Grunde. Größe, Position und Form des Zellkerns und die Epithelhöhe dienen als Beurteilungsgrundlage.

- Beim Kaninchen wird der Ductus epididymidis in acht Segmente untergliedert (Nicander, 1957). Morphologische, histologische und zytochemische Unterschiede des Epithels und der Lumendurchmesser wurden dabei herangezogen.

Glover et al. (1971) schlugen auf der Basis histologischer und zytologischer Merkmale eine Einteilung in drei Segmente vor: ein initiales Segment, ein mittleres und ein terminales Segment. Beim Hund bilden die Ductuli efferentes und das Anfangssegment den Hauptteil des Caput epididymidis. Das mittlere Segment umfasst den distalen Caputbereich und das gesamte Corpus epididymidis und das Endsegment entspricht der Cauda epididymidis. Chandler et al. (1981) und Orsi (1983) unterstützen diese vorgeschlagene Unterteilung in drei Segmente. Rován (2001) gibt für den Hund eine Einteilung in sechs Segmente an. Schimming et al. (1997) hingegen unterteilt den Nebenhoden des Hundes in fünf histologisch getrennte Zonen: Zone I und II sind im Caput epididymidis lokalisiert, Zone III umfasst den distalen Caputanteil und den Nebenhodenkörper und Zone IV und V stellen den proximalen und distalen Anteil des Nebenhodenschwanzes dar.

2.1.4 Epididymale Spermienreifung

Während der Passage durch den Nebenhoden erfahren die Spermien verschiedene biochemische, physiologische und morphologische Veränderungen. Im Zuge dieses, als epididymale Spermienreifung bezeichneten Vorganges erlangen die Samenzellen ihre volle Befruchtungsfähigkeit (Bedford, 1973; Sinowatz et al., 1985).

Folgende Vorgänge werden mit dem Reifungsprozess der Spermien im Nebenhoden in Verbindung gebracht:

- Kaudale Verlagerung und Ablösen des zytoplasmatischen Tröpfchens vom Mittelstück der Spermien (Bedford, 1975) und Veränderung der Kernchromatinstruktur.
- Veränderung von Größe, Form und Inhalt des Akrosoms. Bei den Haussäugetieren konnte nach Rüsse und Sinowatz (1998) jedoch keine wesentliche Veränderung am Akrosom während der Nebenhodenpassage beobachtet werden.
- Motilitätsänderungen. Im Anfangsabschnitt des Nebenhodens sind die Samenzellen noch weitgehend unbeweglich bzw. zeigen lediglich eine unkoordinierte Bewegung. In der Cauda epididymis hingegen zeigen die Spermien bereits eine gerichtete Vorwärtsbewegung.
- Modifikationen an der Plasmamembran. Dies zeigt sich in der Lipidzusammensetzung

und in der Zuckerszusammensetzung der Glykoproteine der Plasmamembran. Es kommt zum Austausch von Proteinen mit der Nebenhodenflüssigkeit und Antigene ändern ihre Position in der Zellmembran (Cooper, 1998).

- Umstellung im Spermienstoffwechsel (Bamberg, 1975; Rüsse und Sinowatz, 1998; Rován, 2001).

Die Nebenhodenflüssigkeit ändert sich in den verschiedenen Abschnitten des Nebenhodens. Die Flüssigkeitsmenge und der Gehalt an organischen und anorganischen Bestandteilen variieren in Abhängigkeit von der selektiven Rückresorption im Caput epididymis und der Sekretion verschiedener Substanzen. Die Nebenhodenflüssigkeit ist von entscheidender Bedeutung für die Reifung der Spermien, da diese selbst keine Fähigkeit zur Biosynthese von Proteinen oder Lipiden besitzen. Das Epithel des Nebenhodens liefert die notwendigen Biokatalysatoren und Ionen (Amann et al., 1993).

Das Bewegungsmuster von Spermien verändert sich während ihrer Passage durch den Nebenhodengang. Anfänglich zeigen sie nur unkoordinierte Bewegungen, anschließend schwimmen sie kreisförmig. Im Mittel- und Terminalsegment sind sie zu gerichteter Fortwärtsbewegung fähig (Gaddum, 1968). Dies ist abhängig von einer Zunahme an intrazellulärem zyklischen AMP und dem Vorhandensein vom „forward motility protein“ (FMP). Hierbei handelt es sich um ein hitzestabiles Glykoprotein, das während der Nebenhodenpassage an die Spermien bindet und in hohen Konzentrationen im Seminalplasma vorkommt.

Diese funktionellen Veränderungen im Nebenhoden werden von strukturellen Änderungen auf der Oberfläche der Spermien begleitet. Oberflächenstrukturen gehen verloren oder werden modifiziert. Neue Spermienoberflächenantigene kommen hinzu. Dies geschieht durch Wechselwirkungen mit Bestandteilen der Seminalflüssigkeit und Wechselwirkung mit dem Nebenhodenepithel (Jones, 1989).

2.2 Morphologie der Spermien

Spermien entstehen im Rahmen der Spermatogenese in den Samenkanälchen des Hodens. Die Hauptfunktionen sind die Lieferung eines haploiden Chromosomensatzes zur Oozyte und die Aktivierung der Oozytenentwicklung (Sinowatz et al., 1989).

Die Morphologie des Hundespermiums entspricht im Wesentlichen der anderer Haussäugetiere. Das Spermium lässt sich in einen Spermienkopf und einen Spermienchwanz untergliedern. Der Schwanz (Flagellum) wiederum ist unterteilt in ein kurzes Halsstück, ein Mittelstück, ein Haupt- und ein Endstück (Phillips, 1975; Wrobel, 1990; Sinowatz et al., 1989; Rüsse und Sinowatz, 1998).

Sinowatz et al. (1992) unterteilen die Spermien in einen Kopf, einen kurzen Halsabschnitt, ein Mittel-, Haupt- und Endstück, wohingegen Fawcett (1975) die Unterteilung in fünf Abschnitte zu Grunde legt: in ein akrosomales Segment, ein äquatoriales Segment, ein postakrosomales Segment, ein Mittelstück und ein Hauptstück. Dabei ist der Spermienkopf in drei Abschnitte unterteilt.

Alle Abschnitte des Spermiums werden von einer Plasmamembran umhüllt, die in den einzelnen Abschnitten unterschiedliche Glykoprotein- und Lipidzusammensetzungen aufweist.

Der in der Aufsicht ovale bis birnenförmige Spermienkopf besteht aus dem auffallend stark kondensierten, haploiden Zellkern und wird zu zwei Dritteln kappenartig vom Akrosom bedeckt (Rüsse und Sinowatz, 1998). Das Akrosom entsteht aus Vesikeln des Golgi-Apparates und wird als modifiziertes Lysosom angesehen (Phillips, 1975). Es enthält verschiedene Enzyme, vor allem Akrosin und Hyaluronidase, welche bei Kontakt mit der Eizelle aktiviert und freigesetzt werden und so die Penetration der Zona pellucida und Fusion des Spermiums mit der Eizelle ermöglichen (Wrobel, 1990; Sinowatz et al., 1989).

Der Spermienhals wirkt als gelenkige Verbindung zwischen Spermienkopf und Mittelstück. Er ist relativ kurz und zwischen der Basis des Kopfes und den distalen Spermienanteilen leicht eingengt. Rüsse und Sinowatz (1998) beschreiben einen im Halsteil gelegenen, glykoproteinreichen Streifenkörper als gelenkige Verbindung zum Mittelstück. Dieser schließt sich an den Spermienkopf an und enthält das proximale Zentriol, welches bei der Teilung der Zygoten nach erfolgter Befruchtung eine Rolle spielt (da die Eizelle kein eigenes Zentriol enthält), sowie den Rest des distalen Zentriols (Kolb, 1991). Dieses ist am reifen Spermium nicht mehr erkennbar (Rüsse und Sinowatz, 1998).

Der Achsenfaden (Axonema) geht aus dem distalen Zentromer des Halsteiles hervor. Er durchzieht den Spermischwanz vollständig und bildet den eigentlichen „Bewegungsapparat“ des Spermiums. Er besteht aus zwei einzelnen zentralen und neun peripheren Paaren von Mikrotubuli, die durch verschiedene Proteine miteinander verbunden sind. Um die Doppeltubuli sind außen neun dichte Längsfasern (Mantelfasern) angeordnet, die sich fast bis zum Ende des Spermischwanzes ziehen (Rüsse und Sinowatz, 1998).

Das Mittelstück des Spermiums beinhaltet zentral das Axonema mit seiner typischen $9 \times 2 + 2$ Struktur. Um die Mantelfasern sind spiralförmig die Mitochondrien der Zelle angeordnet. Diese sind für die Energiegewinnung erforderlich, die vor allem für die Beweglichkeit des Spermiums notwendig ist. Das Mittelstück endet mit einer Plasmamembranverdickung, dem Anulus. Dieser Schlussring verhindert eine Verlagerung der Mitochondrien nach distal. Zudem markiert er den Übergang zum Hauptstück.

Das sich anschließende Hauptstück stellt den längsten Abschnitt des Spermischwanzes

dar. Es ist von einer unter der Plasmamembran liegenden Ringfaserscheide (Vagina fibrosa) umhüllt. Die geordnete Struktur löst sich zum Ende des Hauptstücks nach und nach auf. Die zum Endstück hin auslaufende Faserscheide stellt eine dem Säugerspermium eigene Komponente dar.

Das verhältnismäßig kurze und dünne Endstück ist lediglich von der Zellmembran umlagert, es gibt keine Außenfibrillen und keine Faserscheide mehr. Am Schwanzende spaltet sich das Axonema in einzelne Mikrotubuli auf, die frei unter dem Plasmalemm liegend enden (Fawcett, 1975).

Spermienmembranen:

Alle Abschnitte des Spermiums werden außen von einer Zellmembran (Plasmamembran) überzogen (Wrobel, 1990; Rüsse und Sinowatz, 1998; Busch et al., 2001), die eine essentielle Abtrennung zwischen dem intrazellulären Raum und der externen Umgebung bewirkt (Holt, 1984). Die Membran stammt ursprünglich von den rundkernigen Spermatiden des Hodens, sie wird jedoch während der Spermio-genese, dem Transport durch den Nebenhoden und schließlich während der Kapazitation erheblich verändert (Jones, 1998). Die Zellmembran ist charakterisiert durch eine regional unterschiedliche Glykoprotein- und Lipidzusammensetzung einzelner, eng benachbarter Membranabschnitte („surface domains“). Dies führt zu einer unterschiedlich funktionellen Wertigkeit der einzelnen Membranareale. Die Spermienmembran lässt sich also in mehrere, topographisch genau abgrenzbare Domänen einteilen. Auch das unter der Membran liegende Zytoskelett der Spermien ist am Zustandekommen der Domänenstruktur beteiligt. Der Anteil an ungesättigten Fettsäuren in den Phospholipiden der Spermienmembran ist außergewöhnlich hoch. Dadurch wird die Membran für oxidative Angriffe besonders empfindlich (Rovan, 2001). Die Spermienplasmamembran besitzt eine hochdifferenzierte Struktur. Sie besteht aus einer dreilagigen Schicht von Lipidmolekülen, in welche verschiedene Membranproteine eingelagert sind (Fawcett, 1975; Guraya, 1987; Sinowatz et al., 1989). Hierbei können Membranproteine von solchen Proteinen unterschieden werden, die von den Epithelien der akzessorischen Drüsen sezerniert und assoziiert werden. Hier spielen Spermadhäsine eine besondere Rolle (Töpfer-Petersen et al., 1995a). Sie sind möglicherweise als Rezeptorproteine der Spermienmembran besonders wichtig für die Zonabindung. Die Plasmamembran garantiert ein intaktes inneres Zellmilieu, steuert Transportmechanismen und vermittelt Signale, die das Verhalten der Zelle regeln. Sie spielt eine wichtige Rolle beim Erkennen und Verschmelzen des Spermiums mit der Oozyte.

Das Akrosom ist zudem von einer eigenen Akrosomenmembran umgeben. Sie schließt die mehr oder weniger homogene Akrosomenmatrix ein und kann in eine äußere und eine innere akrosomale Membran unterteilt werden (Guraya, 1987). Die äußere

Akrosomenmembran liegt direkt unter der Plasmamembran und geht am Rande der Akrosomenkappe in die innere Akrosomenmembran über, die dem Zellkern anliegt.

Während der Akrosomenreaktion verschmilzt der vordere Anteil der Plasmamembran mit der äußeren Akrosomenmembran, wobei hydrolytische Enzyme des Akrosoms freigesetzt werden.

2.3 Lektin histochemie

2.3.1 Definition

Ursprünglich wurde der Begriff Lektin von Boyd und Shapleigh (1954) eingeführt. Er wird vom lateinischen „legere“ abgeleitet, was „auswählen“ bedeutet und sich auf die Fähigkeit der Lektine, verschiedene Blutgruppenantigene zu unterscheiden (auszuwählen), bezieht. Mit der Entdeckung von kohlenhydratbindenden Proteinen in verschiedenen biologischen Quellen (Bakterien, Pilzen) wurde der Begriff Lektin ausgedehnt, um zuckerbindende Proteine unterschiedlichsten Ursprungs einzubeziehen. Nach der gebräuchlichsten Definition sind Lektine zuckerbindende Proteine nicht immunogenen Ursprungs, die in pflanzlichen und in tierischen Geweben vorkommen. Sie weisen keine enzymatische Aktivität auf und besitzen mindestens zwei Bindungsstellen für Kohlenhydrateinheiten (Gabiuss et al., 1988; Stryer, 1996). Lektine besitzen die Fähigkeit, spezifisch mit membranständigen und gelösten Kohlenhydratstrukturen zu reagieren und sind dadurch in der Lage, Glykostrukturen, wie sie zum Beispiel in Glykoproteinen und Glykolipiden der Zellmembran vorkommen, zu lokalisieren und zu identifizieren (Goldstein et al., 1978). Aufgrund dieser außergewöhnlichen Eigenschaft werden Lektine als histochemische Reagenten eingesetzt, um die Verteilung von Glykokonjugaten verschiedener Zellen und Gewebe zu bestimmen. Damit sind sie für die Histochemie von großer Bedeutung (Arya and Vanha-Perttula, 1984, 1985, 1986; Ertl und Wrobel, 1992).

2.3.2 Molekulare Struktur

Lektine sind Glykoproteine, die aus einer individuellen Sequenz von Aminosäuren zusammengesetzt sind. Sie bestehen aus zwei bis acht Untereinheiten und haben Molmassen zwischen 8.500 und 300.000 (Pühler et al., 2000). Eine Untereinheit besitzt in der Regel nur eine Zuckerbindungsstelle. Durch unterschiedliche Molekulargewichte, Struktur und Anzahl der Untereinheiten und Anzahl der kohlenhydratbindenden Domänen pro Molekül können mehrere Lektintypen unterschieden werden (Goldstein und Hayes, 1978). Die Bindung von Lektinen an die korrespondierenden Zucker ist verhältnismäßig schwach. Sharon (1977) vergleicht die Reaktion eines Lektins und eines Polysaccharids

oder Glykoproteins mit einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Alle Lektinmoleküle tragen charakteristischerweise mindestens zwei Zuckerbindungsstellen. Diese Eigenschaft ist essentiell für eine Agglutination von Zellen. Anhand dieser Eigenschaft kann man auch Lektine von anderen Typen zuckerbindender Proteine unterscheiden („lectine-like-molecules“). Die meisten dieser Moleküle tragen nur eine kohlenhydratbindende Seite und besitzen keine Fähigkeit zur Agglutination (Goldstein et al., 1978). Fast alle Lektine gehören zu den Metalloproteinen, die Ca^{2+} und Mn^{2+} binden können. Entfernt man die Calcium- oder Manganionen, resultiert dies in einem Verlust der kohlenhydratbindenden Aktivität.

2.3.3 Zuckerbindungseigenschaften

Die meisten pflanzlichen und tierischen Lektine können aufgrund ihrer Zuckerspezifität in mehrere Gruppen eingeteilt werden.

Tab. 1 Einteilung der Lektine nach ihrer Zuckerbindungsspezifität
(Goldstein und Poretz, 1986)

Zuckerspezifität	Ursprung	Abkürzung
I. D-Mannose/D-Glukose-bindende Lektine	<i>Canavalia ensiformis</i> <i>Lens culinaris</i> <i>Pisum sativum</i>	Con A LCA PSA
II. D-Galaktose-bindende Lektine	<i>Arachis hypogaea</i> <i>Griffonia simplicifolia I</i> <i>Ricinus communis</i> <i>Erythrina cristagalli</i>	PNA GSA I RCA I und RCA II ECA
III. N-Azetyl-D-Galaktosamin-(GalNAc)-bindende Lektine	<i>Phaseolus limensis</i> <i>Glycine max</i> <i>Helix pomatia</i> <i>Bauhinia purpurea</i> <i>Maclura pomifera</i> <i>Visea villosa</i> <i>Dolichos biflorus</i>	LBA SBA HPA BPA MPA VVA DBA
IV. N-Azetyl-D-Glukosamin-(GlcNAc)-bindende Lektine	<i>Triticum vulgare</i> <i>Ulex europaeus II</i> <i>Griffonia simplicifolia II</i> <i>Laburnum alpinum</i> <i>Solanum tuberosum</i>	WGA UEA II GSA II LAA STA
V. L-Fukose-bindende Lektine	<i>Ulex europaeus I</i> <i>Lotus tetragonolobus</i>	UEA I LTA
VI. Sialinsäure-bindende Lektine	<i>Limulus polyphemus</i> <i>Limax flavus</i>	LPA LFA
VII. Lektine mit komplexen Kohlenhydratbindungsstellen	<i>Phaseolus vulgaris</i>	PHA E und PHA L

Die Spezifität der Kohlenhydratbindung erklärt sich durch die Ausbildung zahlreicher Wasserstoffbrücken mit Oligosacchariden an entscheidenden Stellen der Kohlenhydrat-Erkennungsregion (Nelson et al., 2001). Auch die Beteiligung von Waals Kräften und apolaren Wechselwirkungen wird diskutiert. Die überwiegende Zahl der Lektine bindet an die D-Pyranose-Form der Zucker, einige erkennen die L-Form des Zuckers. Das Zuckerbindungsverhalten der Lektine bei histochemischen Reaktionen wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, die Montkowski (1992) in innere und äußere Faktoren unterteilt. Die inneren Faktoren beinhalten die Abhängigkeit des Bindungsverhaltens sowohl von der räumlichen Struktur des Zuckers (D- oder L-Form, α - oder β -glykosidische Bindung) als auch von der Lage der Nachbarzucker. Zudem scheint auch die Tertiärstruktur eines Glykoproteins entscheidend für das Bindungsverhalten der Lektine zu sein (Lis et al., 1986). Die von Montkowski (1992) als äußere Faktoren bezeichnete Gruppe fasst Einflüsse wie die Fixation des Gewebes, die Art der Markierung und die Konzentration der Lektine zusammen. Diese Klassifizierung der Lektine anhand ihrer Zuckerbindungseigenschaften berücksichtigt jedoch weder die Position des spezifischen Zuckers in der Zuckersequenz noch den synergistischen Effekt einiger benachbarten Zucker auf die Bindung. Gallagher (1984) teilt daher Lektine basierend auf ihrer Empfindlichkeit gegenüber kompetitiv hemmenden Zuckern in zwei Klassen ein:

Klasse- I Lektine:

Bei Klasse-I Lektinen findet die Bindung an einem speziellen Bestandteil des Monosaccharids im Liganden statt. Eine geringe Konzentration des passenden freien Zuckers reicht für eine Hemmung dieser Lektine aus. Diese Lektine werden auch als Exolektine bezeichnet, da sie an externe Zucker in den komplexen Polysacchariden binden.

Klasse- II Lektine:

Diese Lektine reagieren ausschließlich mit komplexen Kohlenhydratsequenzen innerhalb des Glykoproteins. Sie werden daher auch als Endolektine bezeichnet. Sie können wiederum in homotypische Endolektine, welche stärker an homologe Zuckersequenzen binden, und in heterotypische Endolektine, welche höchste Affinität zu Sequenzen aus unterschiedlichen Zuckern zeigen, unterteilt werden.

2.3.4 Anwendung von Lektinen

Lis und Sharon (1986) beschreiben den frühesten und immer noch allgemein verbreiteten Einsatz der Lektine für die Blutgruppenbestimmung. Mittlerweile ist der Einsatz von Lektinen in den verschiedensten Bereichen der Naturwissenschaften üblich. Zum Beispiel in der Histologie werden Lektine zur Darstellung von spezifischen Zuckern und Kohlenhydraten in tierischen und menschlichen Geweben als spezifische Sonden eingesetzt. Sie dienen zudem der Feststellung mancher Glykogen-Speicherkrankheiten. Im Folgenden werden die Hauptanwendungsgebiete der Lektine nach Liener et al. (1986) aufgezählt:

1. Untersuchung komplexer Kohlenhydratstrukturen auf der Zelloberfläche von tierischen Zellen, Bakterien und Viren,
2. Untersuchung der Anordnung von Zuckerstrukturen auf Zelloberflächen und ihrer Veränderung bei malignen Transformationen,
3. Studien über die Genetik, Biosynthese und Funktion von Zelloberflächen-Konjugaten,
4. Untersuchung spezifischer Kohlenhydrat-Bindungsstellen an Proteinen,
5. Blutgruppenbestimmung, Untersuchung der Blutgruppenbestandteile, Identifizierung neuer Blutgruppen,
6. Isolierung und strukturelle Untersuchung kohlenhydratreicher Polymere,
7. Isolierung von Lymphozyten-Subpopulationen und von Stammzellen aus dem Knochenmark.

2.3.5 Lektinbindungsstellen im Hoden und Nebenhoden

Arbeiten über Lektinbindungsstellen im Hoden und Nebenhoden liegen von verschiedenen Spezies vor wie Ratte (Arya und Vanha-Perttula, 1986), Gerbil, Meerschweinchen, Maus, Nutria (Arya und Vanha-Perttula, 1986), Katze (Prem, 1992), Hund (Castagnaro und Valenza, 1990; Montkowski, 1992), Rind (Arya und Vanha-Perttula, 1985) und Mensch (Arenas et al., 1996),

In ihren Untersuchungen am Hoden des Rindes fanden Arya und Vanha-Perttula (1985) heraus, dass sich das Lektinbindungsmuster im Epithel der Tubuli seminiferi contorti während der Akrosomenphase ändert (die Reaktionsintensität mit Con A nimmt im Laufe der Spermio-genese zu); zudem weisen die Sertoli-Zellen eine zyklisch unterschiedliche Affinität zu Lektinen auf. Diese Verhältnisse treffen auch auf den Hoden der Ratte zu: nach der Freigabe der reifen Keimzellen ins Lumen besitzen die Sertoli-Zellen eine höhere Affinität für Con A und WGA (Arya und Vanha-Perttula, 1984). Die germinativen Zellen reagieren mit zunehmender Differenzierung verstärkt. Hund, Katze und Ratte zeigen eine positive

Reaktion mit Con A und WGA mit allen Keimzellstadien. Beim Bullen zeigt sich dieses Bindungsverhalten nur mit Con A. Castagnaro und Valenza (1990) sowie Montkowski (1992) beschreiben erstmals die Topographie der Lektinbindungsstellen im Hoden des Hundes. Die Lektine GS II, UEA und DBA wurden in Untersuchungen von Montkowski (1992) nicht gebunden. Übereinstimmend mit Untersuchungen von Prem (1992) beim Kater und Arya und Vanha-Perttula (1985) bei der Maus konnten zahlreiche Bindungsstellen für WGA im Interstitium des Hodens nachgewiesen werden. Die Lektine Con A, PNA, SBA, MPA, WGA, BPA und RCA binden im Hoden des Hundes.

Im Nebenhoden weisen die einzelnen Segmente ebenfalls ein unterschiedliches Lektin-Bindungsmuster auf. Dies deutet auf eine Spezialisierung der Zellen für die Produktion bestimmter Glykoproteine hin. Arya und Vanha-Perttula (1985) bestätigen in ihren Untersuchungen am Nebenhoden des Rindes diese Aussage. In Region I reagierte die Epitheloberfläche stark, in den Regionen II und III zeigte die Golgi-Zone eine deutlich positive Reaktion ebenso wie in den Regionen IV und V. Sie deuten dieses Ergebnis als Beweis für die Unterschiede bei den sekretorischen und absorbierenden Prozesse in den einzelnen Abschnitten. Übereinstimmend mit Untersuchungen von Prem (1992) beim Kater berichtet Kuhrau (1993) beim Hengst von einer starken Reaktion aller Lektine (außer UEA) im apikalen Epithelbereich der Ductuli efferentes. Die Hauptzellen zeigen in den Stereozilien, den basalen und apikalen Zytoplasmabereichen und in der Golgi-Zone bei den verschiedenen Spezies charakteristische Bindungsverhalten mit Lektinen. Der Golgi-Apparat ist an der Synthese sekretorischer Glykoproteine beteiligt, indem hier ein Teil der Zuckerketten hinzugefügt wird.

Die Glykoproteinzusammensetzung auf der Oberfläche von Spermien ändert sich während der Nebenhodenpassage. Es gehen Glykoproteine verloren und es kommen neue, aus der Nebenhodenflüssigkeit stammende, hinzu. Kawakami et al. (2002) untersuchten die Lektinbindungs-Charakteristika caniner Hoden- und Nebenhodenspermien. Hodenspermien des Hundes zeigen demnach keinerlei Reaktion mit Con A und SBA. Anders als Hodenspermien des Menschen und der des Ziegenbockes färben sie sich jedoch mit DBA. Außerdem zeigen sie eine starke Reaktion mit den Lektinen PNA, PSA und WGA. Nebenhodenspermien reagieren mit SBA bereits im Nebenhodenkopf und mit Con A im Nebenhodenkörper. Für PNA, WGA und PSA werden in allen drei Anteilen des Nebenhodens Bindungsstellen gefunden. Spermien des Nebenhodenschwanzes färben sich nicht mit den Lektinen DBA und SBA.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung wurden die Nebenhoden von 10 Hunden (*Canis familiaris*) verschiedener Altersstufen, die in der kurativen Praxis kastriert wurden, herangezogen. Alle Tiere waren klinisch gesund und die Hoden und Nebenhoden erschienen makroskopisch unverändert. Tabelle 2 liefert eine Übersicht über die zur Probenentnahme verwendeten Tiere.

Tab. 2 Übersicht über die verwendeten Tiere

Nr.	Rasse	Alter	Block Nummer	Region	Fixativ	Licht- mikroskopie	Elektronen- mikroskopie
		Gewicht					
1	Border Collie	3 Jahre 22,7 kg	281/05	Corpus	Bouin	X	
			281/05 2	Caput	Bouin	X	
			282/05 2	Cauda	Bouin	X	
2	Jack Russel	8 Monate 7,85 kg	303/05	Caput	Bouin	X	
			305/05	Corpus	Bouin	X	
			306/05	Cauda	Bouin	X	
3	Mischling	2 Jahre 20,0 kg	356/05	Cauda	Bouin	X	X
			361/05	Corpus	Bouin	X	X
			362/05	Caput	Bouin	X	X
4	Mischling	1 Jahr 7,1 kg	377/05	Caput	Bouin	X	
			379/05	Cauda	Bouin	X	
			380/05	Cauda	Bouin	X	
5	Yorkshire Terrier	1 Jahr 1,75 kg	393/05	Cauda	Bouin	X	
			394/05	Caput	Bouin	X	
			395/05	Corpus	Bouin	X	
6	Pinscher Mischling	1 Jahr 7,75 kg	420/05	Corpus	Bouin	X	
			422/05	Caput	Bouin	X	
			423/05	Cauda	Bouin	X	
7	Dobermann	8 Monate 24,5 kg	437/05 1	Caput	Bouin	X	
			439/05 2	Corpus	Bouin	X	
			440/05 2	Cauda	Bouin	X	
8	Jack Russel	1 Jahr 7,8 kg	449/05 2	Caput	Bouin	X	
			450/05	Corpus	Bouin	X	
			452/05 2	Cauda	Bouin	X	
9	Labrador Mischling	11 Monate 17,0 kg	473/05 1	Caput	Bouin	X	X
			475/05	Corpus	Bouin	X	X
			476/05	Cauda	Bouin	X	X
10	Labrador Mischling	3 Jahre 15,0 kg	487/05	Caput	Bouin	X	X
			489/05	Corpus	Bouin	X	X
			491/05	Cauda	Bouin	X	X

3.2 Probenentnahme und Fixierung

3.2.1 Probenentnahme

Unmittelbar nach dem Absetzen der Hoden und Nebenhoden wurde der Processus vaginalis vorsichtig mit einer scharfen Rasierklinge entfernt. Anschließend wurden die Hoden halbiert, so dass der Nebenhoden vollständig an einer Hälfte des Hodens verblieb. Vom Nebenhoden mit Hodenanteilen wurden Nebenhodenkopf, Nebenhodenkörper und Nebenhodenschwanz präpariert.

3.2.2 Fixierung für lichtmikroskopische Untersuchungen

Als Fixans für die Lichtmikroskopie (konventionelle routinehistologische Färbungen, Immun- und Lektinhistochemie) wurden zwei verschiedene Lösungen verwendet. Von jedem Tier wurde jeweils ein Hoden in Bouin'scher Lösung und einer in Formalin fixiert (Romeis, 1989).

Fixierung in Bouin'scher Lösung:

Die Proben wurden bei Zimmertemperatur für 24 Stunden in Bouin'scher Lösung (gesättigte Pikrinsäure: Formalin: Eisessig wie 15:5:1) fixiert und anschließend im Abstand von 24 Stunden drei Mal in 70 %igen Alkohol verbracht, um das Gewebe von Fixierungsmittel zu reinigen.

Fixierung in Formalin:

Die Proben wurden bei Zimmertemperatur und auf dem Rüttler für eine Woche in Formalin fixiert, welches jeden zweiten Tag gewechselt wurde. Vor der Weiterbehandlung wurden die Formalinproben erst in PBS und anschließend in 70 %igem Alkohol entwässert.

Danach wurden die Proben mittels eines Einbettungsautomaten (Shandon Duplex Processor der Firma Shandon, Frankfurt) in einer aufsteigenden Alkoholreihe über 24 Stunden dehydriert und mit flüssigem Paraplast® (Monoject Scientific Inc. Kildare, Irland) durchtränkt. Die so präparierten Proben wurden anschließend mit einem „Histostat Tissue Embedding Center“ der Firma Reichert-Jung, Wien, in kleine quadratische Paraplastschalen mit Rahmen gegossen. Diese standen zum Auskühlen circa eine Stunde auf einer Kühlplatte. Von jedem Block wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (Firma Leitz, Typ 1516) 4 µm dicke Schnitte gefertigt und auf beschichtete (SupraFrostUltraPlus®adhäsiv) und unbeschichtete (SuperFrost®) Objektträger gezogen (beide Firma Menzel-Gläser, Braunschweig), auf einem Wärmestrecktisch getrocknet und bis zur vollständigen Trocknung, mindestens 24 Stunden, bei 40°C im Wärmeschrank aufbewahrt.

Die Schnitte wurden für die konventionellen, immunhistochemischen und glykohistochemischen Färbungen verwendet.

3.2.3 Fixierung für elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für die Elektronenmikroskopie wurden die Nebenhoden von drei Hunden zwischen 11 Monaten und 3 Jahren präpariert (Tabelle 2). Dafür wurde jeweils eine ca. 1 mm dicke Scheibe aus dem Nebenhodenkopf, -körper und -schwanz entnommen und sofort in Karnovsky-Lösung (2 % Paraformaldehyd, 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer, pH 7,2) fixiert. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C im Kühlschrank belassen. Daraufhin wurde die Karnovsky-Lösung abpipettiert und die Eppendorf-Gefäße mit Cacodylat-Puffer (0,1 M, pH 7,4) aufgefüllt. Weiter wurden die Proben in 1,5 %igem Kaliumferrocyanid und 1 %igem Osmiumtetroxid für 2 Stunden im Dunkeln bei 4°C kontrastiert, es folgte dreimaliges Waschen in 0,1 M Cacodylat-Puffer und die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Anschließend wurden die Proben schrittweise in Epon eingebettet (2 Mal 15 Minuten Propylenoxid (Merck, Darmstadt), 1 Stunde Propylen-Epon-Gemisch (2:1), über Nacht Propylenoxid:Epon im Verhältnis 1:1, 30 Minuten Epon (Polysciences, Eppelheim). Es folgte die Einbettung der Proben in Gelatinekapseln (Plannet, Wetzlar) und Polymerisierung bei 60°C im Wärmeschrank über 24 Stunden. Anschließend wurden an einem Ultramikrotom (Ultracut E, Firma Reichert-Jung, Wien) 1 µm dicke Semidünnschnitte zur Übersicht angefertigt und mit Methylenblau gefärbt. Es folgte eine lichtmikroskopische Beurteilung. Daraufhin wurden Ultradünnschnitte (60 nm) angefertigt, die auf Kupfergrids aufgezogen und mit gesättigtem 2 %igen Uranylacetat und mit Bleizitratlösung (Reynolds, 1963) nachkontrastiert wurden.

3.3 Konventionelle lichtmikroskopische Färbungen

Für die verschiedenen Übersichtsfärbungen wurden alle Schnitte zunächst mit Xylol zwei Mal zehn Minuten entparaffiniert, über eine absteigende Alkoholreihe bis hin zum Aqua dest. rehydriert, gefärbt und mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Nach der Färbung wurden die Schnitte mit einem Tropfen Eukitt® (Riedel de Haen AG, Seelze) eingedeckelt.

Die Methodik der einzelnen, nach Romeis (1989) durchgeführten Färbungen, ist im Anhang aufgeführt.

3.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Bei dieser Färbung stellen sich die Kerne blau-violett und das übrige Gewebe rosarot dar.

Für die Kernfärbung wurde der Schnitt zwanzig Minuten in Hämalaun belassen, kurz in Aqua dest. geschwenkt und anschließend zum Bläuen fünfzehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Danach wurde der Schnitt für zehn Minuten in Eosin verbracht.

3.3.2 Trichromfärbung nach Masson-Goldner

In dieser Übersichtsfärbung erscheinen die Kerne durch das Eisenhämatoxilin nach Weigert braunschwarz und das Zytoplasma ziegelrot. Erythrozyten färben sich orange-gelb an. Besonders dargestellt werden die kollagenen Bindegewebsfasern (grün).

Nach der Alkoholreihe kommen die Schnitte für zehn Minuten in Eisenhämatoxylin nach Weigert, werden danach unter fließendem Leitungswasser gut gespült und für 45 Minuten in Azophloxin verbracht. Im Folgenden wurden die Schnitte mit 1 %iger Essigsäure und destilliertem Wasser gespült und drei Minuten in Phosphormolybdänsäure-Orange gelassen, bevor nach einem weiteren Spülen in 1 %iger Essigsäure eine Gegenfärbung mit Lichtgrün erfolgte (4,5 Minuten).

3.3.3 Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach Mc Manus (PAS-Reaktion) mit und ohne Amylaseverdau

Diese Färbung dient dem Nachweis von Aldehydgruppen, die durch die Oxidation von Glykolen mit Perjodsäure entstehen. Somit lassen sich kohlenhydratreiche Makromoleküle (Glykoproteine, Glykogen) identifizieren. Die Aldehydgruppen bilden mit der Schiff-Reagenz einen purpurroten Farbkomplex. PAS-positive Substanzen färben sich somit rosa bis violettrot an.

Die Schnitte werden anschließend in Xylol und die absteigende Alkoholreihe verbracht. Daraufhin kommen sie für fünf Minuten in eine 0,5 %ige Lösung von Perjodsäure und nach Spülen in destilliertem Wasser für 15 Minuten in Schiff'sches Reagenz. Nach Waschen in Schwefeldioxid-Wasser und Aqua dest. erfolgt abschließend eine Kernfärbung in Hämalaun.

Eine PAS-Reaktion mit Amylaseverdau wird durchgeführt, um Glykogen zu identifizieren. Glykogen wird von Amylase verdaut. Bei den nach dieser Behandlung noch positiv reagierenden Substanzen handelt es sich deshalb nicht um Glykogen.

Bei der Färbung mit Amylaseverdau wurden in der feuchten Kammer jeweils 100 µl 0,5 %ige Amylase pipettiert und für zehn Minuten im Trockenschrank belassen.

3.3.4 Alcianblau-Färbung

In dieser Färbung stellen sich saure Mukosubstanzen leuchtend blau dar, die Kerne hellrot und der Hintergrund färbt sich zartrosa. Um zwischen Karboxyl- und Sulfatgruppen differenzieren zu können, wird dieselbe Färbung bei einem pH-Wert von 2,5 und 1,0 durchgeführt. Bei pH 1,0 färben sich nur sulfatierte Mukosubstanzen an, bei pH 2,5 stellen sich zusätzlich noch karboxylierte Mukosubstanzen dar.

Zur Darstellung saurer Mukosubstanzen wird der Schnitt drei Minuten in 3 %ige Essigsäure gegeben und 30 Minuten in Alcianblau (pH 2,5) gefärbt, mit Aqua dest. gespült und fünf Minuten in Kernechtrot gefärbt. Nach erneutem Spülen folgt das Durchlaufen der aufsteigenden Alkoholreihe.

Zur Darstellung sulfatierter Mukosubstanzen wird der Schnitt vor der Färbung mit Kernechtrot drei Minuten in 0,1 N HCl gegeben, anschließend in Alcianblau (pH 2,5) gefärbt und erneut in HCl gespült.

Auswertung:

Die Auswertung der konventionell gefärbten Schnitte erfolgte mit einem Mikroskop (Aristoplan) der Firma Leitz, Wetzlar. An dieses war eine Canon-Powershot A95-Digitalkamera gekoppelt.

3.4 Immunhistochemische Färbungen

Bei diesen Untersuchungen wurde die „Avidin-Biotin-Complex-Methode“ („ABC-Methode“) (Hsu et al., 1981) angewandt. Diese beruht auf der sehr hohen Bindungsaffinität von Avidin, einem Glykoprotein aus Hühnereiweiß, zum Vitamin Biotin. Avidin kann vier Moleküle von Biotin binden. Dabei kann Avidin durch Streptavidin ersetzt werden, einem chemisch exakt definierten Produkt, das auf biotechnologischem Weg entwickelt wurde. Es wird aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert. Der Primärantikörper wird über einen biotinylierten Sekundärantikörper an einen Komplex aus Streptavidin und einer biotinylierten Peroxidase gebunden. Durch ein besonderes Mischungsverhältnis der beiden Reaktionspartner Streptavidin und Peroxidase bleiben noch einige Biotin-Bindungsstellen am Molekül frei, die mit dem Biotin des Sekundärantikörpers reagieren können. Anschließend wird die Peroxidaseaktivität durch ein geeignetes Substrat, hier 3,3-Diaminobenzidin (DAB), sichtbar gemacht. Die entstehenden braunen Farbprodukte machen den Antigen-Antikörper-Komplex und damit die lokalen Immunreaktionen sichtbar.

Tab. 3 Übersicht über die verwendeten Antikörper

Primär-Antikörper	AK-liefernde Tierart	Verdünnung/Inkubation	Herkunft	Sekundär-Antikörper	Verdünnung/Inkubation
Vimentin monoclonal mouse anti vimentin	Maus	1:500	Dako (Heidelberg)	Anti Maus biot. vom Kaninchen (Sigma, Deisenhofen)	1:300 30 Minuten bei Raumtemperatur
Laminin polyclonal rabbit anti laminin serotec	Kaninchen	1:500 über Nacht bei 4°C	Serotec (Düsseldorf)	Anti Kaninchen biot. vom Schwein (Dako, Heidelberg)	1:400 30 Minuten bei Raumtemperatur
Östrogen Rezeptor era (h-184) rabbit polyclonal	Kaninchen	1:200 über Nacht bei 4°C	Santa Cruz (Kalifornien, USA)	Anti Kaninchen biot. vom Schwein (Dako, Heidelberg)	1:400 30 Minuten bei Raumtemperatur
Progesteron Rezeptor monoclonal antibody to progesteron receptor	Maus	1:400 über Nacht bei 4°C	Beckman Coulter (Krefeld)	Anti Maus biot. vom Kaninchen (Sigma, Deisenhofen)	1:300 30 Minuten bei Raumtemperatur
α-sma mab anti human alpha smooth muscle actin	Maus	1:40 60 Minuten bei Raumtemperatur	Dako (Heidelberg)	Anti Maus biot. vom Kaninchen (Sigma, Deisenhofen)	1:300 30 Minuten bei Raumtemperatur
Panzytokeratin monoclonal mouse anti pancytokeratin	Maus	1:100	Biocarta (Hamburg)	Anti Maus biot. vom Kaninchen (Dako, Heidelberg)	1:300 30 Minuten bei Raumtemperatur
Chromogranin A polyclonal	Kaninchen	1:400 über Nacht bei 4°C	Dako (Heidelberg)	Anti Kaninchen biot. vom Schwein (Dako, Heidelberg)	1:400 30 Minuten bei Raumtemperatur
Androgen Rezeptor	Kaninchen	1:50	Dako (Heidelberg)	Anti Kaninchen biot. vom Schwein (Dako, Heidelberg)	1:300 30 Minuten bei Raumtemperatur

Die immunhistologischen Untersuchungen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. 24 Stunden vor Durchführung der Immunreaktion Verbringen der beschichteten Objektträger in den Wärmeschrank (37°C).
2. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol (2 Mal 30 Minuten) und Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe.
3. Zwei Mal fünf Minuten Waschen in 0,05 M PBS-Puffer (pH 7,4).

Androgen-, Progesteron- und Östrogen-Rezeptor:

4. Schnitte in Citratpuffer (pH 6,0) in der Mikrowelle bis zum Kochen erhitzen (3 Mal 10 Minuten). Danach 20 Minuten Abkühlzeit und zweimaliges Waschen in PBS-Puffer.

Vimentin, Laminin und Panzytokeratin:

5. Beim immunhistochemischen Nachweis von Vimentin Vorinkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,1 %iger Protease (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
6. Beim immunhistochemischen Nachweis von Laminin Vorinkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,1 %iger Protease
7. Beim immunhistochemischen Nachweis von Panzytokeratin Vorinkubation für 30 Minuten mit Trypsin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen). Anschließendes Verbringen der Schnitte für 2 Mal 5 Minuten in PBS-Puffer
8. Zur Hemmung der endogenen Peroxidase Inkubation der Schnitte in einer 1:3-Lösung aus 30 %igem Hydrogenperoxid und Aqua dest. bei Raumtemperatur für 10 Minuten
9. Unter fließendem Leitungswasser 10 Minuten spülen
10. In 0,05 M PBS (pH 7,4) 2 Mal 5 Minuten waschen
11. Auftragen von Protein Block Serum Free (Dako, Hamburg) bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer zur Blockung unspezifischer Bindungsstellen (10 Minuten)
12. Abgießen des Normalserums und Inkubation der Schnitte mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C in feuchten Kammern (bei α -sma nur für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren).
13. Zweimaliges Waschen in 0,05 M PBS-Puffer
14. Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur in den feuchten Kammern
15. Inkubation der Schnitte mit dem Sekundärantikörper in der entsprechenden

Verdünnung für 30 Minuten bei Raumtemperatur

16. Zwei Mal für jeweils fünf Minuten Waschen in PBS-Puffer
17. Markierung des biotinylierten Sekundärantikörpers mit Streptavidin-Biotin-Meerrettichperoxidase-Komplex (ABC-Komplex, Streptavidin-Biotin-Horseradish-Complex, Dako, Hamburg), 30 Minuten bei Raumtemperatur
18. Zwei Mal für jeweils fünf Minuten Waschen in PBS-Puffer
19. Sichtbarmachung der Antigen-Antikörperreaktion mittels DAB-Hydrogenperoxid-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) für fünf bis acht Minuten bei Raumtemperatur
20. Kurzes Spülen in fließendem Leitungswasser
21. Eventuell Gegenfärben der Kerne für 30 Sekunden in Hämalaun und anschließendes Bläuen in fließendem Leitungswasser
22. Dehydrieren der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe, zwei Mal zehn Minuten in Xylol und anschließend Eindeckeln der Schnitte mit Eukitt®

Bei allen immunhistochemischen Untersuchungen wurden Negativkontrollen durchgeführt, wobei der Primärantikörper durch ein Aliquot an Antikörper-Diluent ersetzt wurde.

Auswertung:

Die Auswertung der Schnitte der Immunhistochemie erfolgte mit einem Mikroskop (Aristoplan) der Firma Leitz, Wetzlar. An dieses war eine Canon-Powershot A95-Digitalkamera gekoppelt.

3.5 Glykohistochemische Färbungen

Zum Nachweis von Glykokonjugaten im Nebenhoden des Hundes wurden die in Tabelle 4 angegebenen Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) markierten Lektine (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) verwendet. Dieser Nachweis erfolgte nach der direkten Methode, bei der das direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC konjugierte Lektin an den spezifischen Zucker bindet. Dabei wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

1. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol (2 Mal 30 Minuten) und Rehydrieren in einer absteigender Alkoholreihe bis Aqua dest.
2. Waschen in 0,05 M TRIS Puffer, pH 6,8, 3 Mal 5 Minuten
3. Beschichtung der Schnitte mit FITC- markiertem Lektin (Konzentration 12 µg/ml TRIS Puffer). Inkubation in einer feuchten Kammer für eine Stunde unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur
4. Spülen in 0,05 M TRIS Puffer, pH 6,8, 3 Mal 5 Minuten
5. Eindeckeln der Schnitte mit einem Gemisch aus Polyvinylalkohol und Ethylenglycol (Serva, Heidelberg)
6. Aufbewahrung der fertigen Schnitte bis zur Auswertung im Kühlschrank bei 4°C

Negativkontrolle:

Um mögliche Eigenfluoreszenz des Gewebes zu erkennen, wurden Negativkontrollen des jeweilig zu untersuchenden Präparates angefertigt. Hierbei wurde anstelle der Lektinlösung mit der entsprechenden Menge an TRIS Puffer inkubiert.

Kompetitive Hemmung:

Die Spezifität der einzelnen Lektine wurde durch kompetitive Hemmung mit den jeweils korrespondierenden Zucker überprüft. Dazu wurden die Lektine mit einer 0,2 M Lösung des entsprechenden Hemmzuckers (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) für eine Stunde bei Raumtemperatur und Dunkelheit bei Punkt drei anstelle der Lektinlösung aufpipettiert.

Positivkontrolle:

Um das Funktionieren des jeweilig verwendeten Lektins zu überprüfen, wurden zudem Positivkontrollen angefertigt. Hierzu wurde Gewebe verwendet, bei dem bekannt ist, dass es mit den entsprechenden Lektinen reagiert.

Auswertung:

Die Auswertung der Präparate der glykohistochemischen Untersuchungen erfolgte an einem Auflichtfluoreszenzmikroskop Dialux 20 der Firma Leitz GmbH, Wetzlar.

Tab. 4 Übersicht über die in der Studie verwendeten FITC-markierten Lektine

Lektingruppe	Lektin	Herkunft	Abkürzung	Zuckerspezifität	Hemmung
I. D-Mannose/ D-Glukose bindende Lektine	Canavalia ensiformes Agglutinin	Schwertbohne	ConA	α -D-Man \rightarrow α -D-Glc	D-Mannose
	Lens culinaris Agglutinin	Linse	LCA	α -D-Man	D-Mannose
	Pisum sativum Agglutinin	Erbse	PSA	α -D-Man	D-Mannose
II. D-Galaktose bindende Lektine	Arachis hypogaea Agglutinin	Erdnuss	PNA	β -D-Gal-(1-3)-D-GalNAc	D-Galaktose
	Ricinus communis Agglutinin	Rizinusstaude	RCA	β -D-Galaktose	D-Galaktose
III. N-Acetyl-D-Galaktosamine bindende Lektine	Dolichos biflorus Agglutinin	Pferdebohne	DBA	α -D-GalNAc(1-3)GalNAc	N-Acetyl-D-Galaktosamin
	Glycine max Agglutinin	Sojabohne	SBA	α -D-GalNAc, α -D-Gal	N-Acetyl-D-Galaktosamin
	Saphora japonica Agglutinin	Chinesischer Schnurbaum	SJA	α -D-GalNAc	N-Acetyl-D-Galaktosamin
	Griffonia simplicifolia Agglutinin		GSL I	α -D-GalNAc	N-Acetyl-D-Galaktosamin
IV. N-Acetyl-D-Glukosamine bindende Lektine	Triticum vulgare Agglutinin	Weizenkeim	WGA	(D-GlcNAc) 2 NeuNAc	GlcNAc
	Triticum vulgare Agglutinin s	Weizenkeim	WGAs (succinyliert)	(D-GlcNAc) 2 NeuNAc	GlcNAc
V. L-Fukose bindende Lektine	Ulex europaeus Agglutinin	Stechginster-samen	UEA	α -L-Fukose	α -L-Fukose
VII. Lektine mit komplexen Kohlenhydratbindungsstellen	Phaseolus vulgaris Agglutinin	Gartenbohne	PHA E		
			PHA L		

3.6 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Auswertung und fotografische Dokumentation der elektronenmikroskopischen Proben erfolgte an einem Transmissionselektronenmikroskop EM 902 der Firma Zeiss (Carl Zeiss, Oberkochen).

3.7 Auswertung morphometrischer Daten

Zur Ermittlung der Epithelhöhen und der Lumendurchmesser wurden von fünf Versuchstieren die einzelnen Gangabschnitte herangezogen und pro Gangabschnitt an je zehn Stellen der maximale innere Lumendurchmesser und die Epithelhöhe an senkrecht angeschnittenen Stellen gemessen. Dies erfolgte an digitalen Bildern, die mit einer Canon-Powershot A95-Digitalkamera mit dem 40x Objektiv (Epithelhöhen) beziehungsweise mit dem 10x Objektiv (Lumendurchmesser) aufgenommen wurden. Die Messungen wurden mit Hilfe des Programmes WCIF ImageJ (Rasband, W. S.) durchgeführt. Den statistischen Berechnungen liegen die Programme Excel für Windows und das Statistikprogramm SPSS Version 14,0 zu Grunde. Die Signifikanz der Werte wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test überprüft.

Die Auszählung der positiven Epithelzellen (Östrogen- und Androgen-Rezeptoren) erfolgte in jeweils fünf Sichtfeldern pro Schnitt. Je Sichtfeld wurden 100 Zellen mit dem 40x Objektiv ausgezählt. Die Zellkerne wurden in die Reaktionsgruppen schwach positiv und stark positiv eingeteilt. Im Anschluss wurde die Gesamtkernzahl der beiden Reaktionsgruppen ermittelt. Die grafische Darstellung der ermittelten Daten erfolgte mit dem Programm Excel für Windows.

4 Ergebnisse

4.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen am Nebenhoden des Hundes

Der Nebenhoden liegt dem Hoden an seinem Margo epididymidis an und ist mit diesem an seinem kaudalen Ende durch das Ligamentum testis proprium verbunden. Makroskopisch ist eine Gliederung in einen Kopf (Caput epididymidis), einen Körper (Corpus epididymidis) und einen Schwanz (Cauda epididymidis) leicht erkennbar.

Mikroskopisch ist durch die Beurteilung verschiedener Parameter (Lumendurchmesser des Nebenhodenganges, Epithelhöhe, Oberflächenbesatz, Vorkommen von Zellarten) eine Einteilung in vier Abschnitte möglich. Der Nebenhodenkopf beherbergt die Ductuli efferentes und das Initialsegment des Ductus epididymidis. Das Mittelsegment bildet die Grundlage des Nebenhodenkörpers und das Terminalsegment entspricht dem Nebenhodenschwanz.

4.1.1 Ductuli efferentes testis

Die Ductuli efferentes testis durchbrechen am Kopfende des Hodens die Tunica albuginea und verbinden so das Rete testis mit dem Ductus epididymidis. Sie wickeln sich sehr stark auf und jeder Kanal bildet zusammen mit Bindegewebe einen so genannten Samenkegel.

Das unterschiedlich hohe, mehrreihige Epithel der Ductuli efferentes ist mit nur $19 \mu\text{m}$ ($\pm 2,8 \mu\text{m}$) deutlich niedriger als in den folgenden Segmenten und beinhaltet zwei verschiedene Zellarten. Die hochprismatischen, mit Kinozilien besetzten Flimmerzellen stellen den größeren Anteil der Epithelzellen dar. Ihr Zellkern besitzt längliche Form und liegt in der basalen Hälfte der Zelle. Zu erkennen sind ein dominanter Nukleolus und mehrere kleinere Nukleoli im Hintergrund. Die Kinozilien sind kaum verklebt und an ihrer Basis sind kleine Körnchen, so genannte Basalkörper, zu erkennen. Die zweite vorkommende Zellart besitzt einen runden Zellkern, der basal oder auch zentral im Zytoplasma liegt, und trägt an der lumenseitigen Oberfläche einen regelmäßigen Bürstensaumbesatz (Mikrovilli). Auch bei dieser Zellart ist ein dominanter Nukleolus erkennbar (Bild 2). Auf die kräftige Basallamina folgen zwei bis drei lockere Muskelzelllagen und gefäßreiches Bindegewebe. Das Lumen der Ductuli efferentes hat oft sternförmiges Form (Bild 1) und der mittlere Lumendurchmesser beträgt $78,7 \mu\text{m}$ ($\pm 25,7 \mu\text{m}$). Damit ist er deutlich geringer als in den folgenden drei Segmenten. Im Lumen sind Spermien und Zelltrümmer zu finden. In der PAS-Färbung zeigen der apikale Epithelsaum und die Basalmembran eine deutlich positive Reaktion (Bild 3). Bei der Alcianblau-Färbung bei pH 1 reagieren lediglich im Bindegewebe einzeln vorkommende Mastzellen stark positiv, wohingegen bei pH 2,5 auch die Kinozilien eine deutlich positive Reaktion zeigen (Bild 4). Im Zytoplasma der Zellen sind schwach positive Granula erkennbar.

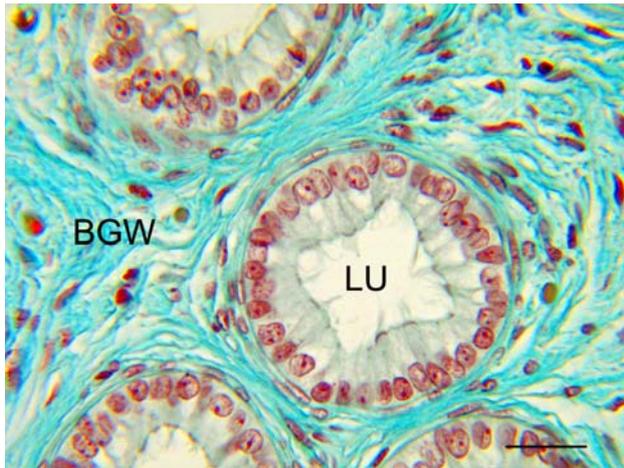


Bild 1: Ductuli efferentes, Goldner-Färbung, SB = 25 µm

Sternförmiges Lumen (LU) der Ductuli efferentes. BGW = Bindegewebe



Bild 2: Epithel der Ductuli efferentes, Goldner-Färbung, SB = 10 µm

Flimmerzellen mit Kinozilien und Basalkörperchen (Pfeil), zilienlose Zellen mit rundem Zellkern und Mikrovilli (Pfeilspitze).



Bild 3: Ductuli efferentes, PAS-Färbung, SB = 25 µm

Basalmembran (BM) und apikaler Zellsaum (Pfeil) zeigen eine positive Reaktion.

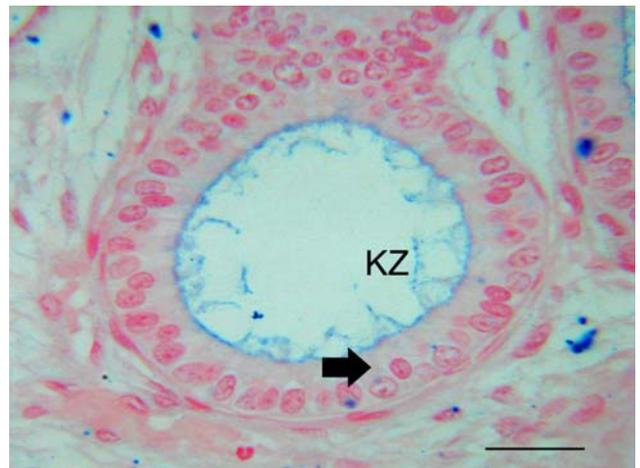
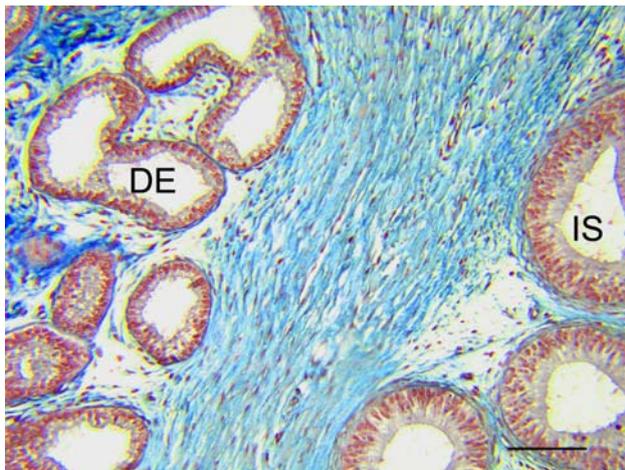


Bild 4: Ductuli efferentes, Alcianblau-Färbung bei pH 2,5, SB = 25 µm

Kinozilien (KZ) der Flimmerzellen reagieren deutlich positiv. Im Epithel sind schwach positive Granula (Pfeil).

Tab. 5 Histomorphologische Befunde der Ductuli efferentes

Zellen mit Kinozilien	Zellkernform	länglich, z.T. quadratisch
	Zellkernlage	in der basalen Hälfte des Zytoplasma
	Nukleoli	ein großer, mehrere kleine
	Kinozilien	kaum verklebt, haben Basalkörperchen
Zellen mit Mikrovilli	Zellkernform	rund
	Zellkernlage	zentral im Zytoplasma
	Nukleoli	ein dominanter Nukleus
	Mikrovilli	gleichmäßig
Basallamina	kräftig, regelmäßig	
Muskelschicht	zwei bis drei dünne Schichten glatter Muskelzellen	
Bindegewebe	Blutgefäße	viele, geringer Lumendurchmesser
	Fibrozyten	
Lumen	Form	überwiegend sternförmig, z.T. rund
	Inhalt	Spermien, Zelltrümmer

**Bild 5:** Ductuli efferentes und Initialsegment, SB = 100 µm

Übergang der Ductuli efferentes (DE) in das hochprismatische Epithel des Initialsegment (IS).

4.1.2 Ductus epididymidis

4.1.2.1 Initialsegment

Das Initialsegment des Nebenhodenganges ist von den Ductuli efferentes durch einen deutlichen Anstieg der Epithelhöhe zu unterscheiden (Bild 5). Diese beträgt hier durchschnittlich $36,9 \mu\text{m}$ ($\pm 13,9 \mu\text{m}$). Das Initialsegment ist mit einem mehrreihigen, hochprismatischen Epithel ausgekleidet, das zwei unterschiedliche Zellarten besitzt: Basal- und Hauptzellen. Die runden, zum Teil auch quadratischen Basalzellen sind deutlich kleiner als die Hauptzellen und liegen der Basallamina direkt an. Sie besitzen einen dominanten Nukleolus, weitere kleinere sind sichtbar. Die Hauptzellen sind langgezogen und haben auf ihrer Oberfläche weit ins Lumen reichende, zum Teil verklebte Stereozilien. Ihr Zellkern ist ovoid, besitzt einen dominanten Nukleolus und ist im basalen Drittel der Zelle lokalisiert. Die Zellkerne liegen etwa auf gleicher Höhe im Epithel (Bild 6). Die Muskulatur besteht aus zwei, manchmal auch drei Lagen glatter Muskelzellen. Der mittlere Lumendurchmesser des Initialsegmentes beträgt $126,9 \mu\text{m}$ ($\pm 23,2 \mu\text{m}$). Darin befinden sich nur vereinzelt Spermien. Bei der PAS-Färbung mit und ohne Amylaseverdau zeigen der apikale Epithelsaum, die Basallamina und die Stereozilien eine stark positive Reaktion (Bild 7). Auch die Muskulatur reagiert deutlich positiv. Bei der Färbung mit Alcianblau reagieren bei einem pH von 1,0 lediglich einzelne, im Bindegewebe vorkommende Mastzellen stark positiv. Das Epithel zeigt keinerlei Reaktion. Bei pH 2,5 hingegen reagieren die Stereozilien der Hauptzellen stark positiv und auch das Epithel reagiert mit kleinen Granula schwach positiv.

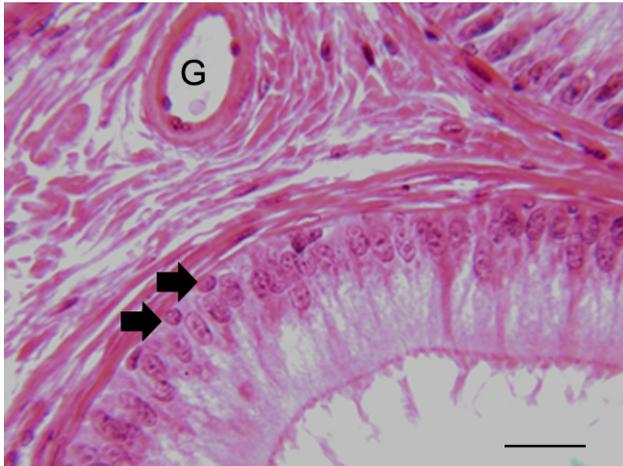


Bild 6: Initialsegment, HE-Färbung, SB = 25 μ m
Kleine runde Basalzellen liegen direkt an der Basalmembran (Pfeil). G = Gefäß

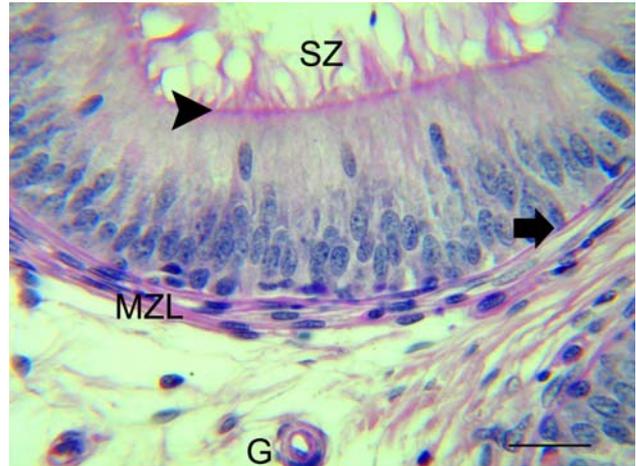


Bild 7: Initialsegment, PAS-Färbung mit Amylase, SB = 25 μ m

Stereozilien (SZ), apikaler Epithelsaum (Pfeilspitze), Basallamina (Pfeil) und Muskelzellige (MZL) reagieren deutlich positiv.



Bild 8: Initialsegment, PAS-Färbung, SB = 25 μ m
Stark positive Reaktion des apikalen Epithelsaumes (Pfeil).

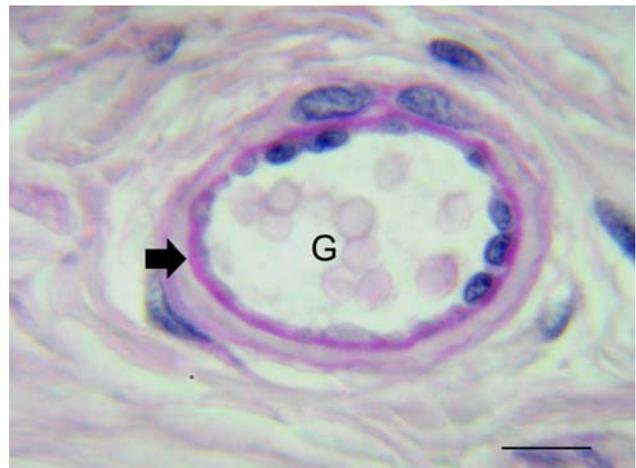


Bild 9: Gefäß im Initialsegment, PAS-Färbung, SB = 10 μ m

Stark positive Reaktion des Endothels (Pfeil) der Gefäße bei der PAS-Färbung.

Tab. 6 Histomorphologische Befunde des Initialsegmentes

Hauptzellen	Zellkernform	rund, deutlich größer als Basalzellen
	Zellkernlage	im basalen Drittel
	Nukleoli	ein dominanter, mehrere kleine
	Stereozilien	lang, kaum verklebt
Basalzellen	Zellkernform	rund, z.T. polygonal
	Zellkernlage	nahe der Basalmembran
	Nukleoli	ein großer Nukleolus
Basallamina	dünn, regelmäßig	
Muskelschicht	zwei bis drei Lagen	
Bindegewebe	Blutgefäße	mehrere, z.T. mit größerem Lumen
Lumen	Inhalt	wenige Spermien

4.1.2.2 Mittelsegment

Im Mittelsegment ist das Epithel mit $45,8 \mu\text{m}$ ($\pm 4,1 \mu\text{m}$) am höchsten im gesamten Nebenhodengang. Die Zellkerne der Hauptzellen liegen alle ungefähr auf gleicher Höhe weiter lumenwärts im Zytoplasma und sind langgestreckt. Meist sind zwei große Nukleoli vorhanden, die zentral im Zellkern liegen. Auch in diesem Segment reichen die Stereozilien weit ins Lumen ($110,6 \mu\text{m}$) und sind teilweise verklebt. Neben den Hauptzellen sind die kleineren, niedrigen Basalzellen zu sehen (Bild 10). Ihr Zellkern ist rund bis dreieckig und enthält einen dominanten Nukleolus. Das Lumen ist mit einem Durchmesser von durchschnittlich $119,8 \mu\text{m}$ ($\pm 119,8 \mu\text{m}$) etwas kleiner als im Initial- und auch im Terminalsegment. Darin sind Spermien und auch vereinzelt Zelltrümmer zu finden. Auf die Basallamina folgt nach außen eine drei- bis vierlagige Muskelschicht. Das durch die Trichromfärbung nach Masson-Goldner grün angefärbte Bindegewebe lässt Blut- und Lymphgefäße erkennen. Die Blutgefäße besitzen ein deutlich größeres Lumen als im Initialsegment. Im Mittelsegment zeigt sich bei den Färbungen mit PAS (mit und ohne Amylaseverdau) und Alcianblau dasselbe Verhalten wie im Initialsegment. Auffallend ist jedoch, dass in diesem Segment bei den Färbungen mit Hämatoxylin, PAS mit und PAS ohne Amylaseverdau regelmäßig Ketten von lila gefärbten Granula an der Basallamina zu sehen sind (Bild 12 und 13). Dieselben Granula sind auch im Lumen und unregelmäßig im Epithel, hier jedoch einzeln gelegen, zu finden. Auch fallen bei der Alcianblau-Färbung weniger Mastzellen im Bindegewebe auf als im Initialsegment.

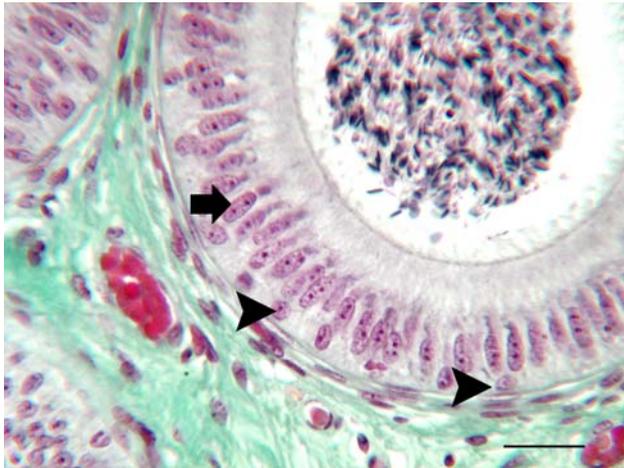


Bild 10: Mittelsegment, Goldner-Färbung, SB = 25 μ m

Kerne der Basalzellen (Pfeilspitzen) behalten ihre basale Lage bei, Kerne der Hauptzellen (Pfeile) sind jetzt länglich und zentral im Epithel lokalisiert.

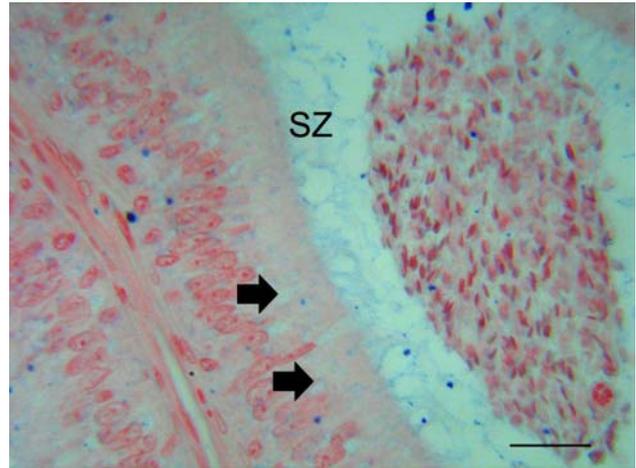


Bild 11: Mittelsegment, Alcianblau-Färbung bei pH 2,5, SB = 25 μ m

Stereozilien (SZ) reagieren positiv. Im Epithel kommen schwach positiv reagierende Granula (Pfeil) vor.

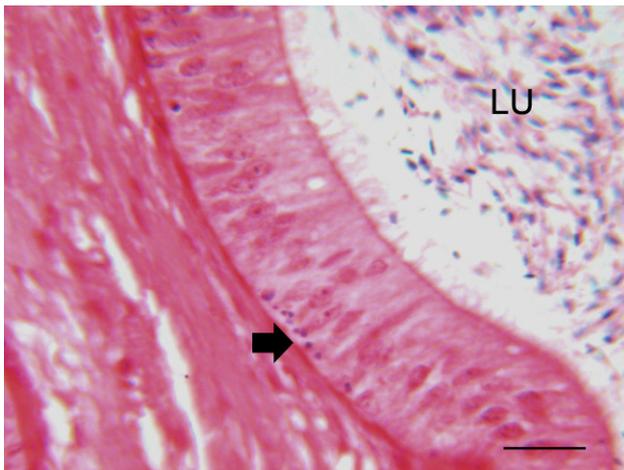


Bild 12: Mittelsegment, HE-Färbung, SB = 25 μ m

Im Lumen (LU) und basal kommen dunkel gefärbte Granula vor.

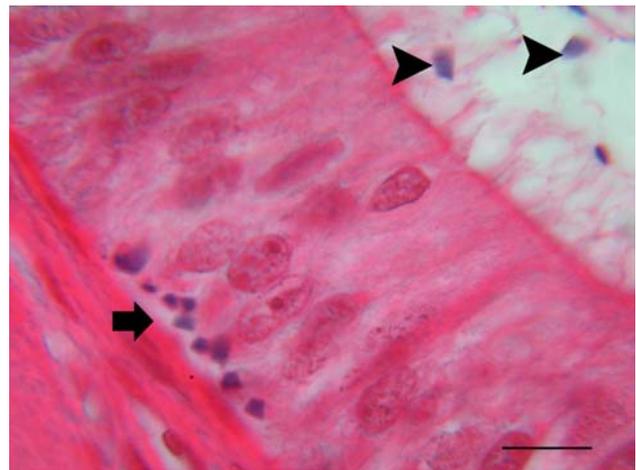


Bild 13: Mittelsegment, HE-Färbung, SB = 10 μ m

Basal aneinander gereihete Granula (Pfeil). Im Lumen vorhandene Granula (Pfeilspitze).

Tab. 7 Histomorphologische Befunde des Mittelsegmentes

Hauptzellen	Zellkernform	länglich
	Zellkernlage	zentral im Epithel, alle auf einer Höhe
	Nukleoli	zwei große, die zentral oder im oberen Drittel des Zellkerns liegen
	Stereozilien	reichen weit ins Lumen, z.T. verklebt
Basalzellen	Zellkernform	rund bis dreieckig
	Zellkernlage	direkt an der Basalmembran
	Nukleoli	ein großer
Basallamina	dünn, regelmäßig	
Muskelschicht	drei bis vier Lagen	
Bindegewebe	Blutgefäße	wie im IS, aber großlumiger
Lumen	Inhalt	Spermien, vereinzelt Zellen der Keimzellpopulation

4.1.2.3 *Terminalsegment*

Das Epithel ist mit einer durchschnittlichen Höhe von 30,9 μm (+/- 5,2 μm) am niedrigsten im Nebenhodengang. Im Unterschied zum Mittelsegment besitzen die Hauptzellen hier einen runden Zellkern und sie liegen auch nicht auf gleicher Höhe im Zytoplasma, sondern sind unregelmäßiger angeordnet. Die Zellkerne besitzen mehrere Nukleoli. Die Stereozilien der Hauptzellen sind deutlich kürzer (67,1 μm) als im Initial- und Mittelsegment, gleichmäßig und nicht verklebt. Die Basalzellen ordnen sich wie in den vorigen Segmenten an der Basallamina an und besitzen runde Gestalt. Auch kommen in diesem Segment Apikalzellen vor. Das Terminalsegment besitzt mit durchschnittlich 321,0 μm (+/- 95,9 μm) das weiteste Lumen im Nebenhoden. Darin sind massenhaft Spermien, Zellen und Zelltrümmer zu finden. Deutlich erkennbar ist auch die Zunahme der Muskelschicht auf bis zu fünf Lagen glatter Muskelzellen. Bei der Färbung mit PAS (mit und ohne Amylaseverdau) zeigen die Stereozilien, der apikale Epithelsaum, die Basalmembran und die Basallamina der Gefäße eine stark positive Reaktion. Im Epithel selbst, an den Kernen und lumenseitig an der Stereozilienbasis kommen stark positive Granula vor. Auch der Lumeninhalt und die Muskelzelllagen reagieren deutlich positiv. Zudem kommen wieder die bereits im Mittelsegment aufgefallenen positiven Granula an der Basalmembran vor (Bild 14 und 15). Bei der Färbung mit Alcianblau zeigt sich das gleiche Reaktionsmuster wie im Mittelsegment. Die Stereozilien und Granula im Epithel reagieren positiv. Mastzellen kommen nur sehr vereinzelt vor.

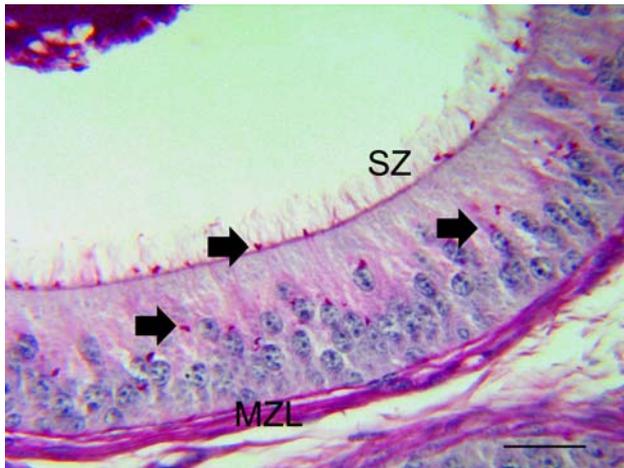


Bild 14: Terminalsegment, PAS-Färbung,
SB = 25 μ m

Stark positive Granula im Epithel und im Lumen (Pfeil). Die Muskelzellige (MZL), Stereozilien (SZ) und apikaler Epithelsaum reagieren stark positiv.

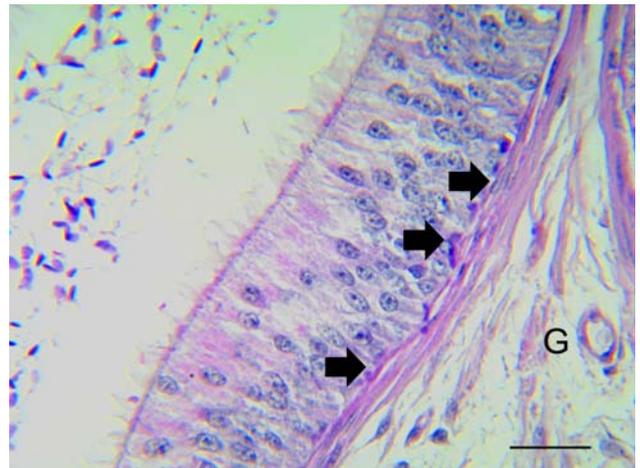


Bild 15: Terminalsegment, PAS-Färbung,
SB = 25 μ m

Deutlich positive Granula (Pfeil) an der Basalmembran. Positive Reaktion des Gefäßendothels (G).

Tab. 8 Histomorphologische Befunde des Terminalsegmentes

Hauptzellen	Zellkernform	rund
	Zellkernlage	basal bis zentral, unregelmäßig im Epithel
	Nukleoli	zwei große, mehrere kleinere
	Stereozilien	kurz, nicht verklebt
Basalzellen	Zellkernform	rund
	Zellkernlage	direkt an der Basallamina
	Nukleoli	ein großer, kleine im Hintergrund
Basallamina	dünn, regelmäßig	
Muskelschicht	drei bis fünf Schichten	
Bindegewebe	Blutgefäße	viele kleinlumige, auch großlumige
Lumen	Inhalt	viele Spermien, Zellen und Zelltrümmer
Anmerkung	Apikalzellen vorhanden	

4.1.3 Morphometrische Untersuchungen

Epithelhöhen:

Die Epithelhöhe ändert sich in Abhängigkeit der verschiedenen Gangabschnitte: sie beträgt in den Ductuli efferentes im Mittel 14,5 μm (+/- 2,8 μm), im Initialsegment durchschnittlich 36,9 μm (+/- 13,6 μm), im Mittelsegment 45,8 μm (+/- 4,2 μm) und im Terminalsegment ergibt sich ein Durchschnittswert von 30,9 μm (+/- 5,3 μm). Auf Grundlage des Mann-Whitney-Test berechnet zeigt sich ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,01$) der Werte der Lumendurchmesser zwischen den Ductuli efferentes und dem Initialsegment und zwischen Mittel- und Terminalsegment. Zwischen Initial- und Mittelsegment besteht ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$).

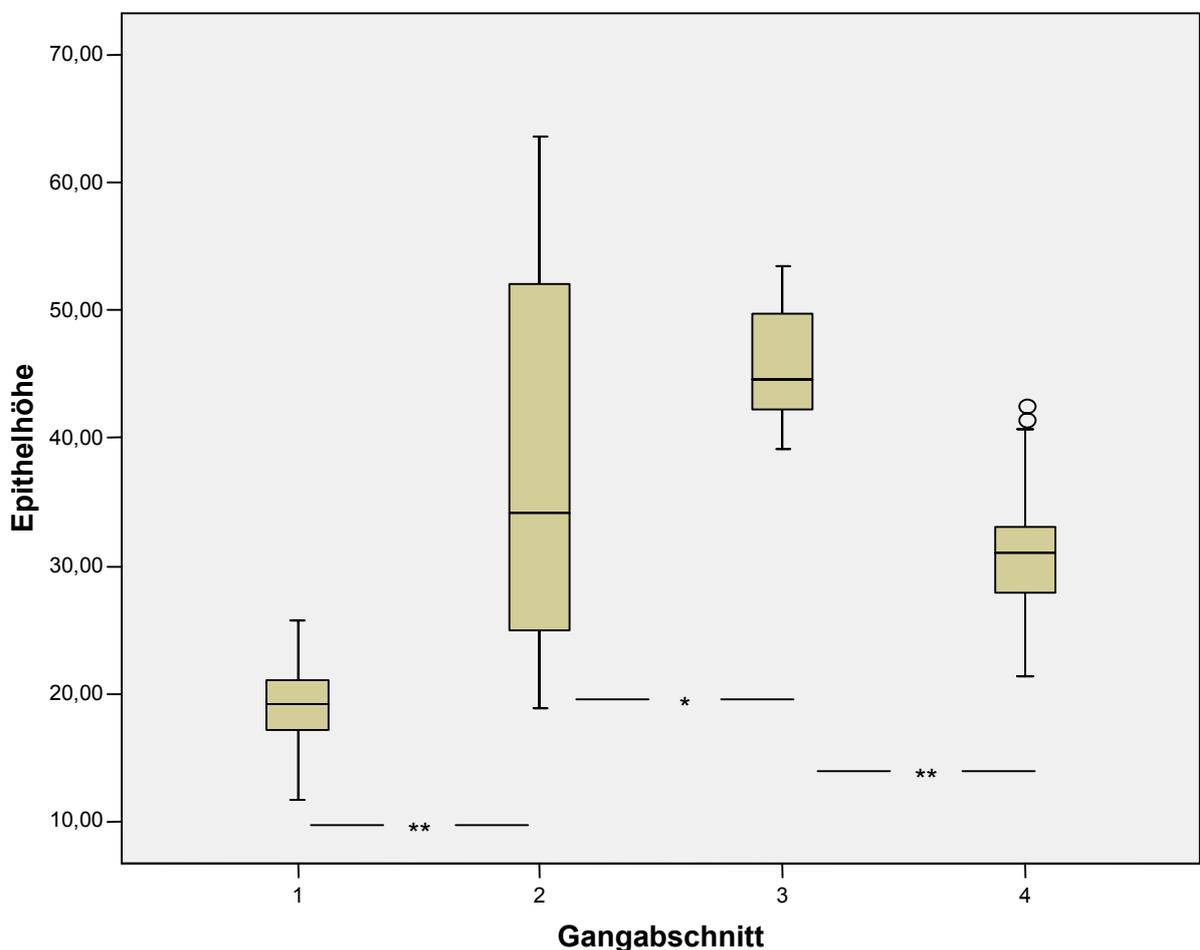


Bild 16: Grafische Darstellung der Epithelhöhen in μm in den einzelnen Gangabschnitten des Nebenhodens.

Gangabschnitt 1 = Ductuli efferentes, Gangabschnitt 2 = Initialsegment, Gangabschnitt 3 = Mittelsegment, Gangabschnitt 4 = Terminalsegment.

Im Box-Plot-Diagramm ist die Häufigkeitsverteilung der Variablen Epithelhöhe (inklusive Ausreißer) mit Interquartile (braune Box), Medianwert und der Spannweite der Verteilung angegeben.

* Signifikanz der Werte ($p < 0,05$), ** hohe Signifikanz der Werte ($p < 0,01$) berechnet mit dem Mann-Whitney-Test.

Lumendurchmesser:

Gemessen wurde der maximale innere Lumendurchmesser. Die Ductuli efferentes haben einen durchschnittlichen Lumendurchmesser von $78,7 \mu\text{m}$ ($\pm 25,8 \mu\text{m}$), im Initialsegment beträgt er $126,9 \mu\text{m}$ ($\pm 23,2 \mu\text{m}$), im Mittelsegment $119,8 \mu\text{m}$ ($\pm 30,7 \mu\text{m}$) und im Terminalsegment beträgt der Lumendurchmesser $321,0 \mu\text{m}$ ($\pm 96,9 \mu\text{m}$). Auf Grundlage des Mann-Whitney-Test berechnet zeigt sich ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,01$) der Werte der Lumendurchmesser zwischen den Ductuli efferentes und dem Initialsegment und zwischen Mittel- und Terminalsegment.

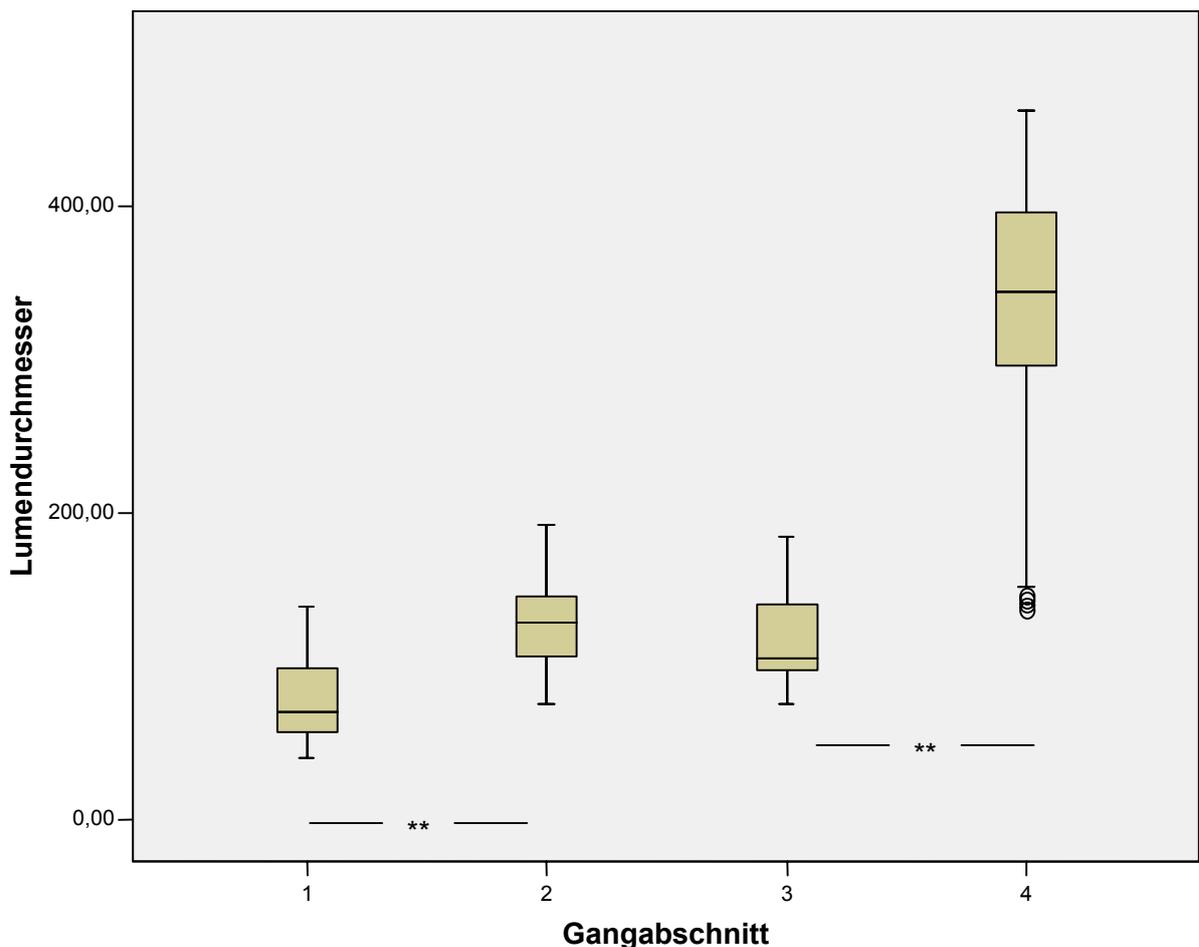


Bild 17: Graphische Darstellung der Lumendurchmesser in μm der einzelnen Gangabschnitten des Nebenhodens

Gangabschnitt 1 = Ductuli efferentes, Gangabschnitt 2 = Initialsegment, Gangabschnitt 3 = Mittelsegment, Gangabschnitt 4 = Terminalsegment

Im Box-Plot-Diagramm ist die Häufigkeitsverteilung der Variablen Lumendurchmesser (inklusive Ausreißer) mit Interquartile (braune Box), Medianwert und der Spannweite der Verteilung angegeben

* Signifikanz der Werte ($p < 0,05$), ** hohe Signifikanz der Werte ($p < 0,01$) berechnet mit dem Mann-Whitney-Test.

4.2 Immunhistochemische Untersuchungen am Nebenhoden des Hundes

4.2.1 Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin

Das Epithel der Ductuli efferentes zeigt keinerlei Reaktion mit dem Vimentinantikörper. Ihre Basallamina und die sie umgebenden Muskelzelllagen reagieren hingegen stark positiv (Bild 18). Die Hauptzellen des Epithels erscheinen über die ganze Länge des Nebenhodenganges immunnegativ. Das Zytoplasma der Basalzellen mancher Tiere reagiert im Initialsegment und zum Teil auch noch im Mittelsegment des Ductus epididymidis positiv (Bild 19). Im Terminalsegment ist keine Immunreaktion erkennbar. Die Basalmembran reagiert in allen drei Segmenten positiv auf den Vimentin-Antikörper (Bild 20), deutlich bis stark positiv im Initialsegment. Außerhalb des Epithels zeigen die Gefäßendothelien und peripheren Nerven in allen drei Segmenten eine stark positive Immunreaktion mit dem Vimentinantikörper (Bild 21). Auch die glatte Ringmuskulatur und das Bindegewebe weisen in allen Segmenten eine deutlich positive Reaktion auf. Zur besseren Darstellung der Kerne wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt.

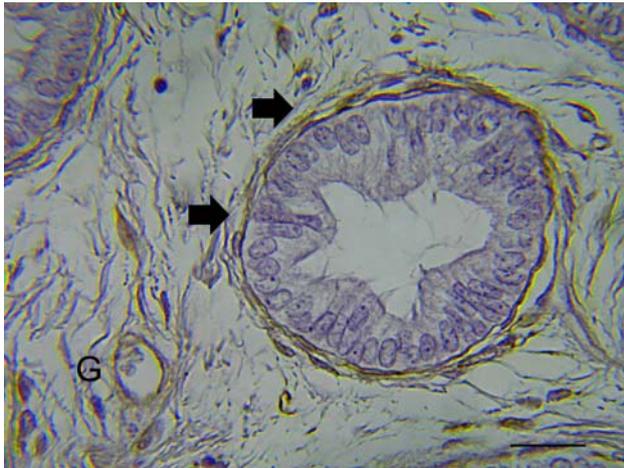


Bild 18: Ductuli efferentes, immunhistochemischer Nachweis von Vimentin, SB = 25 μ m

Muskelzelllage und Basallamina der Ductuli efferentes reagieren deutlich immunpositiv (Pfeil).

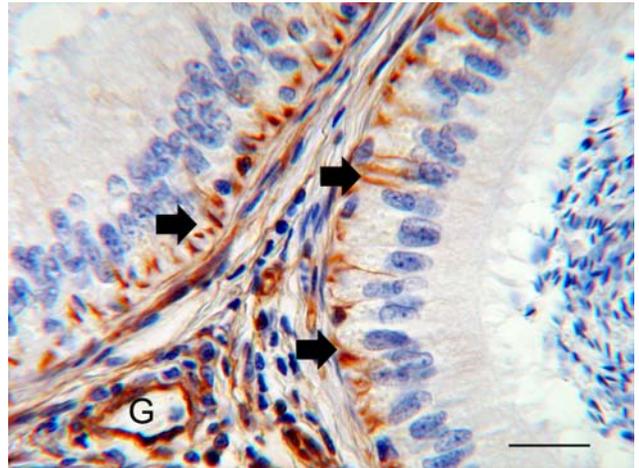


Bild 19: Mittelsegment, immunhistochemischer Nachweis von Vimentin, SB = 25 μ m

Deutlich positive Reaktion des Zytoplasmas der Basalzellen (Pfeil).

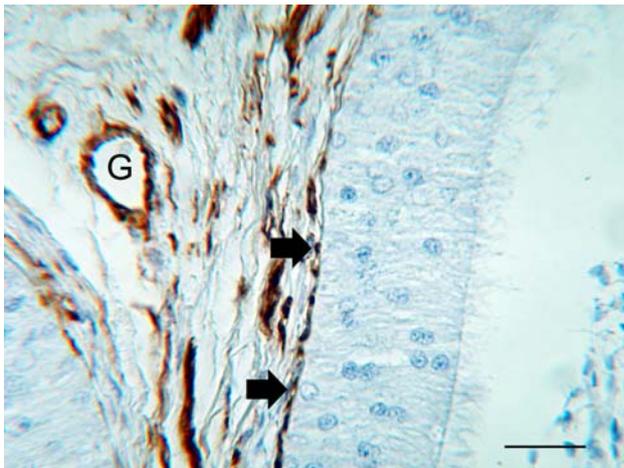


Bild 20: Terminalsegment, immunhistochemischer Nachweis von Vimentin, SB = 25 μ m

Die Basalmembran (Pfeil) reagiert deutlich positiv.

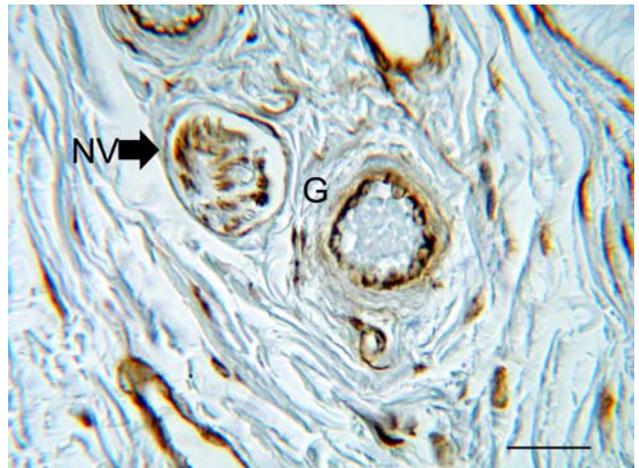


Bild 21: Initialsegment, immunhistochemischer Nachweis von Vimentin, SB = 25 μ m

Positiv reagierender peripherer Nerv (NV). Immunpositives Gefäßendothel (G).

Tab. 9 Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin

Tier	Segment	DE	BZ		HZ			Lumen Spermien	BM	Muskel- zelllage	BGW	G	NV
			ZP	N	SZ	ZP	N						
T1	Initial	X	0	0	0	3	0	0	3	2	2	3	
	Mittel		0	0	0	3	0	0	2	2	3	3	2
	Terminal		0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3
T2	Initial	3	2	0	0	0	0	0	3	2	2	3	3
	Mittel		1	0	0	2	0	0	2	2	3	3	
	Terminal		0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3
T3	Initial	3	2	0	0	0	0	0	3	2	2	3	
	Mittel		2	0	0	2	0	0	2	2	3	3	
	Terminal		0	0	0	0	0	0	2	3	3	3	3
T4	Initial	X	2	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
	Mittel		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	1	2	2	3	
T5	Initial	X	0	0	0	2	0	0	3	2	2	3	
	Mittel		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	3
T6	Initial	2	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	
	Mittel		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T7	Initial	3	3	0	0	0	0	0	3	2	2	3	
	Mittel		1	0	0	0	0	0	1	2	2	3	
	Terminal		0	0	0	0	0	0	1	3	3	3	3
T8	Initial	X	0	0	0	0	0	0	2	2	3	3	
	Mittel		0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	2
	Terminal		0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	3
T9	Initial	3	2	0	0	0	0	0	2	3	3	3	3
	Mittel		0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	3
	Terminal		0	0	0	0	0	0	2	2	2	3	3
T10	Initial	3	0	0	0	0	0	0	2	2	2	3	2
	Mittel		0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2
	Terminal		0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	3

X = nicht erkennbar, 0 = negativ, 1 = schwach positiv, 2 = deutlich positiv, 3 = stark positiv

4.2.2 Immunhistochemischer Nachweis von Laminin

Beim Nachweis von Laminin wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt. Die Bindungsstellen für den Laminin-Antikörper befinden sich hauptsächlich in den Basalmembranen. Die Basalmembranen der Ductuli efferentes zeigen eine stark positive Immunreaktion (Bild 22). Zudem färbt sich deren Zytoplasma im subapikalen Bereich der Zilienzellen unspezifisch an. Die Basalmembran des Epithels reagiert in allen Nebenhodensegmenten deutlich bis stark positiv. In den Basalmembranen der im Bindegewebe liegenden Gefäße und im Perineurium der Nerven sind ebenfalls durchgängig stark positive Reaktionen erkennbar. Die glatten Muskelzellen zeigen in allen Abschnitten eine stark positive Immunreaktion ihrer Basalmembran (Bild 24). Die einzelnen Lagen der Ringmuskulatur heben sich deutlich hervor (Bild 25).

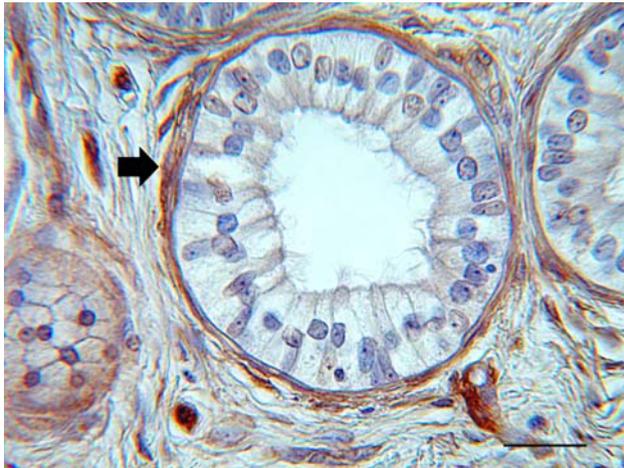


Bild 22: Ductuli efferentes, immunhistochemischer Nachweis von Laminin, SB = 25 μ m

Stark positive Reaktion der Basallamina (Pfeil).



Bild 23: Initialsegment, immunhistochemischer Nachweis von Laminin, SB = 25 μ m

Stark positive Immunreaktion in der Basallamina des Epithels, in den glatten Muskelzellen (Pfeil) und in den Gefäßen (G).

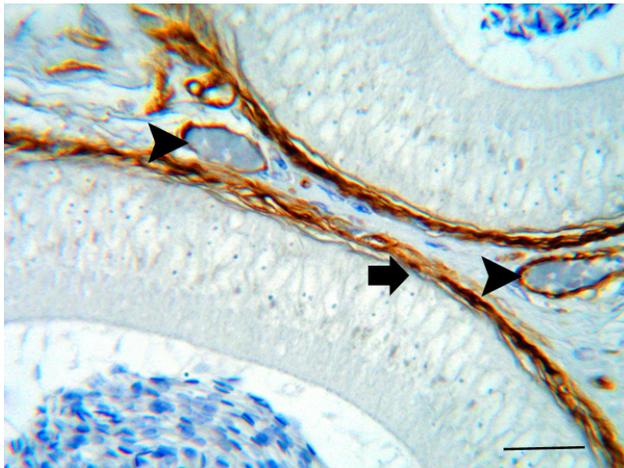


Bild 24: Mittelsegment, immunhistochemischer Nachweis von Laminin, SB = 25 μ m

Positive Reaktion der Muskelzelllagen (Pfeil) und der Gefäße (Pfeilspitze) im Mittelsegment.

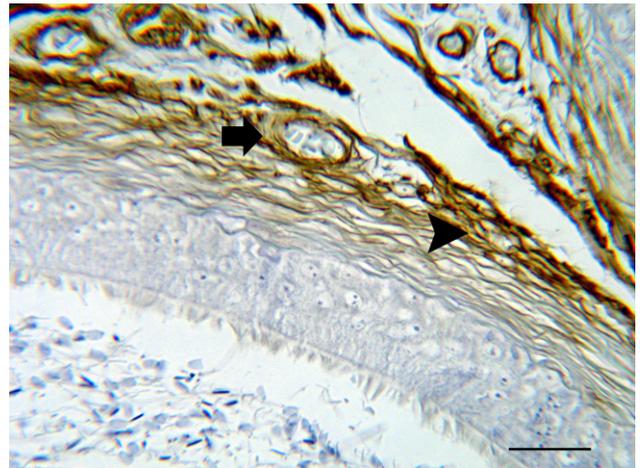


Bild 25: Terminalsegment, immunhistochemischer Nachweis von Laminin, SB = 25 μ m

Positive Reaktion der Basalmembran der Muskelzelllagen (Pfeilspitze) und der Gefäße (Pfeil) im Terminalsegment.

Tab. 10 Immunhistochemischer Nachweis von Laminin

Tier	Segment	DE	BZ		HZ			Lumen Spermien	BM	Muskel- zelllage	BGW	G	NV
			ZP	N	SZ	ZP	N						
T1	Initial	X	0	0	0	0	0	0	3	3	0	3	3
	Mittel		0	0	0	0	0	0	3	3	0	3	3
	Terminal		0	0	0	0	0	0	3	3	0	3	3
T2	Initial	3	0	0	0	0	0	0	3	3	0	3	x
	Mittel		0	0	0	0	0	0	3	3	0	3	3
	Terminal		0	0	0	0	0	0	3	3	0	3	3
T3	Initial	2	0	0	0	0	0	0	2	3	0	3	3
	Mittel		0	0	0	0	0	0	3	3	0	3	3
	Terminal		0	0	0	0	0	0	3	3	0	3	3
T4	Initial	X	0	0	0	0	0	0	2	3	0	3	3
	Mittel		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	3	3	0	3	3
T5	Initial	X	0	0	0	0	0	0	3	3	0	3	3
	Mittel		0	0	0	0	0	0	3	3	0	3	3
	Terminal		0	0	0	0	0	0	2	2	0	2	2
T6	Initial	3	0	0	0	0	0	0	3	3	0	3	3
	Mittel		0	0	0	0	0	0	3	3	0	3	3
	Terminal		0	0	0	0	0	0	2	2	0	2	2
T7	Initial	3	0	0	0	0	0	0	3	3	0	3	3
	Mittel		0	0	0	0	0	0	3	3	0	3	3
	Terminal		0	0	0	0	0	0	3	3	0	3	3
T8	Initial	X	0	0	0	0	0	0	3	3	0	3	3
	Mittel		0	0	0	0	0	0	3	3	0	3	3
	Terminal		0	0	0	0	0	0	3	3	0	3	3
T9	Initial	3	0	0	0	0	0	0	2	3	0	3	3
	Mittel		0	0	0	0	0	0	3	3	0	3	3
	Terminal		0	0	0	0	0	0	3	3	0	3	3
T10	Initial	3	0	0	0	0	0	0	2	3	0	3	3
	Mittel		0	0	0	0	0	0	3	3	0	3	3
	Terminal		0	0	0	0	0	0	3	3	0	3	3

X = nicht erkennbar, 0 = negativ, 1 = schwach positiv, 2 = deutlich positiv, 3 = stark positiv

4.2.3 Immunhistochemischer Nachweis des Östrogen-Rezeptors α (ER α)

Im Epithel des Ductus epididymidis kann der Östrogen-Rezeptor α in keinem Segment nachgewiesen werden. Die Kerne der Ductuli efferentes zeigen dagegen eine stark positive Reaktion, wobei die zilienträgenden und zilienlosen Zellen gleiche Expressionsstärke aufweisen (Bild 26). Auch die im Interstitium liegenden Fibrozyten und die glatten Muskelzellen reagieren schwach bis deutlich positiv (Bild 27).



Bild 26: Ductuli efferentes, immunhistochemischer Nachweis des Östrogen-Rezeptors, SB = 25 μ m

Stark positive Reaktion der Zellkerne (Pfeil).

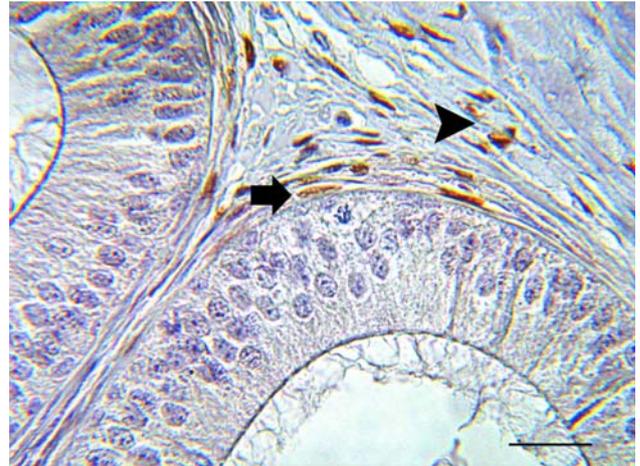


Bild 27: Terminalsegment, immunhistochemischer Nachweis des Östrogen-Rezeptors, SB = 25 μ m

Positive Reaktion der Muskelzellige im Terminalsegment (Pfeil) und der Fibrozyten (Pfeilspitze).

Tab. 11 Immunhistochemischer Nachweis von Östrogen-Rezeptor α (ER α)

Tier	Segment	DE	BZ		HZ			Lumen Spermien	BM	Muskel- zelllage	BGW	G	NV
			ZP	N	SZ	ZP	N						
T1	Initial	X	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0
	Mittel		0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0
T2	Initial	3	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0
	Mittel		0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
T3	Initial	3	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
	Mittel		0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0
T4	Initial	X	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
	Mittel		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
T5	Initial	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mittel		0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
T6	Initial	3	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
	Mittel		0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0
T7	Initial	3	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
	Mittel		0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
T8	Initial	X	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	Mittel		0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
T9	Initial	3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	Mittel		0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0
T10	Initial	3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	Mittel		0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

X = nicht vorhanden, 0 = negativ, 1 = schwach positiv, 2 = deutlich positiv, 3 = stark positiv

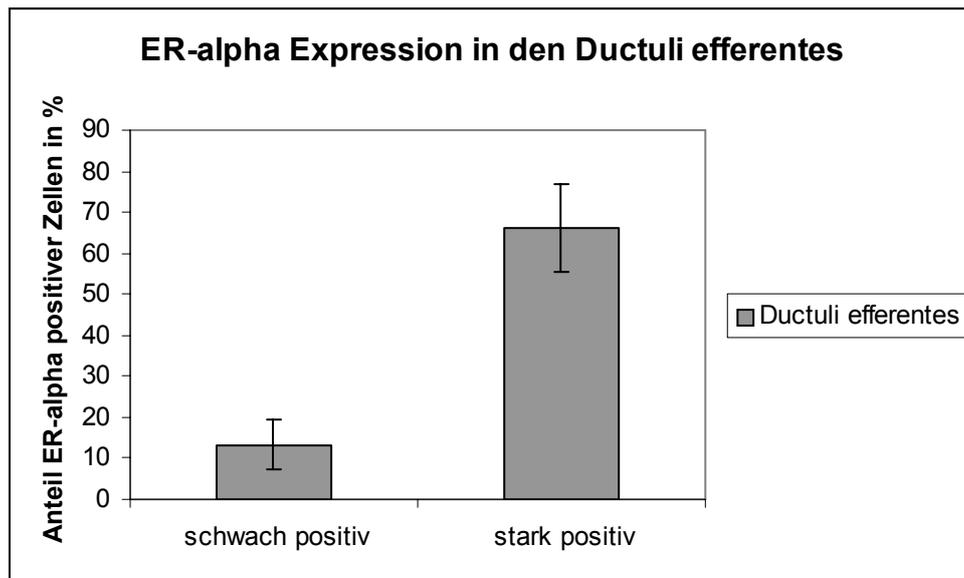


Bild 28: Grafische Darstellung der Anteile ER-alpha schwach und stark positiver Zellen in den Ductuli efferentes des Nebenhodens

4.2.4 Immunhistochemischer Nachweis des Progesteron-Rezeptors

Im Nebenhoden des Hundes lassen sich im Epithel von Initial-, Mittel- und Terminalsegment und in den Ductuli efferentes keine Progesteron-Rezeptoren nachweisen. Einzelne im Interstitium vorkommende Fibrozyten zeigen eine schwach positive Reaktion. Auch intraluminal kommen schwach positive Regionen vor.

4.2.5 Immunhistochemischer Nachweis von „ α -smooth-muscle-actin“ (α -sma)

Die das Epithel umgebende Muskelzellige zeigt im gesamten Verlauf des Nebenhodens eine stark positive Reaktion mit dem Antikörper gegen α -sma. Dadurch lässt sich besonders gut die nach distal deutlich zunehmende Dicke der Muskulatur darstellen (Bild 32). Das Epithel ist immer immunnegativ und hebt sich klar von der Muskelschicht ab. Auch die Tunica media der Gefäße zeigt in allen Gangabschnitten eine unverändert stark positive Immunreaktion (Bild 30). Die Muskelschicht, die die Ductuli efferentes umgibt, zeigt ebenso eine positive Reaktion auf α -sma (Bild 29).

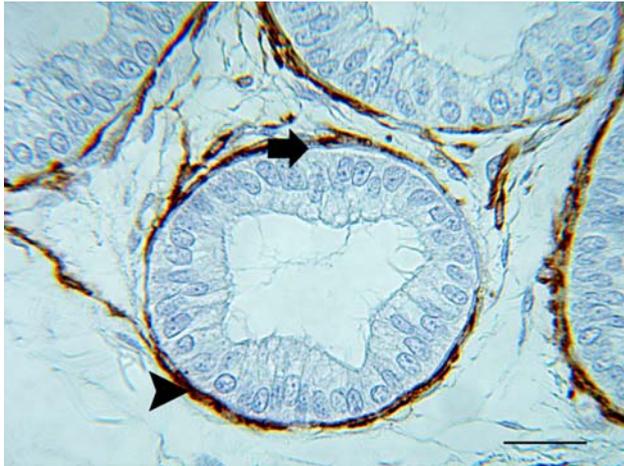


Bild 29: Ductuli efferentes, immunhistochemischer Nachweis von α -sma, SB = 25 μ m

Stark positive Reaktion der Muskelschicht (Pfeilspitze). Die Basallamina bleibt negativ (Pfeil).

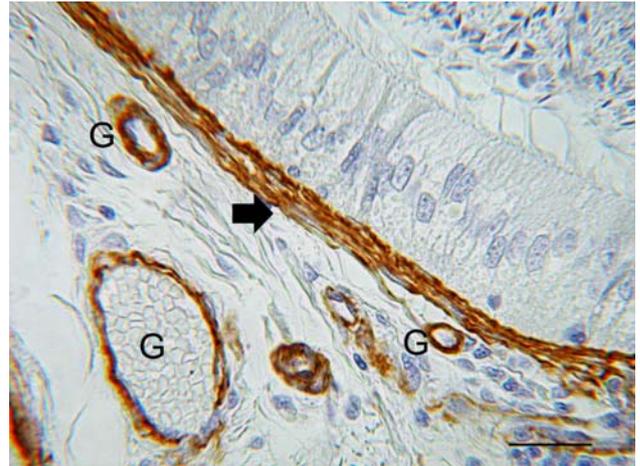


Bild 30: Initialsegment, immunhistochemischer Nachweis von α -sma, SB = 25 μ m

Stark positive Reaktion der Muskelzellschicht (Pfeil) und der Tunica media der Gefäße (G).

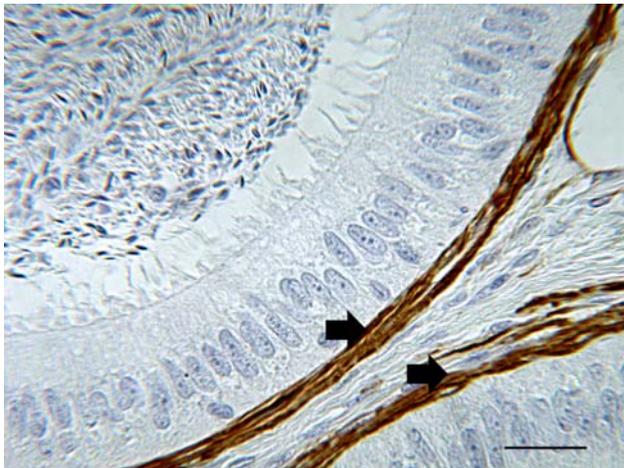


Bild 31: Mittelsegment, immunhistochemischer Nachweis von α -sma, SB = 25 μ m

Stark positive Reaktion der Muskelzelllagen im Mittelsegment.



Bild 32: Terminalsegment, immunhistochemischer Nachweis von α -sma, SB = 10 μ m

Deutliche Zunahme der Muskelzelllagen im Terminalsegment.

Tab. 12 Immunhistochemischer Nachweis von α -sma

Tier	Segment	DE	BZ		HZ			Lumen Spermien	BM	Muskel- zelllage	BGW	G	NV
			ZP	N	SZ	ZP	N						
T1	Initial	X	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
	Mittel		0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
T2	Initial	3	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
	Mittel		0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
T3	Initial	3	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
	Mittel		0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
T4	Initial	X	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
	Mittel		0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
T5	Initial	X	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
	Mittel		0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
T6	Initial	3	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
	Mittel		0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
T7	Initial	3	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
	Mittel		0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
T8	Initial	X	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
	Mittel		0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
T9	Initial	3	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
	Mittel		0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
T10	Initial	3	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
	Mittel		0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0

X = nicht vorhanden, 0 = negativ, 1 = schwach positiv, 2 = deutlich positiv, 3 = stark positiv

4.2.6 Immunhistochemischer Nachweis von Pancytokeratin

Die zilientragenden Epithelzellen der Ductuli efferentes zeigen eine stark positive Immunreaktion im gesamten Zytoplasma (Bild 33). Die Basalzellen des Epithels reagieren in allen drei Gangabschnitten deutlich positiv auf den Antikörper gegen Pancytokeratin (Bild 34). Auch die Hauptzellen des Gangepithels zeigen apikal eine positive Reaktion, jedoch fällt diese schwächer aus als in den Basalzellen. Der apikale Epithelsaum reagiert schwach positiv. Außerhalb des Epithels liegende Strukturen weisen dagegen eine konstant negative Reaktion auf.



Bild 33: Ductuli efferentes, immunhistochemischer Nachweis von Pancytokeratin, SB = 10 μ m

Stark positive Reaktion der Zilienzellen (Pfeil). Zilienlose Zellen reagieren negativ (Pfeilspitze).

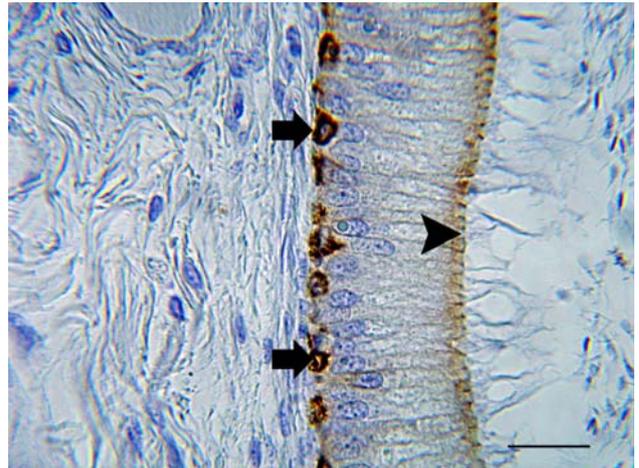


Bild 34: Initialsegment, immunhistochemischer Nachweis von Pancytokeratin, SB = 25 μ m

Stark positive Reaktion der Basalzellen (Pfeil). Der apikale Epithelsaum reagiert schwach positiv (Pfeilspitze).

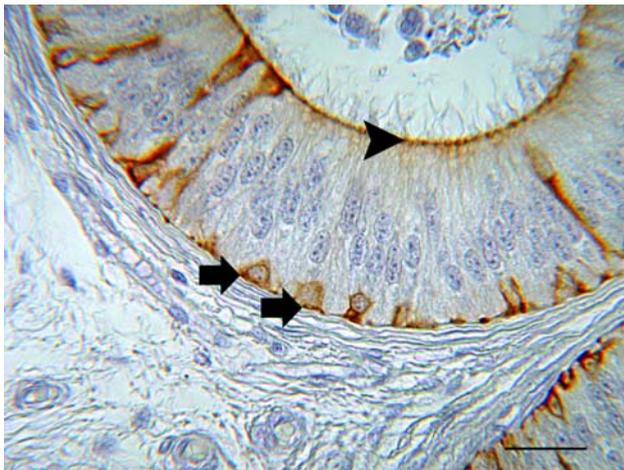


Bild 35: Mittelsegment, immunhistochemischer Nachweis von Pancytokeratin, SB = 25 μ m

Deutlich positive Reaktion der Basalzellen (Pfeil). Positive Reaktion des apikalen Epithelsaums (Pfeilspitze).

Tab. 13 Immunhistochemischer Nachweis von Pancytokeratin

Tier	Segment	DE	BZ		HZ			Lumen Spermien	BM	Muskel- zelllage	BGW	G	NV
			ZP	N	SZ	ZP	N						
T1	Initial		2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
	Mittel		3	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
	Terminal		1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
T2	Initial	3	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
	Mittel		3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
	Terminal		2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
T3	Initial	3	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	Mittel		3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
	Terminal		2	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
T4	Initial		2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	Mittel		2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
	Terminal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T5	Initial		2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	Mittel		2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	Terminal		1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
T6	Initial	2	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	Mittel		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Terminal		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T7	Initial	3	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
	Mittel		3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
	Terminal		3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
T8	Initial		1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	Mittel		2	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
	Terminal		3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
T9	Initial	3	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
	Mittel		2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	Terminal		2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
T10	Initial	3	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	Mittel		2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
	Terminal		1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0

X = nicht vorhanden, 0 = negativ, 1 = schwach positiv, 2 = deutlich positiv, 3 = stark positiv

4.2.7 Immunhistochemischer Nachweis von Chromogranin A

Die Basalkörperchen, die an den zilientragenden Zellen der Ductuli efferentes direkt unter der apikalen Zellmembran gelagert sind, zeigen eine stark positive Reaktion mit dem Antikörper gegen Chromogranin A (Bild 36). Im Initialsegment reagiert das Epithel deutlich positiv auf den Nachweis mit Chromogranin A. Im Bindegewebe liegende freie Zellen und Nervenzellen weisen ebenso eine starke Immunfärbung auf. Auch die Muskelzellschicht und die Muskelschicht der Gefäße zeigen eine schwach positive Färbung auf Chromogranin A. Im Lumen liegende Zellen färben sich deutlich positiv. Im Mittelsegment reagiert das gesamte Epithel konstant deutlich positiv. Die glatte Muskulatur der Gefäße zeigt eine schwach positive Reaktion und auch in der Muskelzellschicht kommen einzelne, stark positiv reagierende Zellen vor. Nervenzellen zeigen wie schon im Initialsegment eine stark positive Reaktion (Bild 39). Im Terminalsegment kann Chromogranin A in der Golgi-Zone und den Stereozilien nachgewiesen werden (Bild 38). Auch das Epithel zeigt eine schwach positive Reaktion. Zudem reagieren im Lumen vorkommende Zellen und einzelne Zellen in der Muskelzellschicht stark positiv.



Bild 36: Ductuli efferentes, immunhistochemischer Nachweis von Chromogranin A, SB = 10 μm
Stark positive Reaktion der Basalkörperchen (Pfeil)

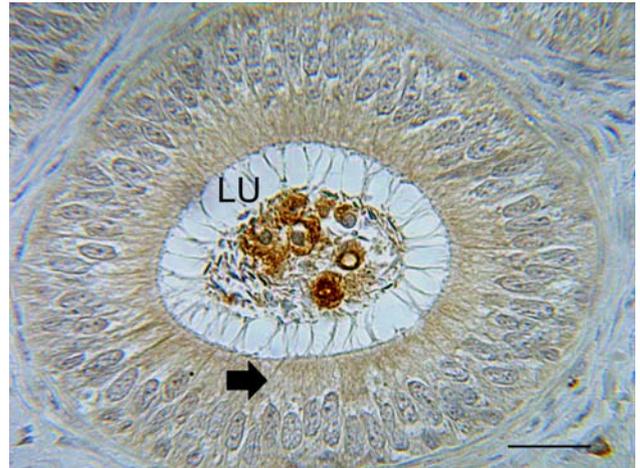


Bild 37: Mittelsegment, immunhistochemischer Nachweis von Chromogranin A, SB = 25 μm
Positive Immunreaktion des Epithels (Pfeil). Stark positive Reaktion im Lumen (LU) liegender Zellen.

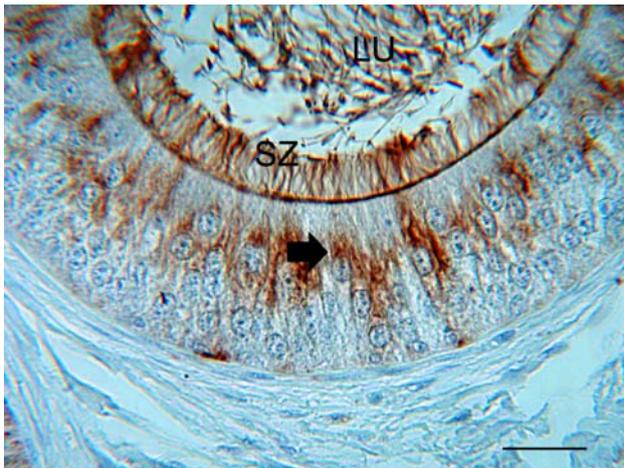


Bild 38: Terminalsegment, immunhistochemischer Nachweis von Chromogranin A, SB = 25 μm
Positive Reaktion in der Golgi-Zone (Pfeil), in den Stereozilien (SZ) und im Lumen (LU).

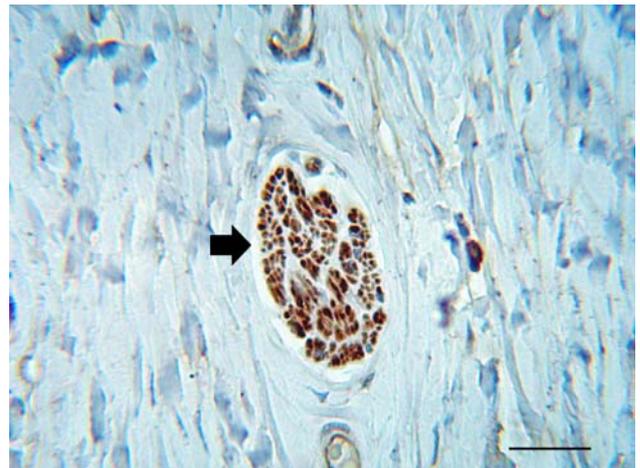


Bild 39: Terminalsegment, immunhistochemischer Nachweis von Chromogranin A, SB = 25 μm
Stark positive Reaktion in Nerven (Pfeil).

Tab. 14 Immunhistochemischer Nachweis von Chromogranin A

Tier	Segment	DE	BZ		HZ			Lumen Spermien	BM	Muskel- zelllage	BGW	G	NV
			ZP	N	SZ	ZP	N						
T1	Initial	X	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
	Mittel	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
	Terminal	X	0	0	3	2	0	2	0	0	1	0	0
T2	Initial	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mittel	X	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	1
	Terminal	X	0	0	3	2	0	2	0	0	1	0	0
T3	Initial	2	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
	Mittel	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Terminal	X	0	0	3	2	0	2	0	0	1	0	0
T4	Initial	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
	Mittel	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Terminal	X	0	0	3	1	0	2	0	0	0	0	1
T5	Initial	X	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	Mittel	X	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	Terminal	X	0	0	3	2	0	2	0	0	0	0	0
T6	Initial	2	0	0	3	1	0	0	0	0	0	1	0
	Mittel	X	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
	Terminal	X	0	0	3	2	0	2	0	0	1	0	1
T7	Initial	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	Mittel	X	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0
	Terminal	X	0	0	3	2	0	2	0	0	1	0	0
T8	Initial	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mittel	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Terminal	X	0	0	3	2	0	2	0	0	0	0	0
T9	Initial	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mittel	X	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	Terminal	X	0	0	3	2	0	2	0	0	1	0	1
T10	Initial	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mittel	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Terminal	X	0	0	0	2	0	2	0	0	1	0	1

X = nicht vorhanden, 0 = negativ, 1 = schwach positiv, 2 = deutlich positiv, 3 = stark positiv

4.2.8 Immunhistochemischer Nachweis des Androgen-Rezeptors

Der Antikörper gegen den Androgen-Rezeptor bindet in allen Segmenten des Nebenhodenganges stark positiv in den Kernen der Hauptzellen (Bild 40, 41 und 42). Auch die Kerne der Basalzellen zeigen eine Immunfärbung an, jedoch ist diese deutlich schwächer als in den Kernen der Hauptzellen. Im Interstitium vorkommende Fibrozyten zeigen in ihren Zellkernen eine schwach bis deutlich positive Reaktion. In den Gefäßen lässt sich immunhistochemisch kein Androgen-Rezeptor nachweisen, die Kerne von Muskelzellen reagieren hingegen schwach positiv. In den Zellkernen der Ductuli efferentes ist eine positive Reaktion auf den Androgen-Rezeptor sowohl in den Zilienzellen als auch in den zilienlosen Zellen erkennbar, diese Reaktion fällt jedoch schwächer aus als die Reaktion in den Hauptzellen des Initialsegmentes. Auch hier wurde zur besseren Darstellung eine Kernfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt.

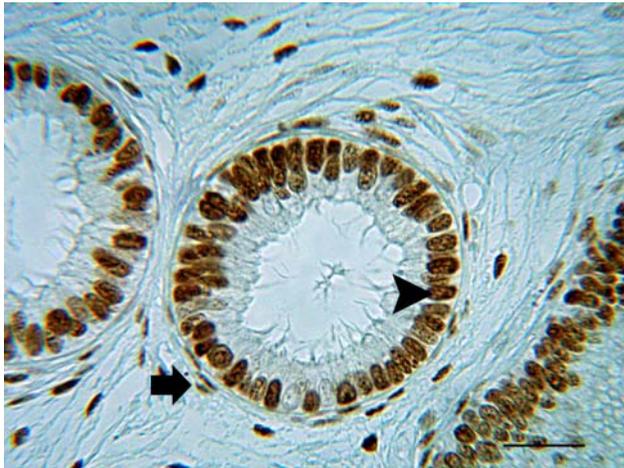


Bild 40: Ductuli efferentes, immunhistochemischer Nachweis des Androgen-Rezeptors, SB = 25 μ m

Stark positive Reaktion der Zellkerne (Pfeilspitze). Positive Reaktion der Zellkerne der Muskelzellen (Pfeil).

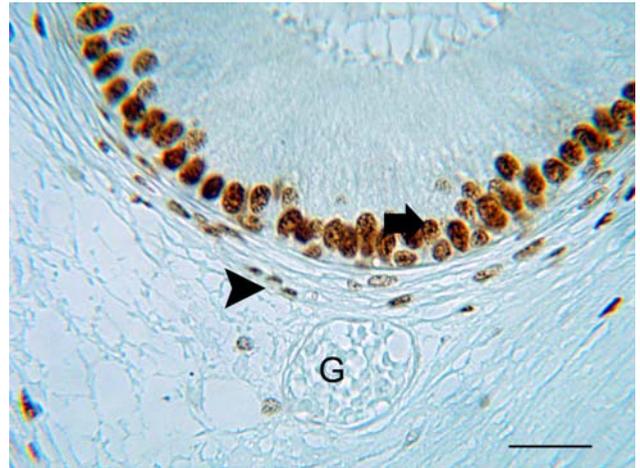


Bild 41: Initialsegment, immunhistochemischer Nachweis des Androgen-Rezeptors, SB = 25 μ m

Stark positive Reaktion der Zellkerne im Initialsegment (Pfeil). Positive Reaktion der Zellkerne der Muskelzellen (Pfeilspitze), G = Gefäß.

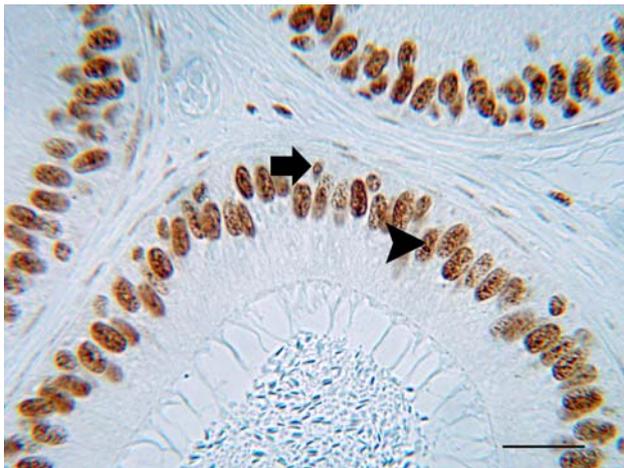


Bild 42: Mittelsegment, immunhistochemischer Nachweis des Androgen-Rezeptors, SB = 25 μ m

Kerne von Basalzellen (Pfeil) und Hauptzellen (Pfeilspitze) reagieren positiv.

Tab. 15 Immunhistochemischer Nachweis des Androgen-Rezeptors

Tier	Segment	DE	BZ		HZ			Lumen Spermien	BM	Muskel- zelllage	BGW	G	NV
			ZP	N	SZ	ZP	N						
T1	Initial	X	0	1	0	0	3	0	0	1	2	0	0
	Mittel		0	0	0	0	3	2	0	1	2	0	0
	Terminal		0	1	0	0	3	1	0	2	2	0	0
T2	Initial	2	0	0	0	0	3	0	0	1	2	0	0
	Mittel		0	1	0	0	3	0	0	1	1	0	0
	Terminal		0	1	0	0	3	1	0	1	1	0	0
T3	Initial	2	0	1	0	0	3	0	0	1	2	0	0
	Mittel		0	1	0	0	3	0	0	1	1	0	0
	Terminal		0	1	0	0	3	0	0	1	2	0	0
T4	Initial	X	0	1	0	0	3	0	0	1	2	0	0
	Mittel		0	1	0	0	3	0	0	1	1	0	0
	Terminal		0	1	0	0	3	0	0	1	1	0	0
T5	Initial	X	0	1	0	0	3	0	0	1	2	0	0
	Mittel		0	1	0	0	3	0	0	1	1	0	0
	Terminal		0	1	0	0	3	0	0	1	2	0	0
T6	Initial	2	0	1	0	0	3	0	0	1	2	0	0
	Mittel		0	1	0	0	3	0	0	1	1	0	0
	Terminal		0	1	0	0	3	0	0	1	1	0	0
T7	Initial	2	0	1	0	0	3	0	0	1	2	0	0
	Mittel		0	1	0	0	3	0	0	1	2	0	0
	Terminal		0	1	0	0	3	0	0	1	2	0	0
T8	Initial	X	0	1	0	0	3	0	0	1	2	0	0
	Mittel		0	1	0	0	2	0	0	1	1	0	0
	Terminal		0	1	0	0	3	0	0	1	1	0	0
T9	Initial	2	0	1	0	0	3	0	0	1	2	0	0
	Mittel		0	1	0	0	2	0	0	1	1	0	0
	Terminal		0	1	0	0	3	0	0	2	2	0	0
T10	Initial	2	0	1	0	0	3	0	0	1	2	0	0
	Mittel		0	1	0	0	3	0	0	1	2	0	0
	Terminal		0	1	0	0	3	0	0	1	2	0	0

X = nicht vorhanden, 0 = negativ, 1 = schwach positiv, 2 = deutlich positiv, 3 = stark positiv

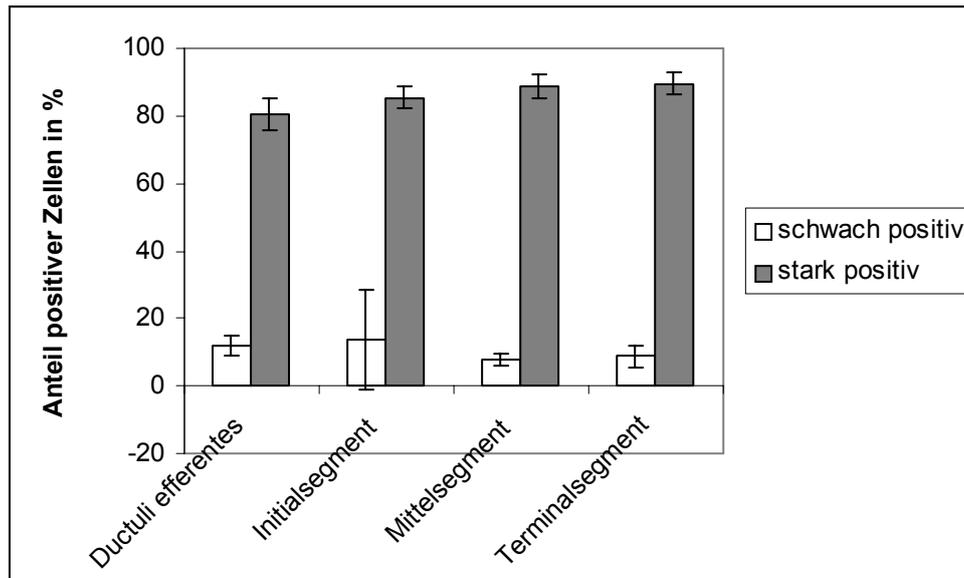


Bild 43: Grafische Darstellung der Expressionsstärke des Androgen-Rezeptors in den verschiedenen Segmenten des Nebenhodens

4.3 Glykohochemische Untersuchungen am Nebenhoden des Hundes

4.3.1 Bindungsstellen für *Canavalia ensiformis* Agglutinin (Con A)

Sowohl die Zilienzellen als auch die zilienlosen Zellen der Ductuli efferentes gehen eine deutlich positive Con A-Bindung ein. Im basalen Zytoplasmabereich kommen zahlreiche stark positive Granula vor. Auch die Kinozilien der Zellen reagieren stark positiv mit Con A. Die Basalzellen und Hauptzellen des Nebenhodenepithels weisen in allen drei Segmenten Bindungsstellen mit Con A auf, jedoch ist die Reaktion im Zytoplasma der Basalzellen stärker positiv (Bild 50). Im Lumen vorhandene Spermien reagieren deutlich bis stark positiv. Bindegewebe, Muskelzellige und Gefäße weisen keine Bindung mit Con A auf.

4.3.2 Bindungsstellen für *Pisum sativum* Agglutinin (PSA)

Der apikale Epithelsaum der Ductuli efferentes zeigt eine schwach positive Reaktion. Das Epithel reagiert weiter basal an manchen Stellen schwach positiv. Im Initialsegment ist eine stark positive Reaktion an der apikalen Oberfläche des Epithels zu erkennen. Auch die Stereozilien weisen in diesem Segment eine deutlich positive Reaktion auf. Im Mittelsegment zeigen die Stereozilien eine schwach positive Reaktion. Hier sind zudem im Basalbereich kleine, stark positiv reagierende Strukturen zu sehen. Im Terminalsegment reagieren die Stereozilien und im Lumen vorhandene Spermien deutlich positiv. Die supranukleäre Golgi-Zone hebt sich stark positiv hervor (Bild 51).

4.3.3 Bindungsstellen für *Ulex europaeus* Agglutinin (UEA)

In den Ductuli efferentes ergibt sich ein charakteristisches Reaktionsmuster: das Epithel der zilientragenden Zellen beinhaltet stark positive Granula, die im gesamten Zytoplasma verstreut liegen und sich in die Kinozilien fortsetzen. Auch der Basalbereich dieser Zellen reagiert stark positiv (Bild 46). Die Zellen mit Mikrovillibesatz weisen keine UEA-Bindungsstellen auf. Im Initialsegment des Ductus epididymidis fallen apikal positive Granula auf. Mittel- und Terminalsegment zeigen keine Bindungsstellen für UEA in ihrem Epithel. Lediglich die im Interstitium liegenden Gefäße reagieren schwach positiv.

4.3.4 Bindungsstellen für *Triticum vulgare* Agglutinin (WGA)

WGA-Bindungsstellen treten in den Ductuli efferentes als stark positiver Epithelsaum in Erscheinung. Auch das Zytoplasma reagiert, vor allem im basalen Bereich, schwach positiv. Die Stereozilien reagieren in allen drei Segmenten stark positiv. Auch die Spermien zeigen eine stark positive Reaktion. Im Initialsegment weisen die apikale Epitheloberfläche und die

Golgi-Zone der Hauptzellen eine stark positive Reaktion mit WGA auf. Zudem erscheinen die Zellmembranen schwach positiv (Bild 44). Im Mittelsegment kommen schwach positive Strukturen im basalen Zytoplasmabereich vor; im Terminalsegment fallen viele stark positive Granula im Zytoplasma der Hauptzellen auf, die hauptsächlich um den Zellkern lokalisiert sind. Zudem ist hier die supranukleäre Golgi-Zone stark positiv.

4.3.5 Bindungsstellen für *Triticum vulgare* Agglutinin (succinyliert) (WGAs)

Im Epithel der Ductuli efferentes zeigen sich die Bindungsstellen für WGAs in einem stark positiv reagierenden apikalen Saum und deutlich positiven Kinozilien. Zudem kommen schwach positive basale Zytoplasmabereiche vor. Auch im Initialsegment zeigen die Stereozilien eine stark positive Reaktion ebenso wie der apikale Epithelsaum. Stark positiv reagiert in diesem Segment auch die Golgi-Zone der Hauptzellen. Zudem fallen viele stark positiv reagierende Granula auf, die deutlich apikal lokalisiert sind (Bild 45). Weiter ist eine schwach positive Reaktion an den Zellmembranen der Hauptzellen und im Basalbereich erkennbar. Im Mittelsegment reagieren ausschließlich im Lumen anzutreffende Spermien stark positiv. Im Terminalsegment findet sich eine deutlich positive Reaktion der Stereozilien und der Basalmembranen.

4.3.6 Bindungsstellen für *Lens culinaris* Agglutinin (LCA)

In den Ductuli efferentes reagiert der apikale Epithelsaum stark positiv. Das Zytoplasma der Zilienzellen ist schwach positiv, das der zilienlosen Zellen mit Mikrovillibusatz negativ. Der apikale Epithelsaum und die Stereozilien reagieren auch im Initial- und im Mittelsegment des Nebenhodens. Im Initialsegment erscheinen die Muskelzelllagen schwach positiv. Zudem fallen im Mittelsegment kleine, deutlich positiv reagierende punktförmige Strukturen auf, die um den Zellkern lokalisiert sind. Deutlicher ist die Bindung von LCA im Terminalsegment. Hier reagiert die Golgi-Zone stark positiv, ebenso die Stereozilien und basale Zytoplasmaanteile. Es kommen viele stark positive Granula im gesamten Epithel vor (Bild 47).

4.3.7 Bindungsstellen für *Phaseolus vulgaris* E Agglutinin (PHA E)

Die Ductuli efferentes weisen im apikalen Bereich des Epithels Bindungsstellen für PHA E auf. Zudem kommen nahe der Basalmembran stark positive Granula vor. Das Zytoplasma ist ansonsten nur schwach positiv. Im Initialsegment zeigen der apikale Epithelsaum und die Stereozilien eine deutlich positive Reaktion. Das Zytoplasma der Hauptzellen reagiert im apikalen Teil schwach positiv. In der apikalen Epithelzone fallen deutlich positive kleine

Granula auf (Bild 48). Im Mittelsegment reagieren die Stereozilien und die basalen Zytoplasmaanteile der Hauptzellen deutlich positiv. Die Golgi-Zone und das Zytoplasma der Basalzellen heben sich schwach positiv hervor. Im Terminalsegment weisen im Lumen vorhandene Spermien und basale Zytoplasmaanteile eine deutlich positive Reaktion auf.

4.3.8 Bindungsstellen für *Phaseolus vulgaris* L Agglutinin (PHA L)

In den Ductuli efferentes führt PHA L zu einer deutlich positiven Reaktion mit dem apikalen Epithelsaum, das übrige Epithel reagiert nur schwach. Im Initialsegment reagieren die Stereozilien und der apikale Epithelsaum stark positiv. Zudem fallen im apikalen Epithelbereich viele stark positiv reagierende Granula und eine deutlich positive Golgi-Zone auf (Bild 49). Im Mittelsegment stellt sich das Zytoplasma schwach positiv dar. Im Terminalsegment nimmt die Reaktion ab, es weisen nur noch die Spermien Bindungsstellen für PHA L auf. Das umgebende Bindegewebe ist im Mittel- und Terminalsegment schwach positiv.

4.3.9 Bindungsstellen für *Dolichos biflorus* Agglutinin (DBA)

Der apikale Bereich des Ductusepithels reagiert schwach positiv. Im Initialsegment erscheinen die Golgi-Zone und die Zellmembranen schwach positiv (Bild 54). Die Golgi-Zone und vereinzelte basale Zellbereiche des Mittelsegments verhalten sich identisch. Das Zytoplasma mancher Hauptzellen im Terminalsegment reagiert deutlich positiv. Bei diesen Zellen zeigen dann auch der apikale Epithelsaum und die Stereozilien eine positive Reaktion.

4.3.10 Bindungsstellen für *Griffonia simplicifolia* I Agglutinin (GSL I)

In den Ductuli efferentes lassen sich Bindungsstellen für GSL I im apikalen Epithelbereich und in den Spermien nachweisen (Bild 55). Das Epithel von Initial- und Mittelsegment zeigt dagegen keine Bindungsstellen für GSL I. Im Initialsegment kommen lediglich einzelne, schwach positiv reagierende Zellen in der Muskelschicht vor. Im Terminalsegment erscheinen im apikalen Epithelteil und auch im Lumen in der epithelnahen Zone deutlich positiv reagierende kleine Granula. Die Golgi-Zone reagiert deutlich positiv.

4.3.11 Bindungsstellen für *Ricinus communis* Agglutinin (RCA)

In den Ductuli efferentes reagieren der apikale Epithelsaum und im Lumen vorhandene Spermien deutlich positiv, auch das umgebende Bindegewebe reagiert nur schwach positiv

(Bild 53). Im Initial- und Mittelsegment zeigen sich lediglich die Spermien schwach positiv. Im Terminalsegment kommt eine positive Reaktion der Golgi-Zone hinzu.

4.3.12 Bindungsstellen für *Glycine max* Agglutinin (SBA)

Die Ductuli efferentes reagieren im apikalen Epithelbereich stark positiv. Im Ductus epididymidis ist keine Bindung von SBA-FITC erkennbar.

4.3.13 Bindungsstellen für *Saphora japonica* Agglutinin (SJA)

Auch hier reagiert der apikale Epithelsaum des Ductusepithels deutlich positiv. Im Initialsegment zeigen die Stereozilien und das Zytoplasma der Hauptzellen eine schwach positive Reaktion mit SJA und es kommen kleine positive Granula im Epithel vor. Mittel- und Terminalsegment weisen dagegen keine Bindungsstellen für SJA auf.

4.3.14 Bindungsstellen für *Arachis hypogaea* Agglutinin (PNA)

In den Ductuli efferentes zeigen Strukturen im apikalen Bereich des Epithels und im Lumen vorhandene Spermien eine deutlich positive Reaktion (Bild 52). Im Initialsegment reagieren zudem die Stereozilien deutlich positiv und im apikalen Epithelanteil unterhalb des Saumes kommen viele stark positive kleine Granula vor. Im Mittelsegment nimmt die Reaktion ab und es weisen nur noch die im Lumen vorhandenen Spermien Bindungsstellen für PNA auf. Im Terminalsegment reagiert zudem die Golgi-Zone schwach positiv.

Tab. 16 Verteilung der Bindungsstellen von FITC-markierten Lektinen in den Ductuli efferentes des Nebenhoden des Hundes

Lektin	Epithel		Kinozilien	Apikaler Epithelbereich	Lumen Spermien	Basal-membran	Muskel-schicht	Binde-gewebe
	+/++	+/+++						
Con A	+/++	+/+++	+	-	-	-	-	-
PSA	-/+		-	-	-	-	-	-
UEA	++	-	-	++	-	-	-	-
WGA	-/+		-	++	-	-	-	-
WGAs	-/+		+	++	-	-	-	-
LCA	-/+		-/+	++	-	-	-	-
PHA E	-/+		-	++	-	-	-	-
PHA L	-/+		-	+	-	-	-	-
DBA	-		-	++	-	-	-	-
GSL I	-		-	++	+	-	-	-
RCA	-		-	+	+	-	-	-/+
SBA	-		-	++	-	-	-	-
SJA	-		-	+	-	-	-	-
PNA	-		-/+	++	-	-	-	-

- negativ, -/+ schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv

Tab. 17 Übersicht über die Bindungsstellen von Lektinen im Ductus epididymidis des Hundes

Lektin	Segment	Apikaler Saum	BZ	HZ			Lumen Spermien	Basalmembran	Muskelzellige	BGW	G	Granula
				SZ	ZP	GZ						
Con A	Initial	+	++	+	+	-/+	+		-	-	-	
	Mittel	-/+	++	+	+	+	+	-	-	-	-	
	Terminal	-/+	++	+	+	-/+	++	-	-	-	-	
PSA	Initial	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
	Mittel	-	+	-/+	-	-/+	-	-	-	-	-	Basal
	Terminal	-	+	+	-	++	+	-	-	-	-	
UEA	Initial	++	-	++	++	++	+	-	-	-	-	Apikal +
	Mittel	-	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-
	Terminal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WGA	Initial	++	-	++	-/+	++		-/+	-	-	-	Apikal ++
	Mittel	-	-	++	+	-	++	-	-	-	-	-
	Terminal	+	-	++	-	++	++	-	-	-	-	ZP ++
WGA s	Initial	++	-	++	-/+	++	++	-	-	-	-	Apikal ++
	Mittel	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
	Terminal	-	-	+	-	-	++	+	-	-	-	-
LCA	Initial	++	-	+	-	-	-	-	-/+	-	-	
	Mittel	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ZP +
	Terminal	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	ZP ++
PHA E	Initial	++	-	++	-/+	-	-	-	-	-	-	Apikal ++
	Mittel	-/+	+	+	+	-/+	-	-	-	-	-	
	Terminal	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	
PHA L	Initial	++	-	++	+	+	-	-	-	-	-	Apikal ++
	Mittel	-	-/+	-/+	-/+	-	-	-	-	-/+	-	-
	Terminal	-	-/+	-/+	-	-	++	-	-	-/+	-	-
DBA	Initial	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-	-
	Mittel	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-	-

	Terminal	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
GSL I	Initial	-	-	-	-	-	-	-	-/+	-	-	-
	Mittel	-	-	-	-	-	-/+	-	-/+	-	-	-
	Terminal	-	-	-/+	-	+	-	-	-	-	-	ZP/L ++
RCA	Initial	-	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-
	Mittel	-	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-
	Terminal	-	-	-	-	-/+	-/+	-	-	-/+	-	-
SBA	Initial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mittel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Terminal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SJA	Initial	-	-	-/+	-/+	-	-	-	-	-	-	ZP +
	Mittel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Terminal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PNA	Initial	+	-	+	-	-	++	-	-	-	-	ZP ++
	Mittel	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
	Terminal	-	-	-/+	-	-/+	++	-	-	-	-	-

- negativ, -/+ schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv

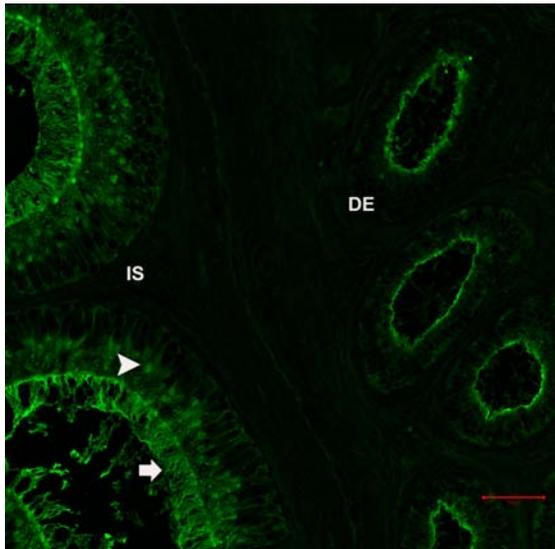


Bild 44: WGA-Bindung in den Ductuli efferentes und im Initialsegment. SB = 50 μ m

In den Ductuli efferentes (DE) weist der apikale Epithelsaum eine stark positive Reaktion mit WGA auf. Im Initialsegment (IS) reagieren die Stereozilien (Pfeil) und die Golgi-Zone (Pfeilspitze) stark positiv.

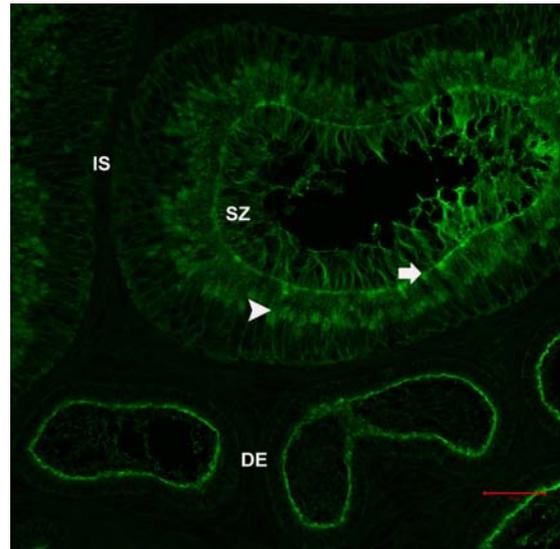


Bild 45: WGAs-Bindung in den Ductuli efferentes und im Initialsegment. SB = 50 μ m

Die Ductuli efferentes (DE) haben im Apikalbereich Bindungsstellen für WGAs. Im Initialsegment (IS) bindet WGA im Bereich des Golgi-Apparates (Pfeilspitze), in den Stereozilien (SZ) und am Epithelsaum (Pfeil).

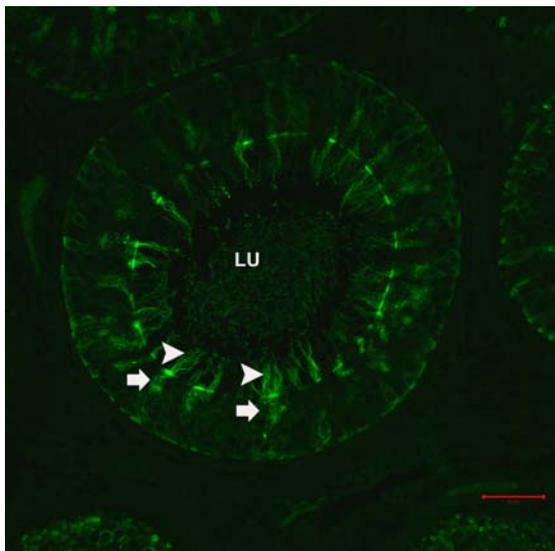


Bild 46: UEA-Bindung in den Ductuli efferentes. SB = 50 μ m

Im apikalen Zytoplasmabereich (Pfeil) der Zilienzellen zeigt sich eine stark positive Reaktion mit UEA, die sich in die Kinozilien (Pfeilspitze) fortsetzt. LU = Lumen

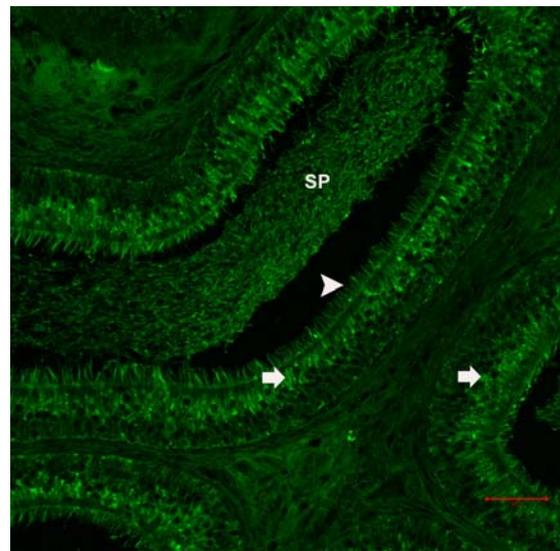


Bild 47: LCA-Bindung im Terminalsegment. SB = 50 μ m

Die Golgi-Zone (Pfeil), die Stereozilien (Pfeilspitze) und im Lumen vorhandene Spermien (SP) weisen Bindungsstellen für LCA auf.

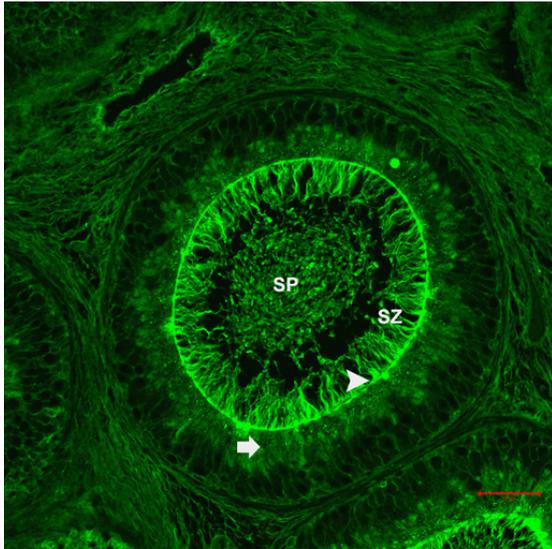


Bild 48: PHA E-Bindung im Initialsegment.
SB = 50 μ m

Der apikale Epithelbereich (Pfeilspitze), die Stereozilien (SZ) und im Lumen vorhandene Spermien (SP) reagieren stark positiv. Auch im apikalen Zytoplasmabereich (Pfeil) fallen deutlich positive Strukturen auf.

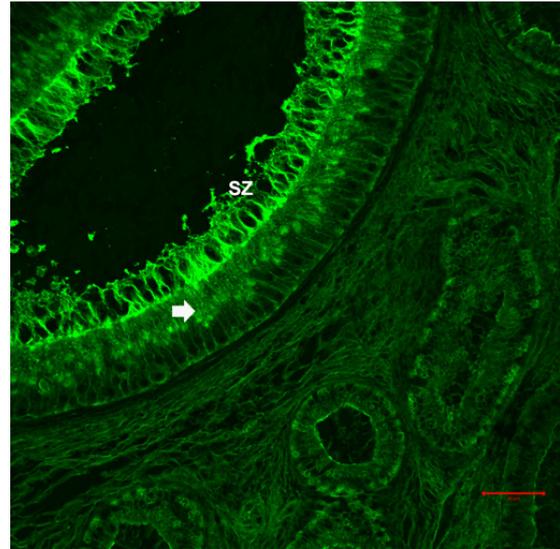


Bild 49: PHA L-Bindung im Initialsegment.
SB = 50 μ m

Im Initialsegment reagieren die Golgi-Zone (Pfeil) und die Stereozilien (SZ) stark positiv.

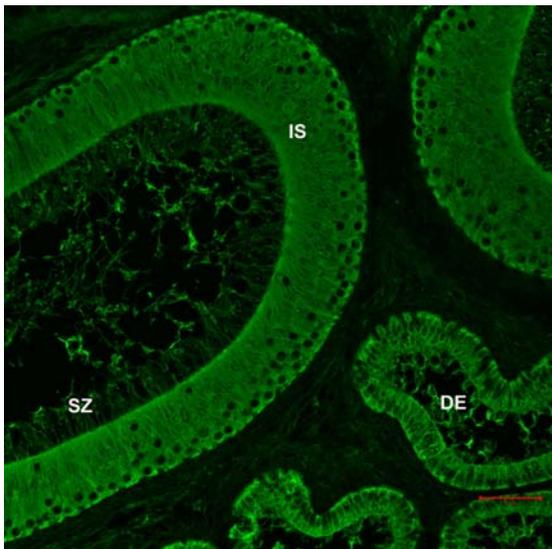


Bild 50: Con A-Bindung im Initialsegment.
SB = 50 μ m

Das gesamte Epithel des Initialsegmentes (IS) und der Ductuli efferentes (DE) weist Bindungsstellen für Con A auf. SZ = Stereozilien

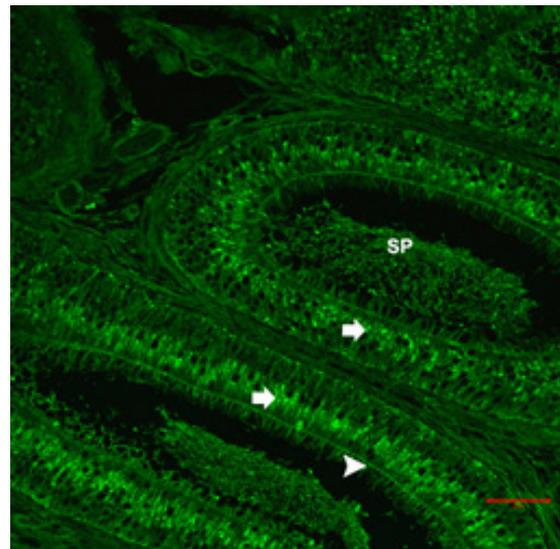


Bild 51: PSA-Bindung im Terminalsegment.
SB = 50 μ m

Die Golgi-Zone (Pfeil) des Terminalsegmentes reagiert stark positiv. Auch der apikale Epithelsaum (Pfeilspitze) und intraluminale Spermien (SP) sind deutlich positiv.

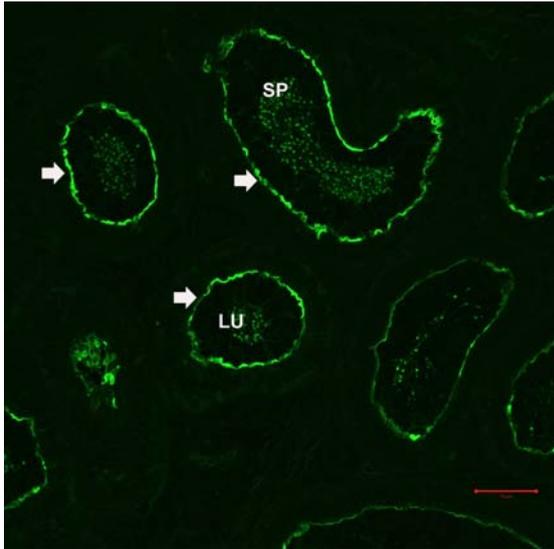


Bild 52: PNA-Bindung in den Ductuli efferentes. SB = 50 μ m

In den Ductuli efferentes zeigen der apikale Epithelbereich (Pfeil) und im Lumen (LU) vorhandene Spermien (SP) eine positive Reaktion.

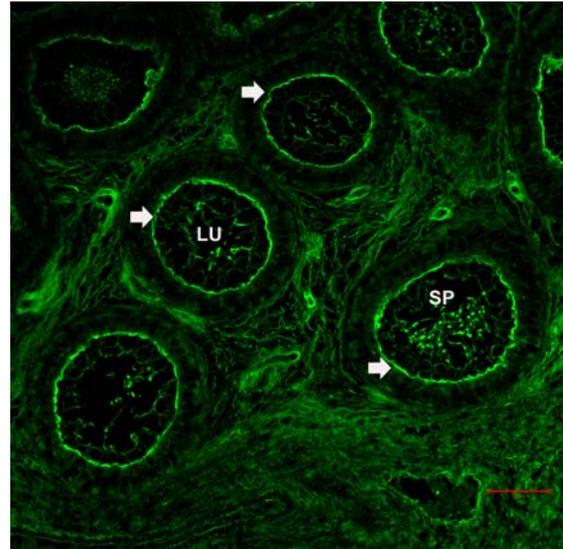


Bild 53: RCA-Bindung in den Ductuli efferentes. SB = 50 μ m

Der apikale Epithelsaum (Pfeil) und Spermien (SP) reagieren deutlich positiv. Auch das umgebende Interstitium weist Bindungsstellen für RCA auf.

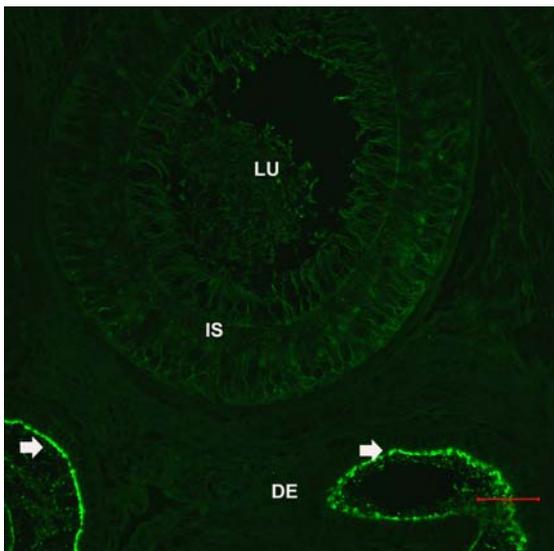


Bild 54: DBA-Bindung in den Ductuli efferentes. SB = 50 μ m

Der apikale Epithelbereich (Pfeil) der Ductuli efferentes (DE) reagiert stark positiv. Im Initialsegment (IS) zeigt sich eine schwach positive Reaktion der Golgi-Zone. LU = Lumen

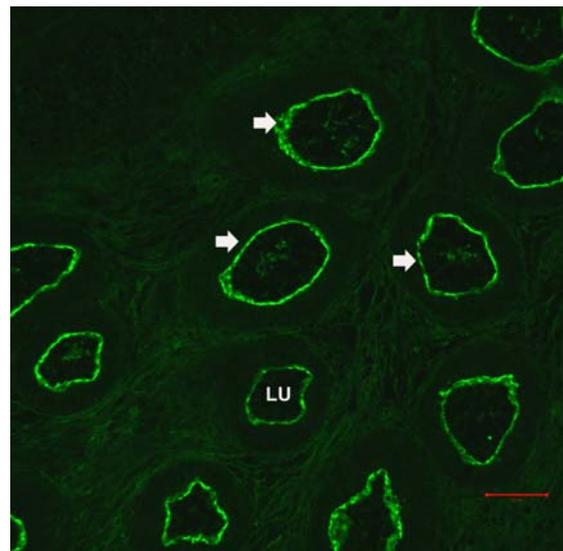


Bild 55: GSL I-Bindung in den Ductuli efferentes. SB = 50 μ m

In den Ductuli efferentes weist die apikale Epithelzone (Pfeil) Bindungsstellen für GSL I auf. LU = Lumen

4.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Nebenhoden des Hundes

4.4.1 Ultrastruktur der Ductuli efferentes testis

Die Ductuli efferentes testis stellen die Verbindung des Rete testis des Hodens mit dem Ductus epididymidis des Nebenhodens her. Das unterschiedlich hohe, mehrreihige Epithel der Ductuli efferentes ist mit nur $19,0 \mu\text{m}$ ($\pm 2,8 \mu\text{m}$) deutlich niedriger als das des folgenden Initialsegmentes ($36,9 \mu\text{m}$ $\pm 13,9 \mu\text{m}$). Es besteht aus zwei unterschiedlichen Zellarten: Zilienzellen, deren Oberfläche mit Kinozilien ausgestattet ist und zilienlose Zellen, die einen Mikrovilli-Besatz tragen (Bild 41). Die zilienlosen Zellen zeigen unterschiedliche Erscheinungsmuster und können in drei Subtypen unterteilt werden (Bild 40). Typ I-Zellen enthalten weder Granula noch Vakuolen in ihrem Zytoplasma. Typ II der zilienlosen Zellen enthält in seinem Zytoplasma zahlreiche, stark elektronendichte Granula im supranukleären Bereich. Der Zellkern dieser Zellart ist deutlich kleiner als der der Typ III-Zellen, erscheint weniger gelappt und ist im basalen Zelldrittel lokalisiert (Bild 43). Auch kommen weniger Mitochondrien vor. An ihrer lumenseitigen Oberfläche besitzen sie denselben Mikrovilli-Besatz. Zahlreiche, zum Teil sich ins Lumen öffnende, kleine Bläschen im apikalen Zytoplasmabereich weisen auf Mikropinozytose hin (Bild 42). Sporadisch kommen kurze Zisternen von rauem endoplasmatischem Retikulum vor. Typ III enthält viele große, helle Vakuolen. Sie sind supranukleär lokalisiert und füllen nahezu das gesamte Zytoplasma aus. Die lumenseitige Oberfläche besitzt den charakteristischen Bürstensaumbesatz. Im apikalen Epithelbereich fallen viele kleine Bläschen auf, die auf aktive Mikropinozytosevorgänge hinweisen. Zudem kommen im apikalen Zytoplasmabereich längliche Mitochondrien vor. Der Zellkern dieses Zelltyps ist mäßig elektronendicht und weist deutliche Einkerbungen auf. Er enthält zahlreiche kleine Nukleoli. Der Golgi-Apparat ist wenig entwickelt und es kommt wenig endoplasmatisches Retikulum vor. Regelmäßig kommt im Zytoplasma aller Zelltypen eingelagertes Glykogen vor, das sich als stark elektronendichte Granula darstellt (Bild 44).

Die Zilienzellen der Ductuli efferentes testis können von den zilienlosen Zellen durch den Kinozilienbesatz auf ihrer Oberfläche und ihren mehr apikal lokalisierten Zellkern unterschieden werden. Der Zellkern ist zudem elektronendichter als der der zilienlosen Zellen. Unter der apikalen Zellmembran liegen Basalkörperchen. Die Zilienzellen haben im apikalen Zytoplasmabereich zahlreiche längliche Mitochondrien, diese kommen in geringerer Anzahl auch basal vor. Der kleine Golgi-Apparat liegt in Zellkernnähe, das endoplasmatische Retikulum ist unauffällig.

Die Basalmembran verläuft dünn und gleichmäßig. Darauf folgt eine Schicht lockeren Bindegewebes und peripher das Interstitium mit glatten Muskelzellen, Gefäßen und Nerven.

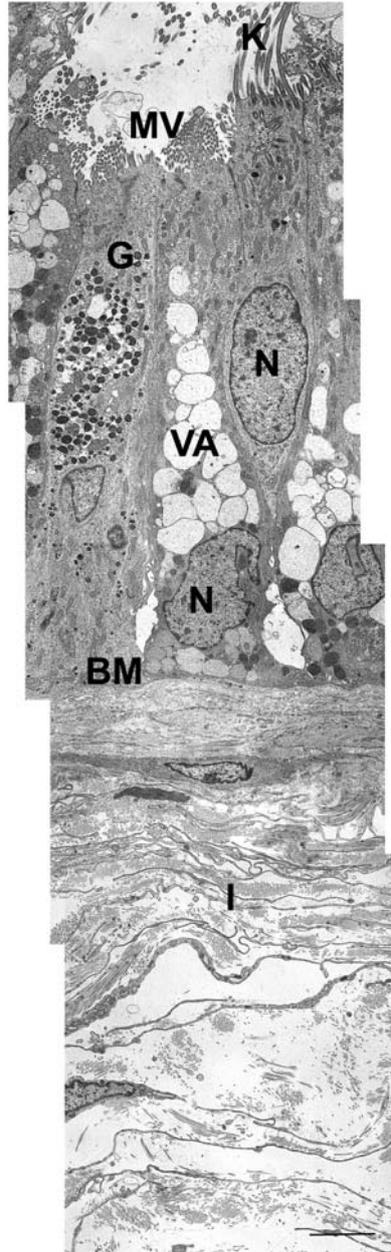


Bild 56: Übersicht über das mehrreihige Epithel der Ductuli efferentes. SB = 3 μ m

Neben den Zilienzellen mit Kinozilien (K) kommen zilienlose Zellen, die Granula (G) enthalten und zilienlose, Vakuolen (VA)-enthaltende Zellen vor. BM = Basalmembran, I = Interstitium, MV = Mikrovilli, N = Nukleus

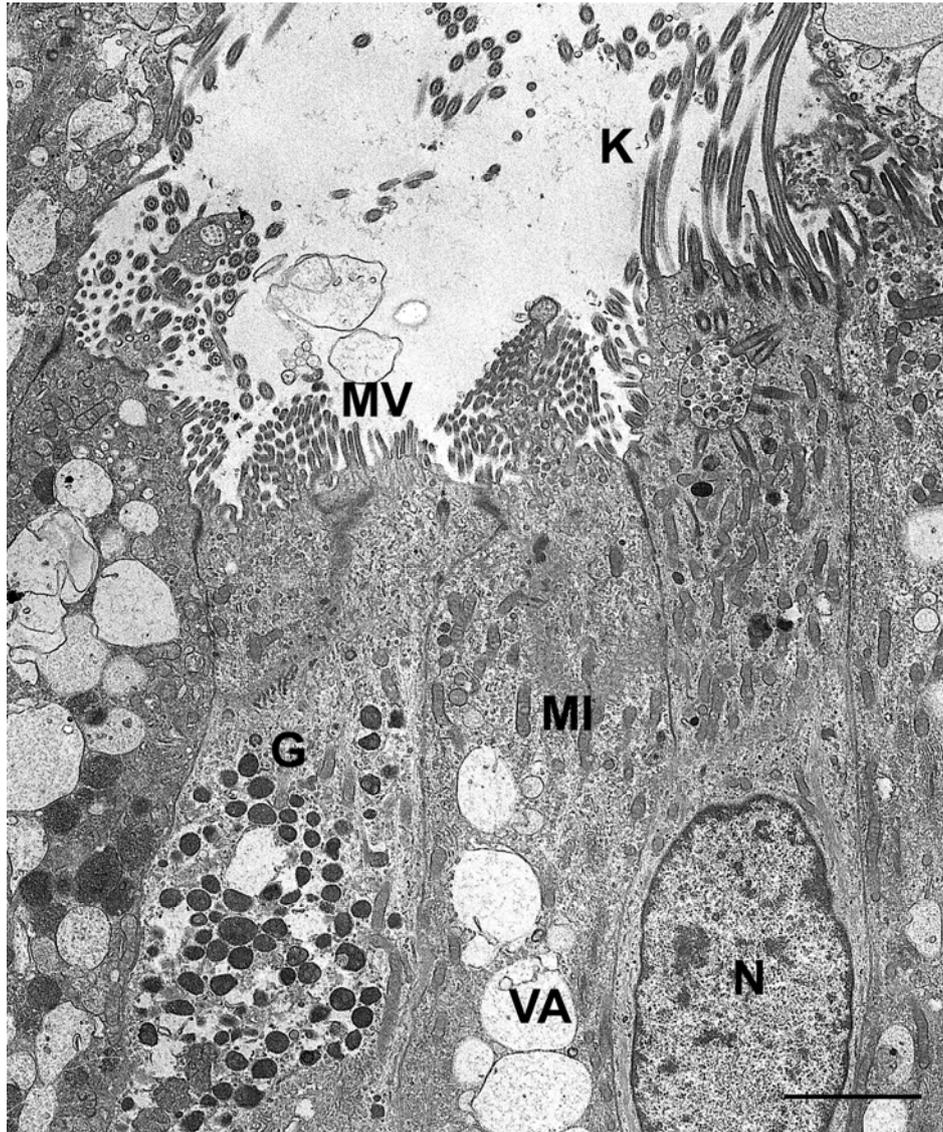


Bild 57: Apikalbereich der Ductuli efferentes testis. SB = 3 μ m

Im Epithel der Ductuli efferentes kommen zilienlose Zellen mit Granula (G) und solche, die Vakuolen (VA) enthalten vor. Daneben liegt eine Zilienzelle mit Zellkern (N). K = Kinozilien, MI = Mitochondrien, MV = Mikrovilli

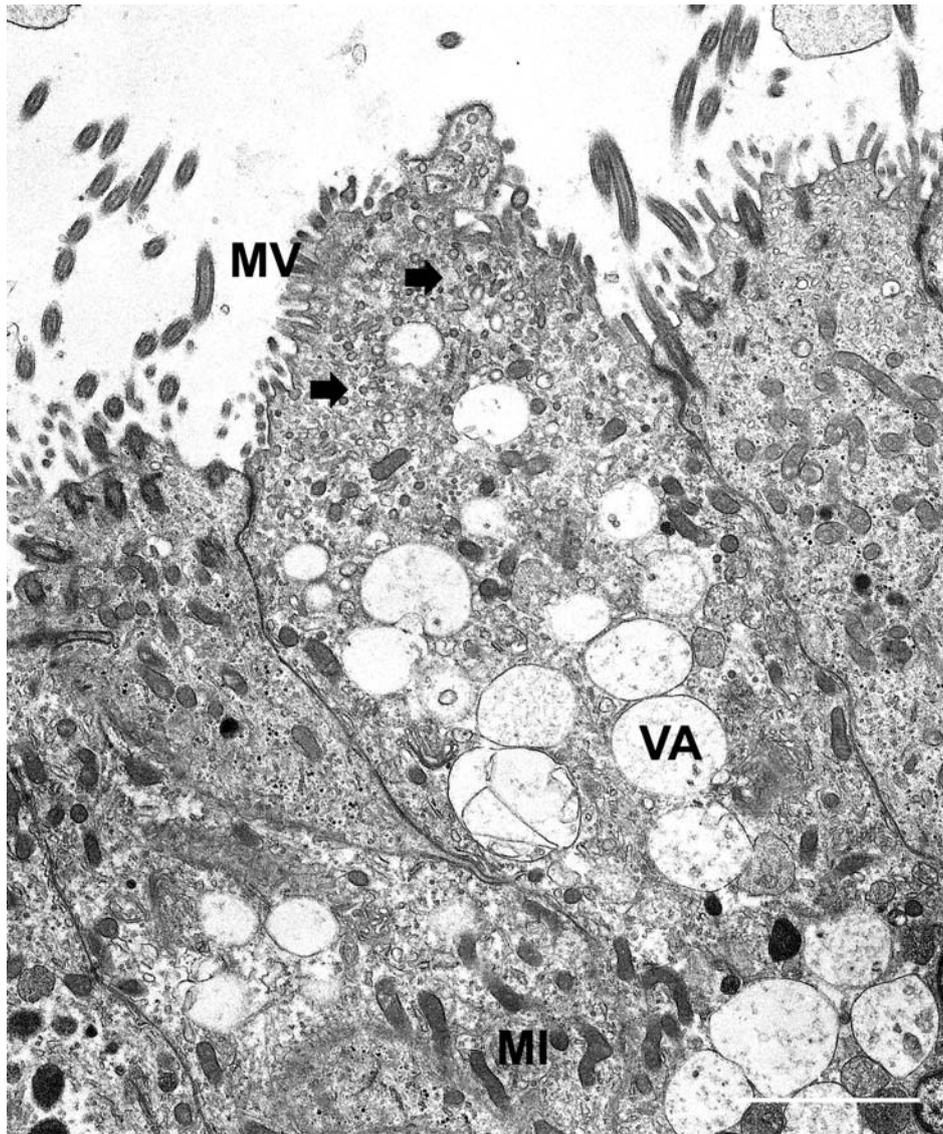


Bild 58: Apikale Zytoplasmazone der Ductuli efferentes. SB = 3 μ m

Im apikalen Zytoplasmabereich weisen zahlreiche kleine Bläschen auf aktive Mikropinozytose hin (Pfeil).
MI = Mitochondrien, MV = Mikrovilli, VA = Vakuolen

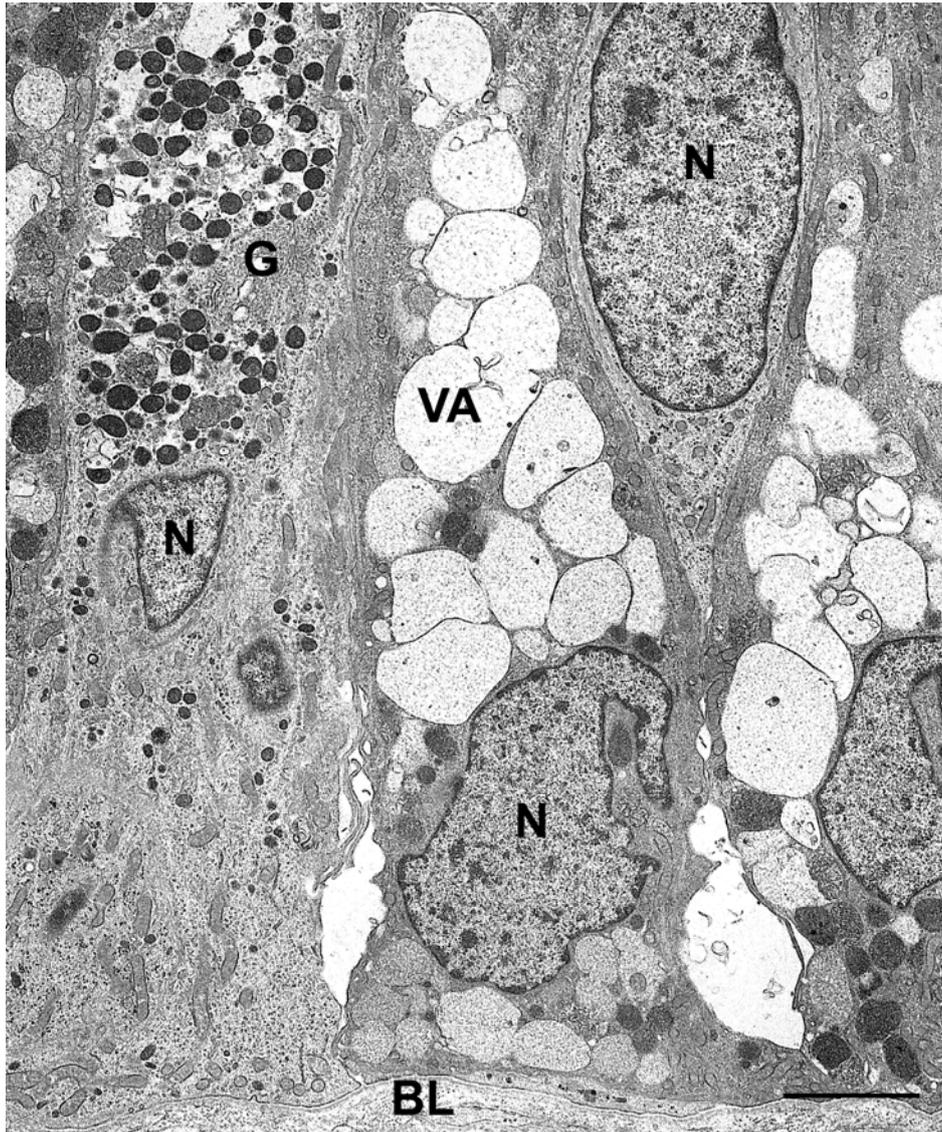


Bild 59: Übersicht über den Basalbereich der Ductuli efferentes. SB = 3 μ m

Der Zellkern der Granula (G)- enthaltenden zilienlosen Zellen ist deutlich kleiner als der gefurchte der Vakuolen (VA)- enthaltenden zilienlosen Zellen. BL = Basallamina, N = Nukleus

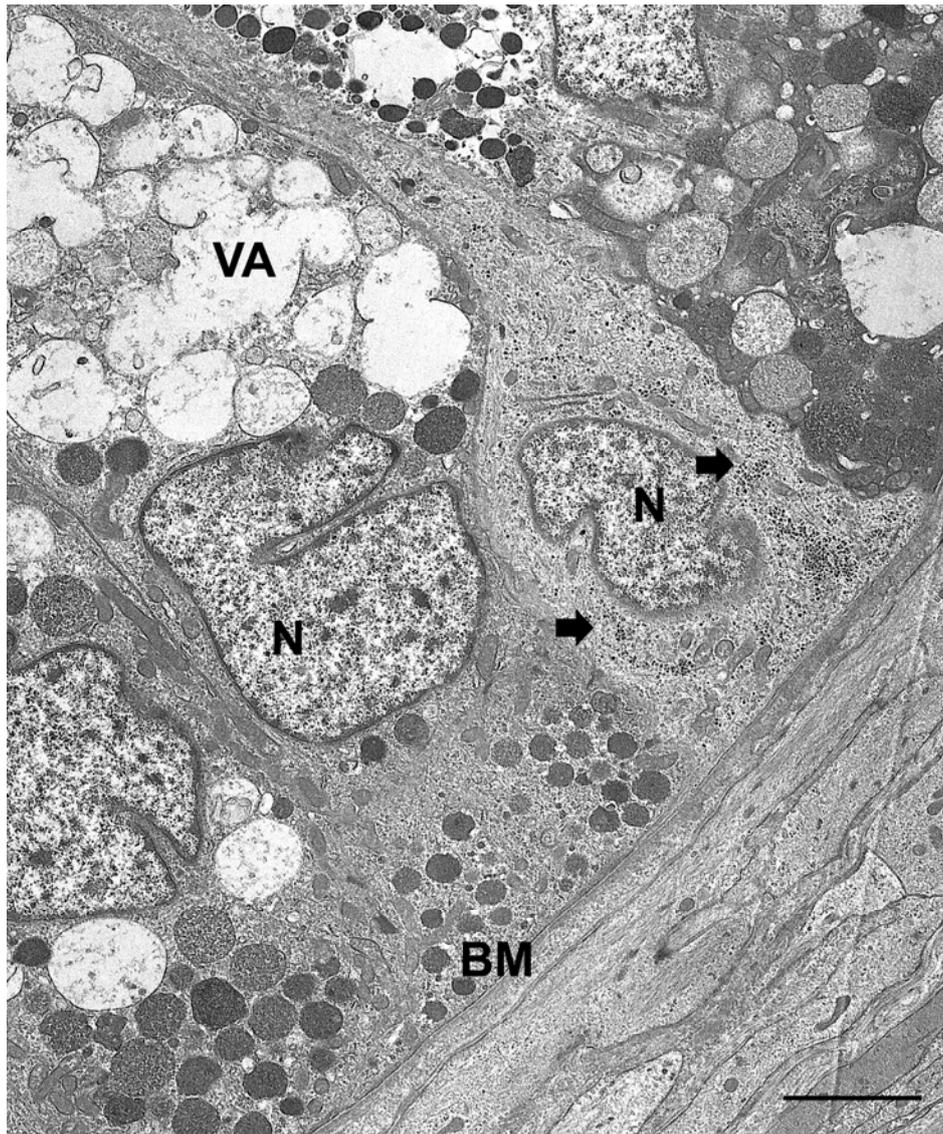


Bild 60: Basalbereich der Ductuli efferentes. SB = 3 μ m

Im Zytoplasma kommen Glykogen-Ansammlungen (Pfeil) vor. BM = Basalmembran, N = Nukleus, VA = Vakuolen

4.4.2 Ultrastruktur des Initialsegmentes

Die hochprismatischen Hauptzellen stellen die Hauptzellart im Nebenhodenepithel dar. Ihre Oberfläche ist mit langen, weit ins Lumen reichenden Stereozilien ausgestattet (durchschnittliche Länge: 102,4 μm), die sich oft direkt nach ihrem Ursprung am apikalen Zellbereich verzweigen. Im Lumen sind in geringer Zahl Spermien und vereinzelt Zellen des Keimepithels zu erkennen. Benachbarte Hauptzellen werden apikal durch „junctional complexes“ miteinander verbunden (Bild 61). In der apikalen Zytoplasmazone der Hauptzellen sind zahlreiche kleine Bläschen und „coated vesicles“ zu sehen. Der Inhalt der meisten Bläschen ist nur mäßig elektronendicht, andere enthalten stark elektronendichte Granula. Dazwischen liegen größere helle Vakuolen und kurze Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums. Ihre Anzahl nimmt nach basal hin zu (Bild 64). In der sich basal anschließenden iuxtannukleären Zone ist ein großer, aus konzentrisch angeordneten Zisternen bestehender Golgi-Apparat lokalisiert. Seine Dictyosomen sind miteinander verbunden und um ein Zentrum mit zahlreichen, verschieden großen Vesikeln gelagert. Der Zellkern der Hauptzellen hat in diesem Segment längsovale Form, ist im basalen Drittel des Zytoplasmas lokalisiert und weist einen mäßigen Gehalt an Heterochromatin auf. Die Zellkerne besitzen meist ein bis zwei große Nukleoli und eine größere Anzahl auffälliger, mäßig elektronendichter Kerneinschlüsse. Diese Kerneinschlüsse sind rund und hauptsächlich membranständig. Zum Teil enthalten sie unterschiedlich viele elektronendichte Granula (Bild 62 und 63). Das helle Zytoplasma enthält einige Mitochondrien vom Cristae-Typ, die überwiegend in der Längsachse der Zelle angeordnet sind und Zisternen rauen endoplasmatischen Retikulums. Außerdem finden sich in Kernnähe zahlreiche kleine Vesikel unterschiedlicher Elektronendichte. Die einzelnen Zellen stehen hier durch Invaginationen miteinander in Kontakt.

Die in der Nähe der Basalmembran lokalisierten Basalzellen erreichen im Gegensatz zu den hochprismatischen Hauptzellen niemals das Lumen des Nebenhodenkanals. Sie sitzen rund bis dreieckig der Basalmembran auf. Ihr Kern ist im Verhältnis zum Zytoplasmaanteil relativ groß und weist teilweise Einkerbungen auf. Das helle Zytoplasma ist organellenarm. Es enthält längliche Mitochondrien, einen kleinen Golgi-Apparat und einige Stränge von rauem endoplasmatischem Retikulum. Das Karyoplasma ist mäßig elektronendicht und beinhaltet einen deutlichen Nukleolus.

Die Basalmembran, der das Epithel aufsitzt, ist gut ausgebildet. Sie verläuft als gewellte Linie, unter der sich eine Zone lockeren Bindegewebes befindet. Darauf folgt in die Peripherie ein Interstitium, welches glatte Muskelzellen, Gefäße und Nerven enthält.

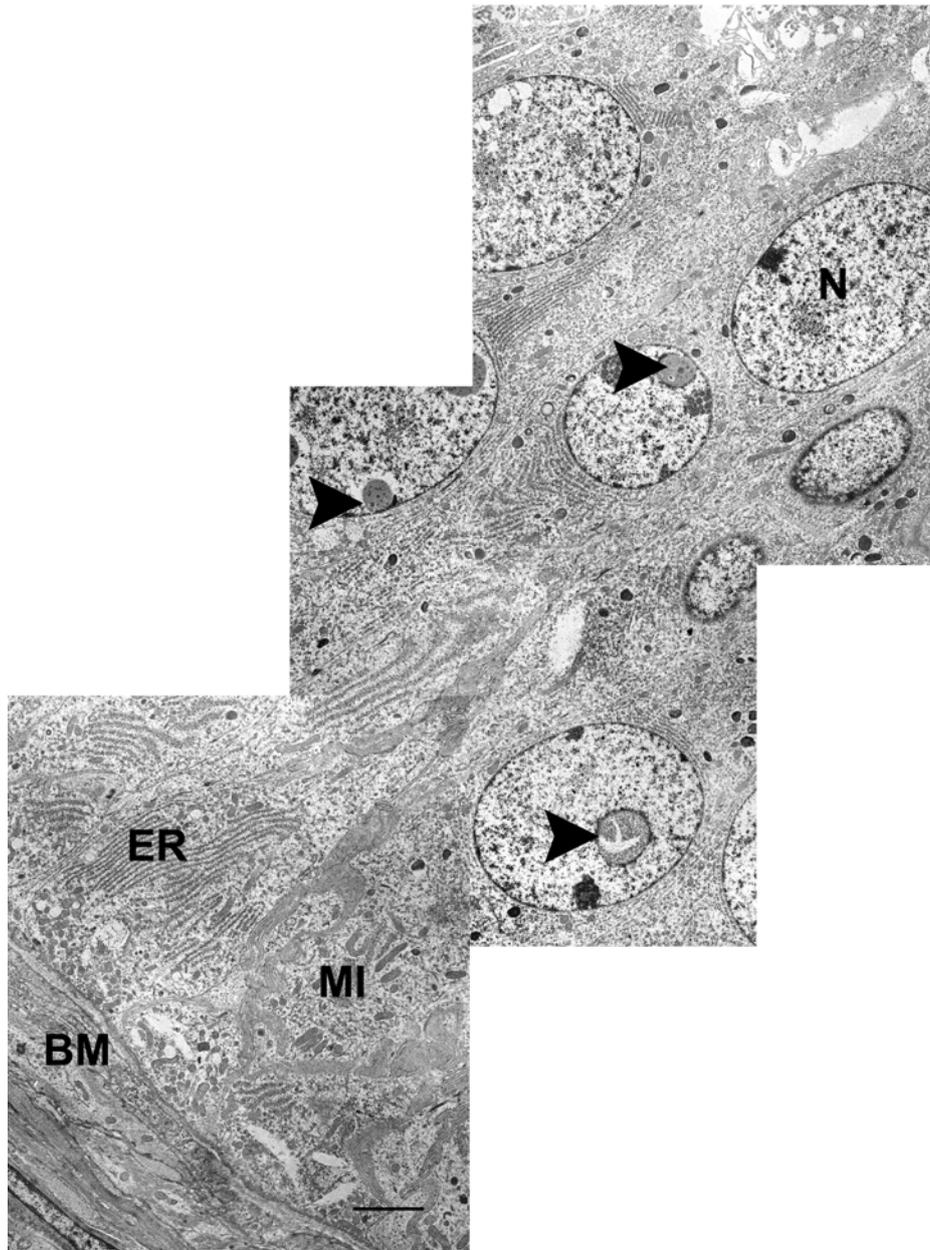


Bild 61: Übersicht über das mehrreihige, hochprismatische Epithel des Initialsegmentes. SB = 3 μ m
In den Kernen (N) der Hauptzellen sind neben Nukleoli auch Kerneinschlüsse (Pfeilspitze) vorhanden. Basal kommt vermehrt endoplasmatisches Retikulum vom rauhen Typ vor (ER). BM = Basalmembran, MI = Mitochondrien

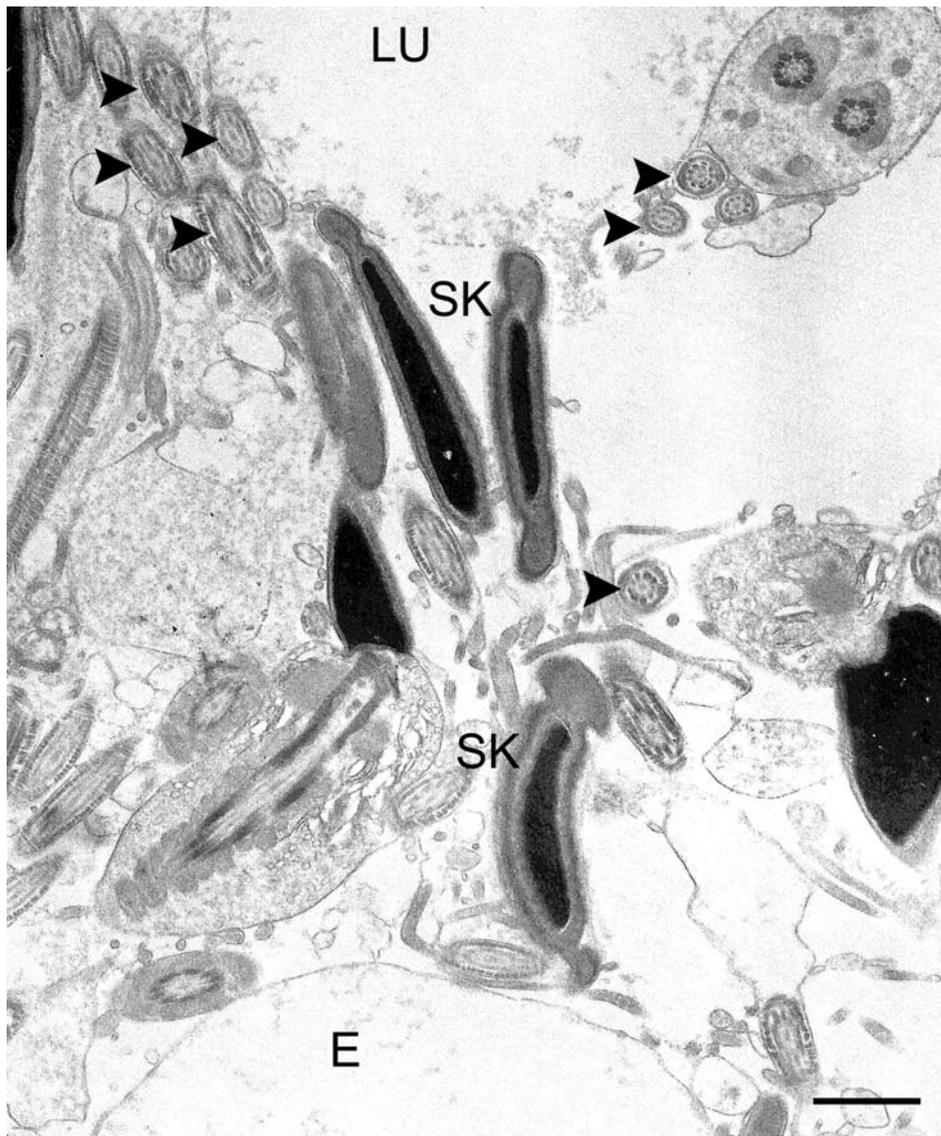


Bild 62: Elektronenmikroskopische Darstellung des Lumens des Initialsegmentes. SB = 1 μ m
Im Lumen (LU) befinden sich zahlreiche Anschnitte von Spermenschwänzen (Pfeilspitze), Spermienköpfen (SK)
und unreife Spermien. E = Epithel

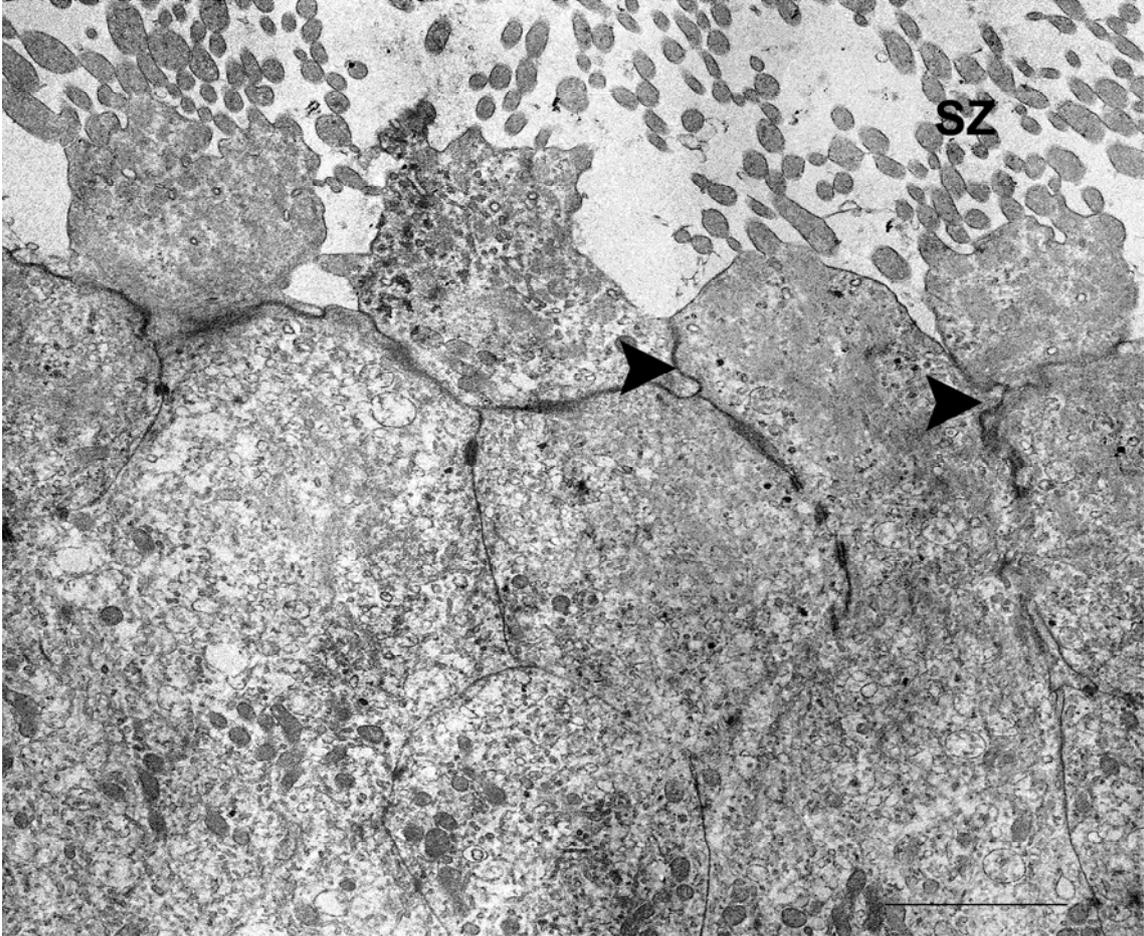


Bild 63: Apikalregion des Epithels des Initialsegmentes. SB = 3 µm
Die Hauptzellen stehen apikal durch „junctional complexes“ (Pfeilspitze) miteinander in Kontakt. SZ = Stereozilien

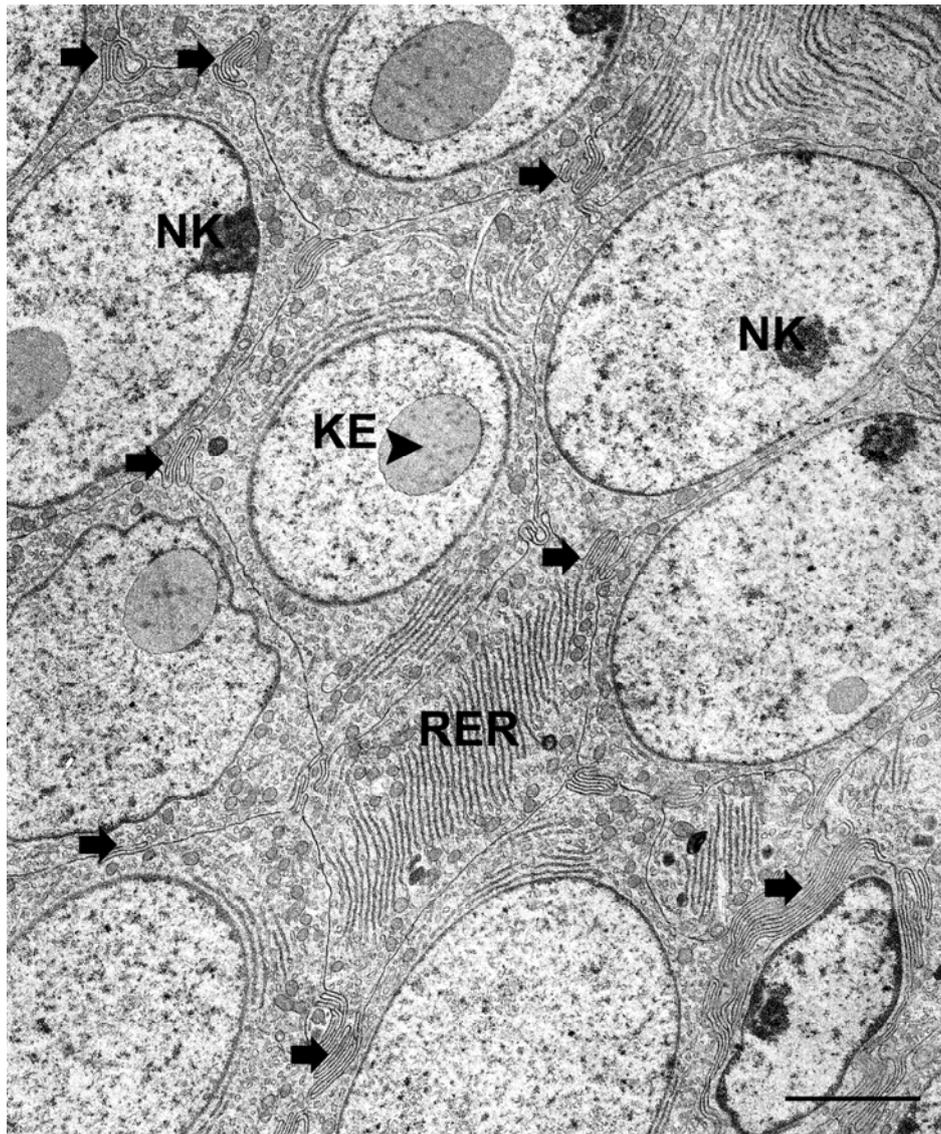


Bild 64: Darstellung der Hauptzellen im Initialsegment. SB = 3 μ m

Die Zellkerne der Hauptzellen enthalten Nukleoli (NK) und Kerneinschlüsse (KE). Die Zellen stehen durch zahlreiche Invaginationen (Pfeil) in Kontakt. RER = raues endoplasmatisches Retikulum

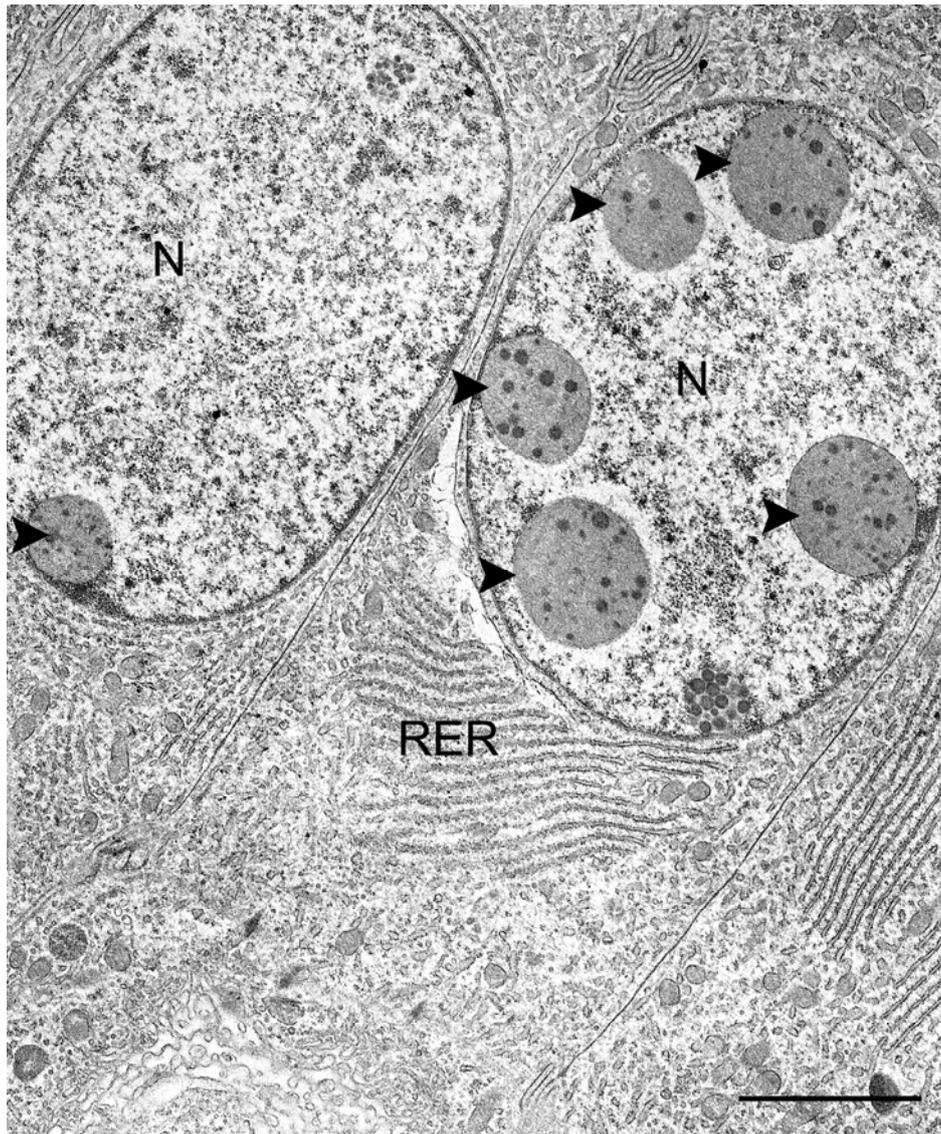


Bild 65: Kerneinschlüsse in den Zellkernen der Hauptzellen des Initialsegmentes. SB = 3 μm

Die Zellkerne (N) der Hauptzellen enthalten mäßig elektronendichte Kerneinschlüsse (Pfeilspitze), die einige stark heterochromatische Granula beinhalten. RER = raues endoplasmatisches Retikulum

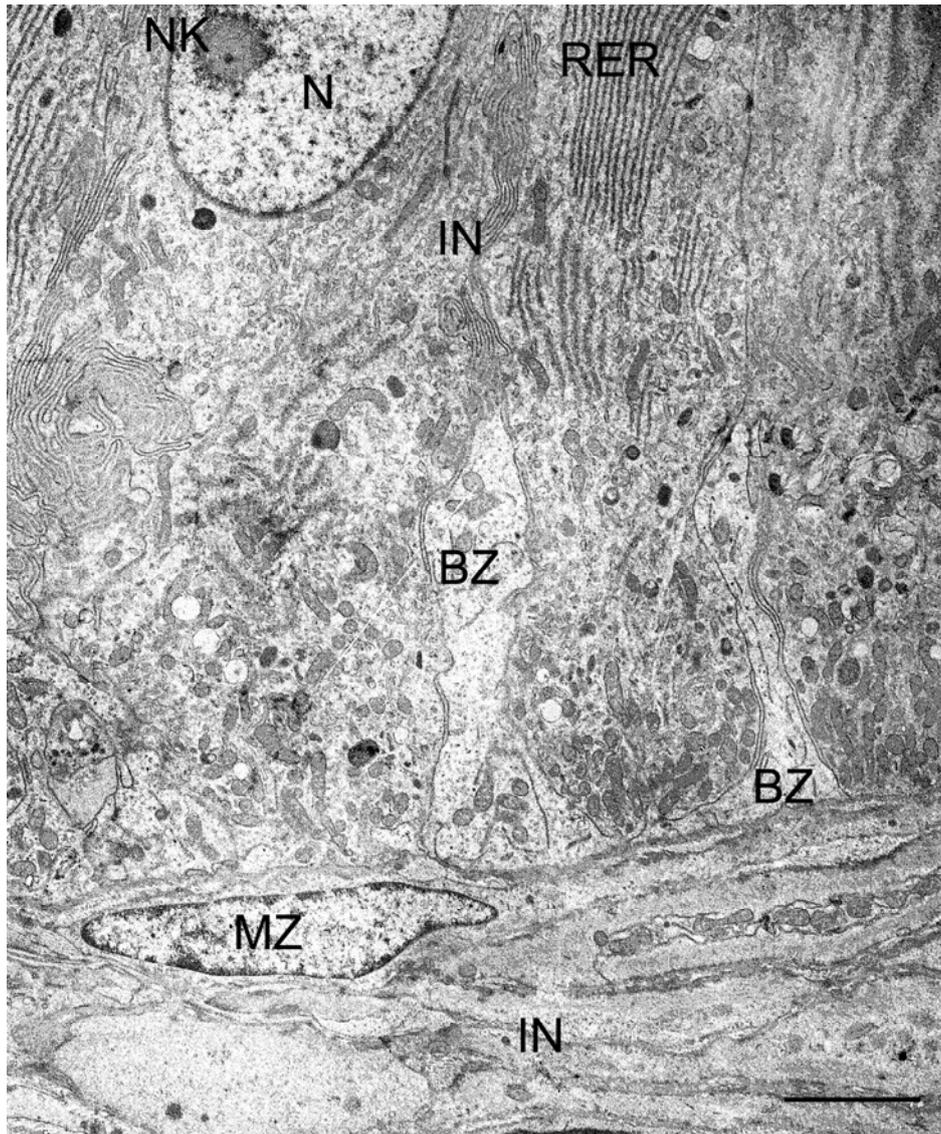


Bild 66: Basalregion des Initialsegmentes. SB = 3 μ m

Das Zytoplasma der Basalzellen (BZ) ist deutlich heller als das der Hauptzellen und hebt sich hervor. IN = Invagination, MZ = Muskelzelle, N = Zellkern einer Hauptzelle, NK = Nukleolus, RER = raues endoplasmatisches Retikulum

4.4.3 Ultrastruktur des Mittelsegmentes

Das Epithel des Mittelsegmentes verfügt über dieselbe Zellausstattung wie das Initialsegment. Auch hier haben die vorherrschenden Hautzellen einen weit ins Lumen reichenden Stereozilienbesatz. Seine Länge beträgt durchschnittlich 110,6 μm (Bild 66). In der apikalen Zytoplasmazone fallen viele große Vakuolen auf, deren Vorkommen nach basal hin deutlich abnimmt. Zudem deuten an dieser Stelle viele kleine Vesikel auf aktive Mikropinozytose hin (Bild 66 und 68). Im Zytoplasma der Hauptzellen kommen, anders als im Initialsegment, zahlreiche längliche und rundliche Mitochondrien vor, transversale Cristae treten jedoch in den Hintergrund (Bild 71). Auch sind kurze Stränge von rauem endoplasmatischem Retikulum vorhanden, jedoch deutlich weniger als in den proximalen Segmenten. Benachbarte Zellen sind durch sogenannte „junctional complexes“ verbunden (Bild 67 und 69). Die iuxtannukleär gelegene Golgi-Zone nimmt einen breiten Raum über dem Zellkern ein, die Zisternen ordnen sich langgezogen um zentrale Vesikel an (Bild 70 und 71). Die Zellkerne der Hauptzellen sind deutlich langgestreckt und zentral im Zytoplasma lokalisiert (Bild 65). Das Karyoplasma ist nur mäßig elektronendicht und beinhaltet mehrere Nukleoli. Kerneinschlüsse kommen in diesem Segment ebenso wie im Initialsegment vor, jedoch weit weniger oft als dort. An der apikalen Seite des Zellkerns ist regelmäßig raues endoplasmatisches Retikulum zu finden (Bild 72). Das basale Zytoplasma der Hauptzellen beinhaltet mehrere Lysosomen. Zudem sind hier vermehrt Mitochondrien anzutreffen. Zwischen den hochprismatischen Zellen kommen wieder unmittelbar der Basalmembran anliegende Basalzellen vor. Ihr Kern ist deutlich kleiner als der der Hauptzellen und ovoid geformt. Er beinhaltet einen deutlichen Nukleolus. Das Karyoplasma ist nur mäßig elektronendicht. Das Zytoplasma verjüngt sich apikal und enthält wenige Mitochondrien und kleine Vakuolen (Bild 73). Im basalen Bereich der Zelle kommen zahlreiche Lysosomen und „Residualbodies“ vor. Auf die dünne, regelmäßige Basallamina folgen lockeres Bindegewebe und mehrere Muskelzellschichten. Die glatten Muskelzellen sind langgezogen und ihr Zellkern enthält randständig eine elektronendichte schmale Zone und wenige kleine Nukleoli.

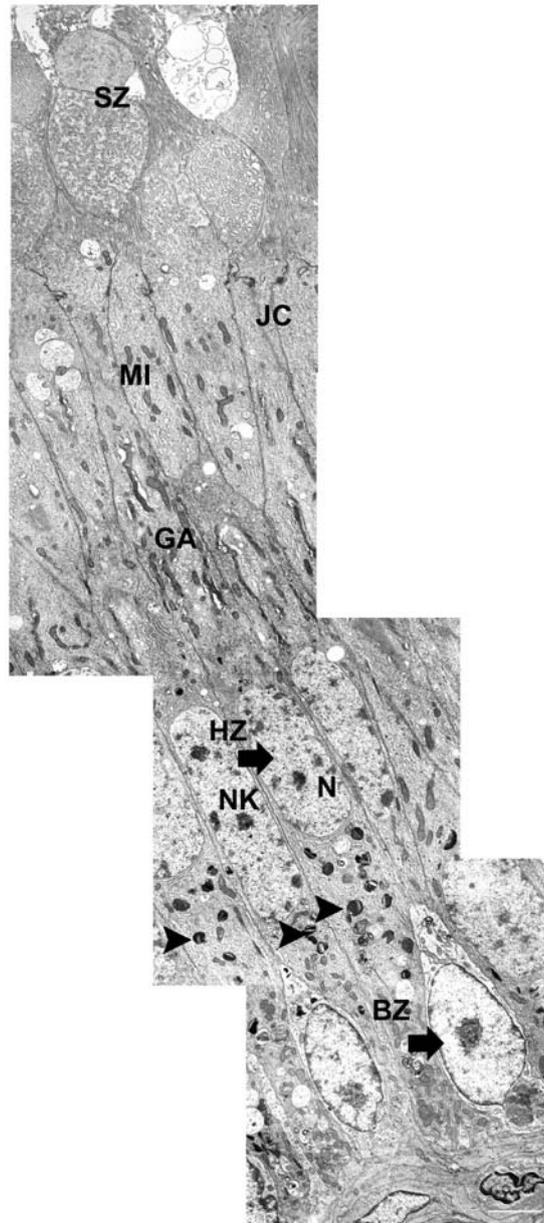


Bild 67: Übersicht über das mehrreihige, hochprismatische Epithel des Mittelsegmentes. SB = 3 μ m
Die Zellkerne der Hauptzellen (N) sind länglich und liegen auf gleicher Höhe im Epithel. Der Golgi-Apparat (GA) nimmt einen breiten Raum über den Zellkernen ein. Kerne und Zytoplasma der Basalzellen (BZ) sind deutlich heller. Im Basalbereich kommen zahlreiche lysosomale Abbauprodukte (Pfeilspitze) vor. JC = „junctional complexes“, MI = Mitochondrien, SZ = Stereozilien

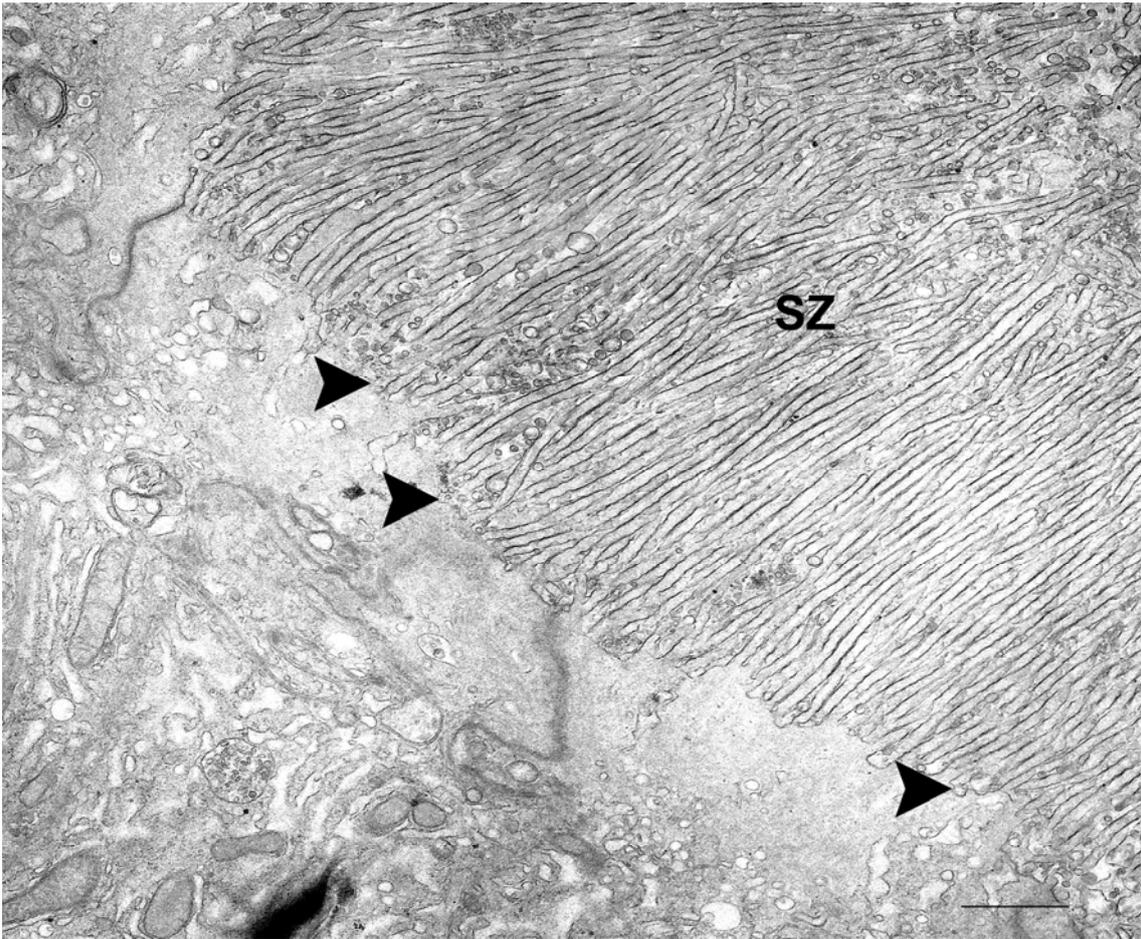


Bild 68: Apikalbereich des Mittelsegmentes. SB = 1 μ m

Der Stereozilienbesatz (SZ) reicht weit ins Lumen. Viele kleine, sich ins Lumen öffnende Vesikel, weisen auf mikropinozytische Aktivität an der apikalen Zellmembran hin (Pfeilspitze).

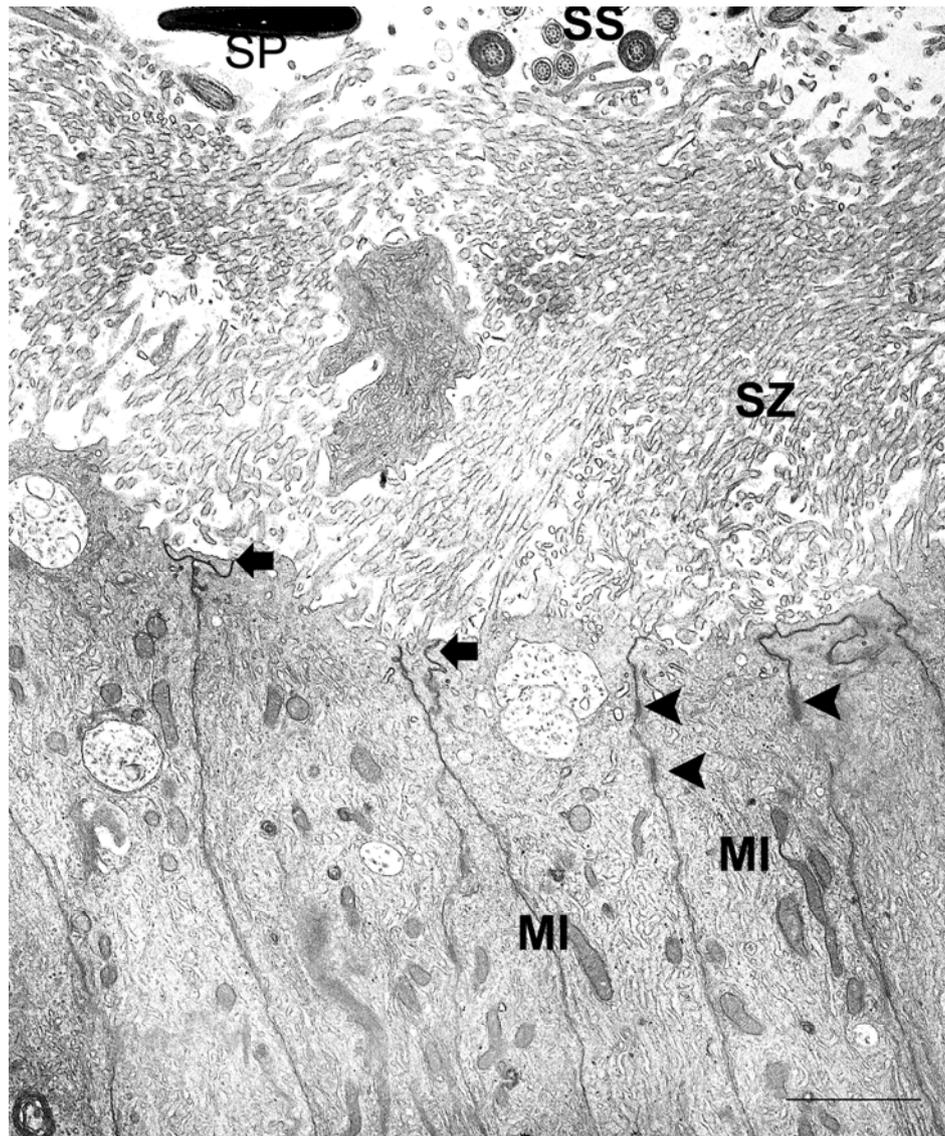


Bild 69: Lumen und Apikalbereich des Mittelsegmentes. SB = 3 μ m

Die Hauptzellen stehen apikal durch „tight junctions“ (Pfeil) und Desmosomen (Pfeilspitze) in Verbindung. Es kommen zahlreiche längliche und runde Mitochondrien (MI) vor. SP = Anschnitt eines Spermiums, SS = Spermischwanz, SZ = Stereozilien

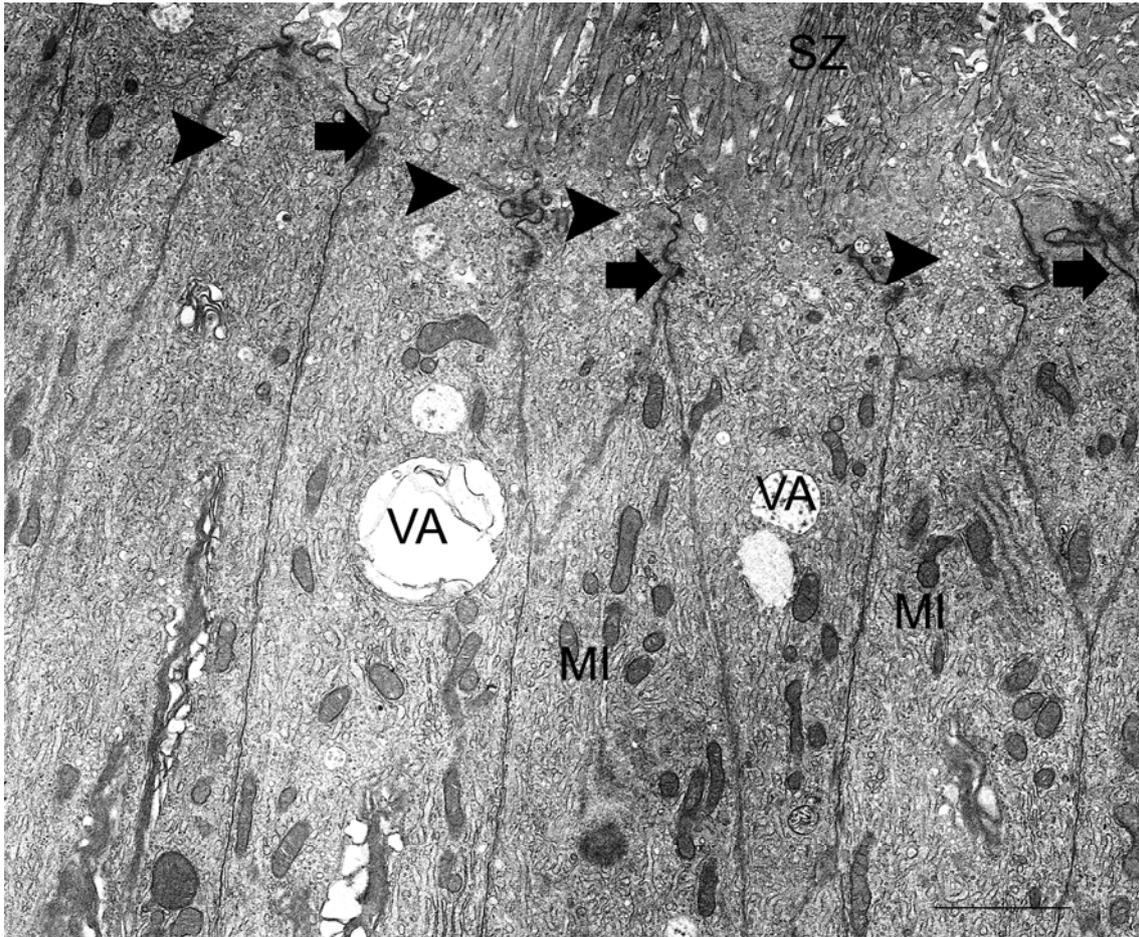


Bild 70: Mikropinozytose im Apikalbereich des Mittelsegmentes. SB = 3 μ m

Im Apikalbereich deuten zahlreiche kleine Vesikel auf Mikropinozytose hin (Pfeilspitze). Auch größere helle Vakuolen kommen vor (VA). MI = Mitochondrien, Pfeil = „junctional complexes“, SZ = Stereozilien

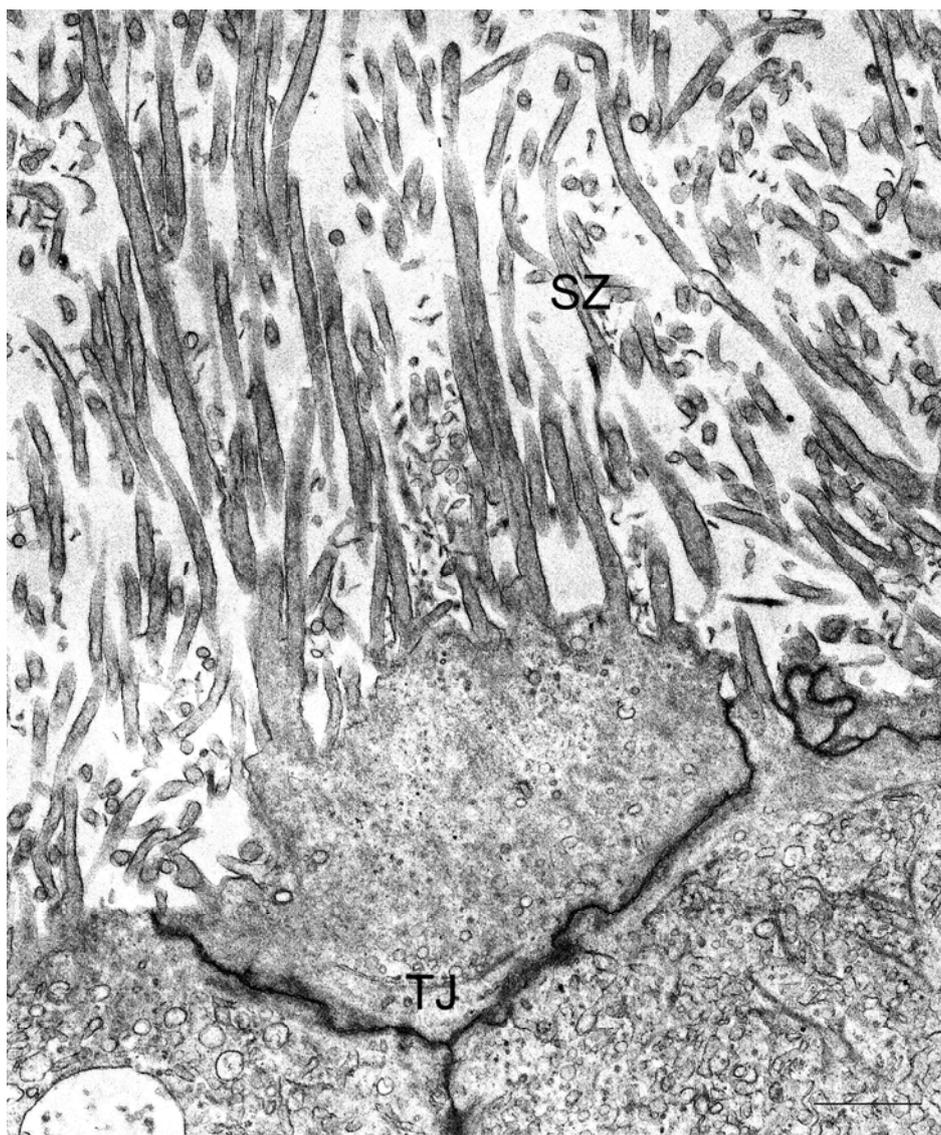


Bild 71: Zellverbindungen im Apikalbereich des Mittelsegmentes. SB = 1 μ m
Die Zellmembranen der Hauptzellen stehen apikal durch „tight junctions“ (TJ) in Verbindung. SZ = Stereozilien

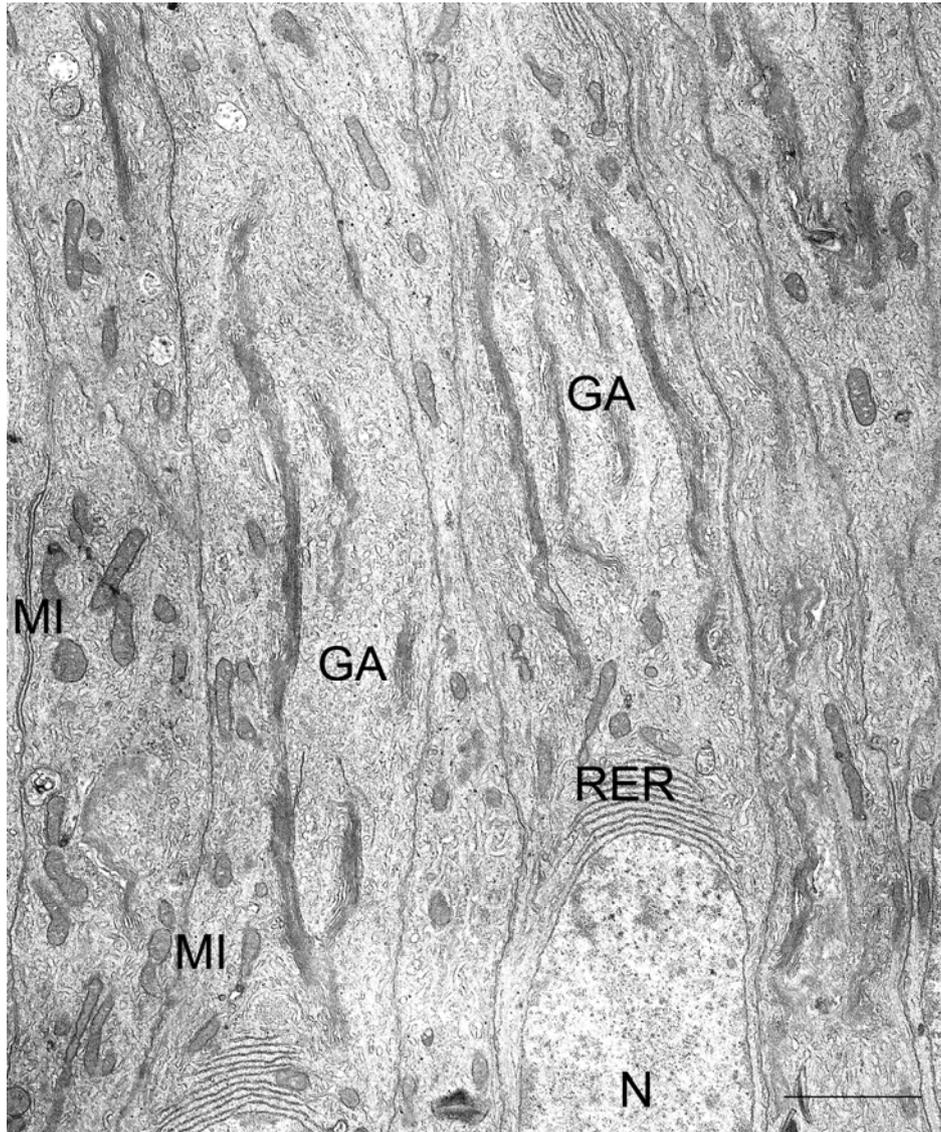


Bild 72: Golgi-Zone des Mittelsegmentes. SB = 3 μ m

Der Golgi-Apparat (GA) nimmt einen großen Raum über dem Zellkern ein. Langgezogene Zisternen ordnen sich um zentrale Vesikel an. MI = Mitochondrien, N = Nukleus, RER = raues endoplasmatisches Retikulum

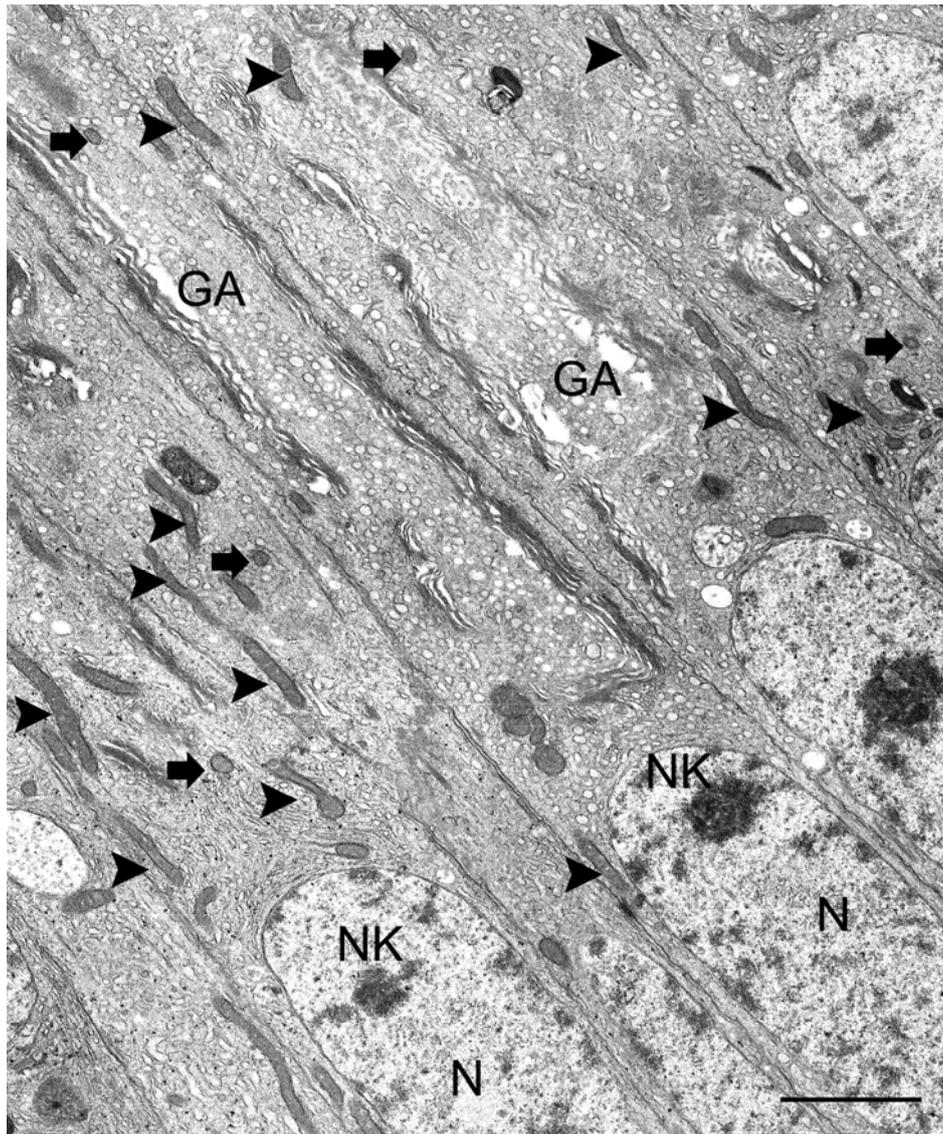


Bild 73: Supranukleärer Epithelbereich des Mittelsegmentes. SB = 3 μ m

In Zellkernnähe kommen zahlreiche langgezogene (Pfeilspitze) und auch runde (Pfeil) Mitochondrien vor.
GA = Golgi-Apparat, NK = Nukleolus

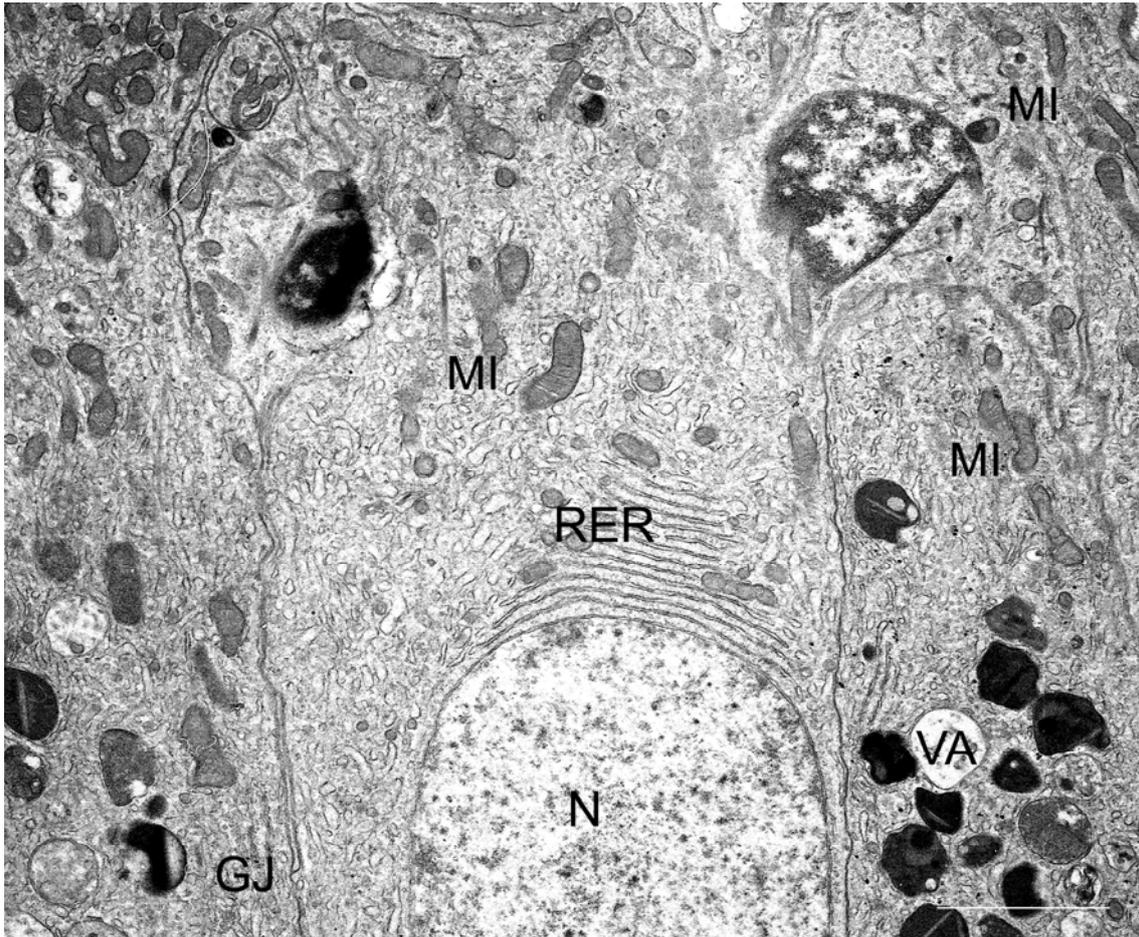


Bild 74: Übersicht über den supranukleären Epithelbereich des Mittelsegmentes. SB = 3 μ m
An der apikalen Nukleusseite ist raues endoplasmatisches Retikulum (RER) angeordnet. GJ = „gap junction“,
MI = Mitochondrien, N = Nukleus, VA = Vakuole

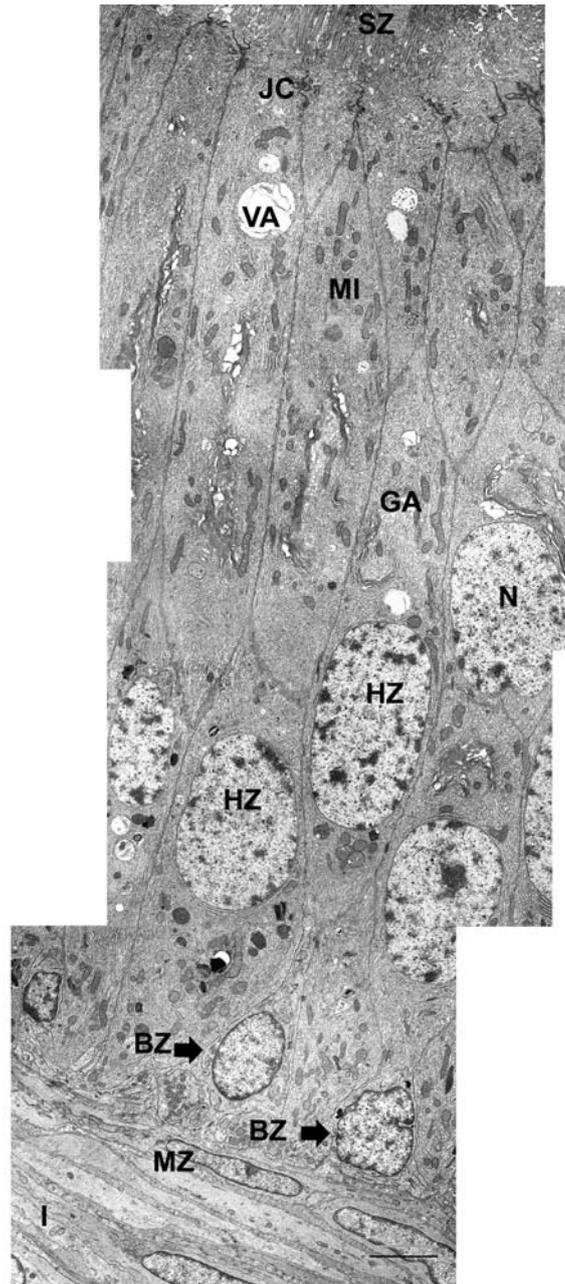


Bild 75: Übersicht über den Basalbereich des Mittelsegmentes. SB = 3 μ m

Die Basalzellen (BZ) sind deutlich kleiner als die Hauptzellen (HZ) und liegen der Basallamina an. GA = Golgi-Apparat, I = Interstitium, JC = „junctional complexes“, MI = Mitochondrien, MZ = Muskelzelle, N = Nukleus, SZ = Stereozilien, VA = Vakuole

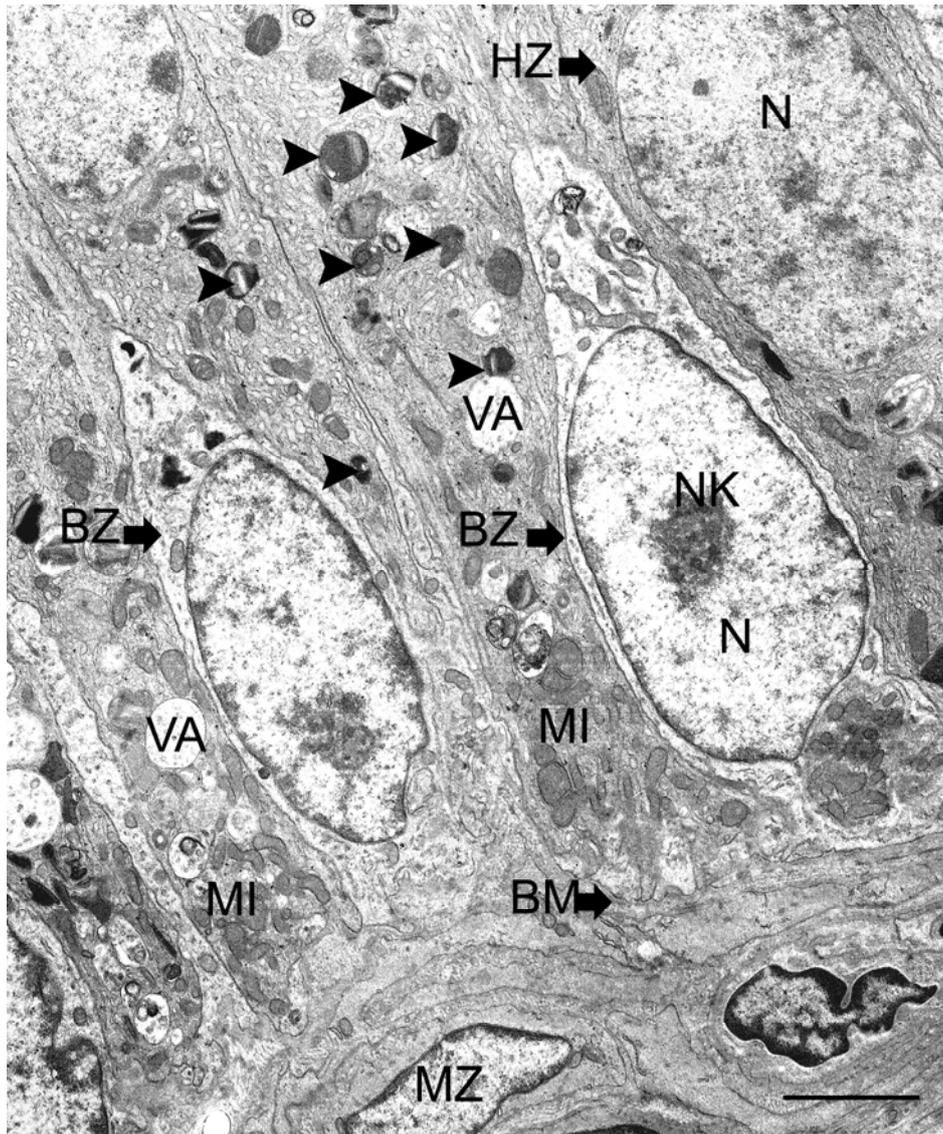


Bild 76: Basaler Epithelbereich des Mittelsegmentes. SB = 3 μ m

Die Basalzellen (BZ) sind deutlich heller als die sie umgebenden Hauptzellen (HZ). Im Basalbereich kommen zahlreiche „Residualbodies“ (Pfeilspitze) und Mitochondrien (Pfeil) vor. BM = Basalmembran, MZ = Muskelzelle, N = Nukleus, NK = Nukleolus, VA = Vakuole

4.4.4 Ultrastruktur des Terminalsegmentes

Der Stereozilienbesatz der Hauptzellen ist in diesem Segment deutlich kürzer (Bild 76). An der apikalen Zellmembran deuten, wie im vorhergehenden Segment, zahlreiche kleine Vesikel auf mikropinozytische Vorgänge hin. Zwischen den Stereozilien tauchen zum Teil aneinandergereihte helle Vakuolen auf. Außerdem enthält das Lumen dichte Spermienkonglomerate. Die apikalen Anteile der hochprismatischen Hauptzellen stehen durch gut ausgebildete „junctional complexes“ miteinander in Kontakt (Bild 76). In der zytoplasmatischen Apikalzone hat die Anzahl der Vesikel deutlich abgenommen. Es treten jedoch zahlreiche „Residualbodies“ auf, die meist stark elektronendicht sind. Sie kommen außer im Apikalbereich auch vermehrt im basalen Zytoplasma der Hauptzellen vor und sammeln sich bevorzugt an der Basalmembran. Ihre Form und Größe ist sehr variabel. Zudem sind zahlreiche Lysosomen im Epithel gelagert, die sich meist rund und elektronendicht darstellen (Bild 80). Die Epithelhöhe hat, verglichen mit den vorangegangenen Segmenten, deutlich abgenommen ($30,9 \mu\text{m} \pm 5,3 \mu\text{m}$). Die Zellkerne der Hauptzellen nehmen ovale Form an und liegen nicht mehr mittig, sondern auf verschiedener Höhe im Zytoplasma (Bild 75). Sie besitzen meist zwei große Nukleoli, die oft peripher im Karyoplasma platziert sind. Dieses ist mäßig elektronendicht, beinhaltet aber einige schollig verteilte Inseln von Heterochromatin. Im gesamten Zytoplasma sind Mitochondrien verteilt, die eine große Formenvielfalt zeigen. Apikal des Zellkerns liegt die Golgi-Zone, die in diesem Segment nur wenig Vesikel umschließt. Im Terminalsegment kommt auffallend viel endoplasmatisches Retikulum vom rauen Typ vor. Dieses liegt fast ausschließlich in Kernnähe in parallelen Zisternen (Bild 78 und 79). Die Zellmembranen sind im Basalbereich durch zahlreiche und deutlich ausgeprägte Invaginationen verbunden. Die Basalzellen im Terminalsegment sind von ähnlicher Form und Größe wie in den vorangegangenen Segmenten, sie haben jedoch weniger Zytoplasma als in den ersten Segmenten. Dieses liegt ringförmig um den Zellkern und zeigt keine apikalen Ausläufer. In diesem Abschnitt des Nebenhodenganges kommt auch erstmals in der Basalregion eingelagertes Glykogen als stark elektronendichte Granula vor (Bild 83). Vereinzelt liegen intraepitheliale Lymphozyten an der Basalmembran (Bild 79).

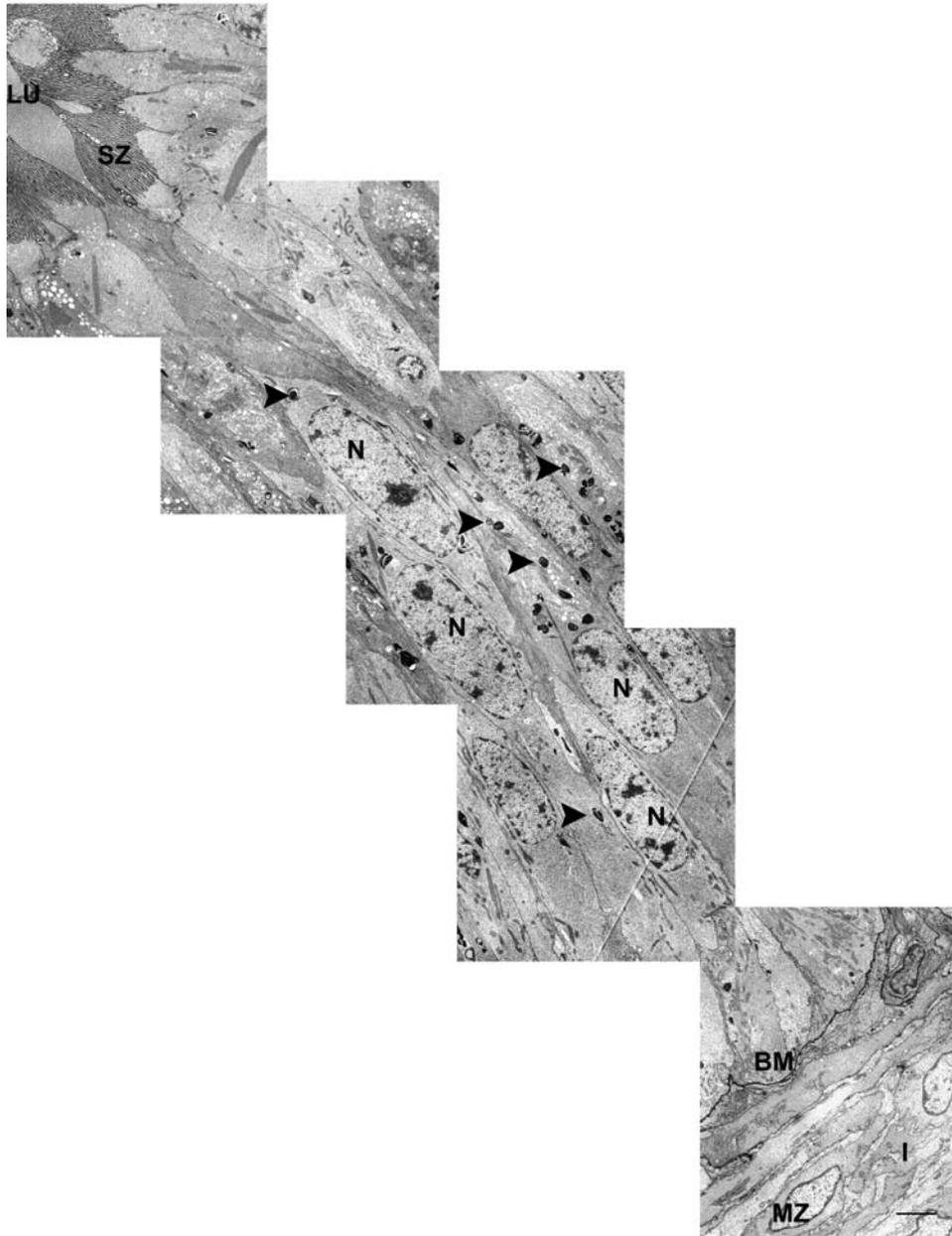


Bild 77: Übersicht über das hochprismatische Epithel des Terminalsegmentes. SB = 3 μ m

Die Zellkerne der Hauptzellen (N) liegen auf unterschiedlicher Höhe im Epithel. Die Stereozilien (SZ) sind deutlich niedriger als in den vorigen Segmenten. BM = Basalmembran, I = Interstitium, L = Lumen, MZ = Muskelzelle, SZ = Stereozilien

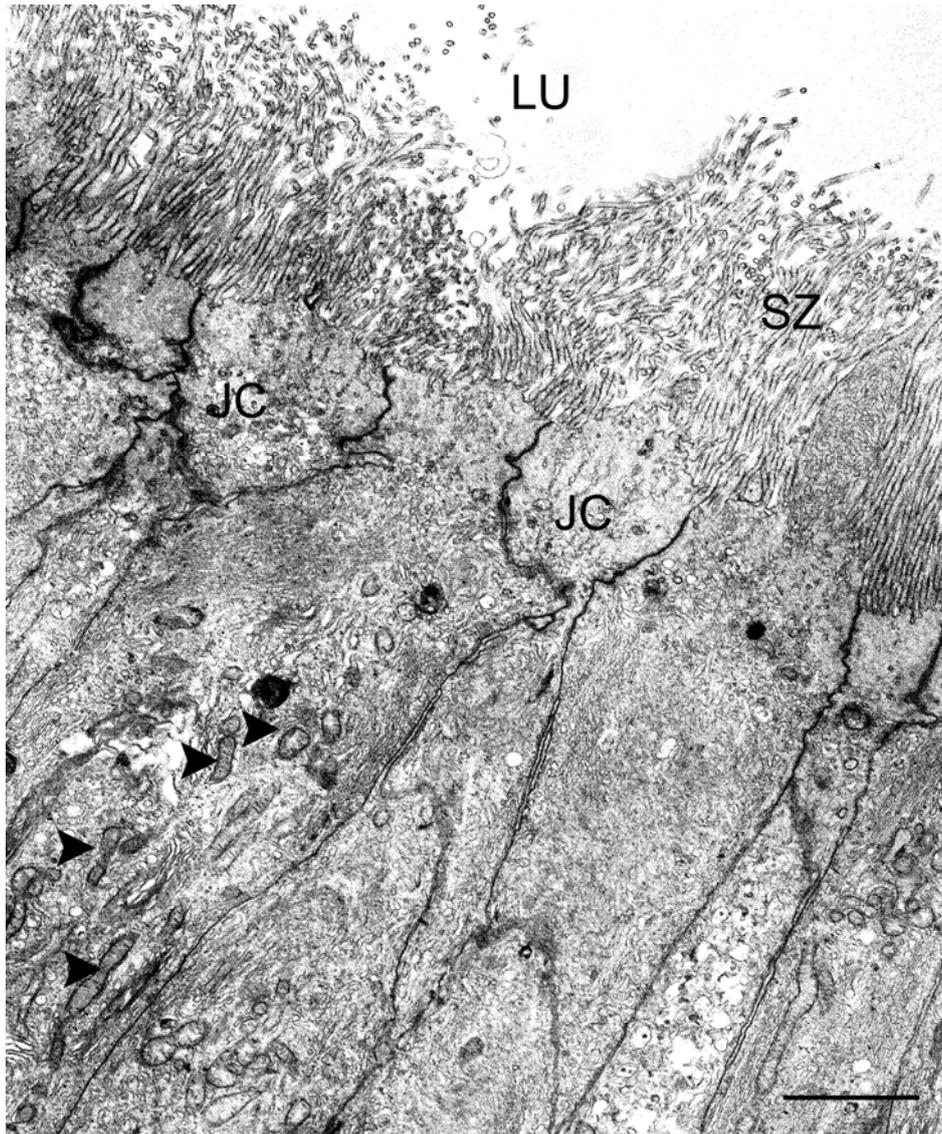


Bild 78: Darstellung des Apikalbereiches des Terminalsegmentes. SB = 3 μ m

Der Stereozilienbesatz (SZ) ist kurz und die Zellen stehen apikal durch „junctional complexes“ (JC) ihrer Zellmembranen in Verbindung. LU = Lumen, Pfeilspitze = Mitochondrien

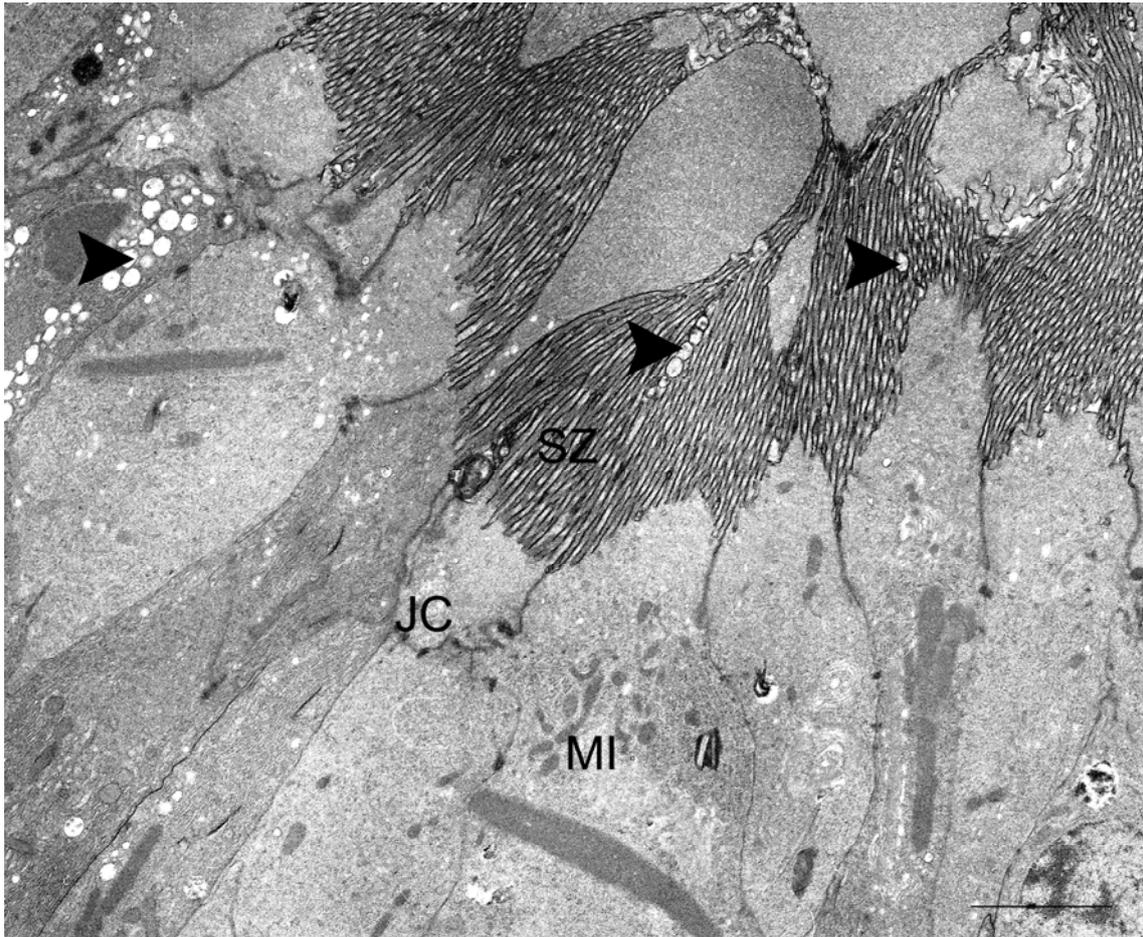


Bild 79: Stereozilienbesatz des Terminalsegmentes. SB = 3 μ m

Vereinzelt kommen apikal größere Vesikel (Pfeilspitze) vor. JC = „junctional complexes“, MI = Mitochondrien, SZ = Stereozilien

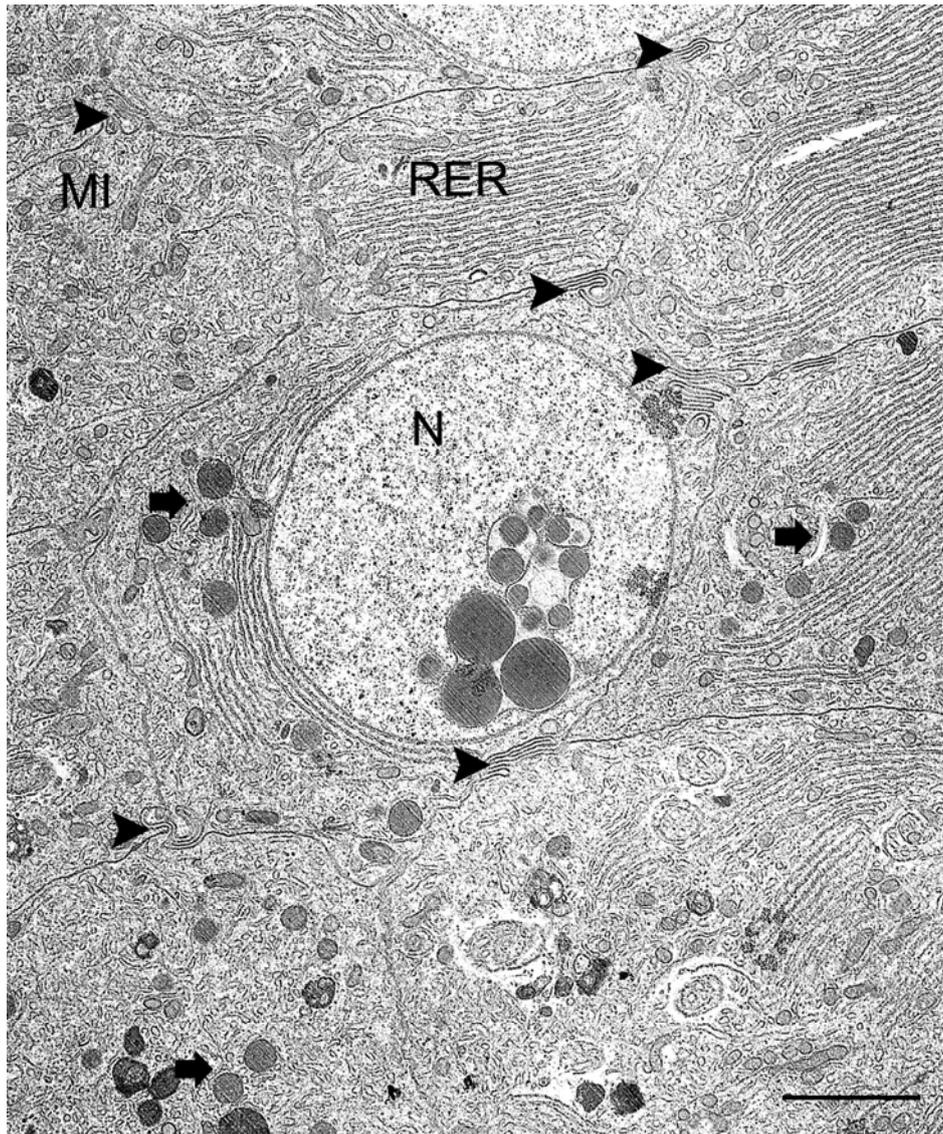


Bild 80: Darstellung der Zellverbindungen im Terminalsegment. SB = 3 μ m

Die Zellen stehen durch zahlreiche Invaginationen (Pfeilspitze) in Kontakt. Es kommt gehäuft endoplasmatisches Retikulum vom rauhen Typ vor (RER). MI = Mitochondrien, Pfeil = Lysosomen

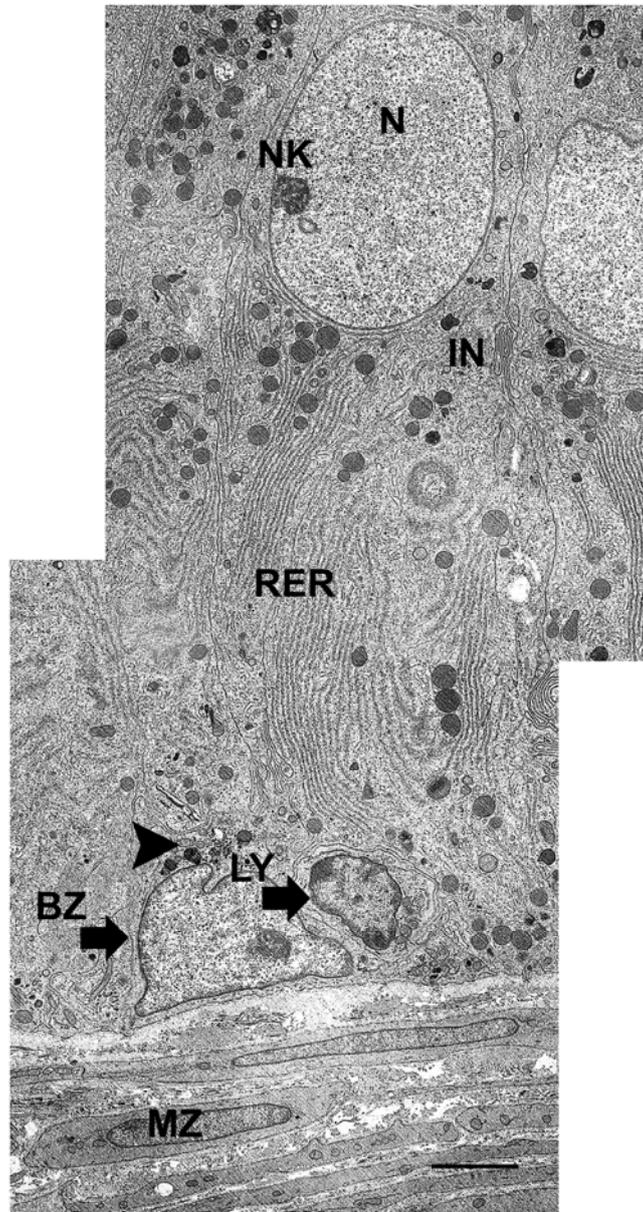


Bild 81: Übersicht über den Basalbereich des Terminalsegmentes. SB = 3 μ m

Die Basalzellen (BZ) liegen breit der Basalmembran auf. Es kommen basal gehäuft „Residualbodies“ (Pfeilspitze) und vereinzelt Lymphozyten (LY) vor. IN = Invagination, N = Nukleus, NK = Nukleolus, RER = raues endoplasmatisches Retikulum

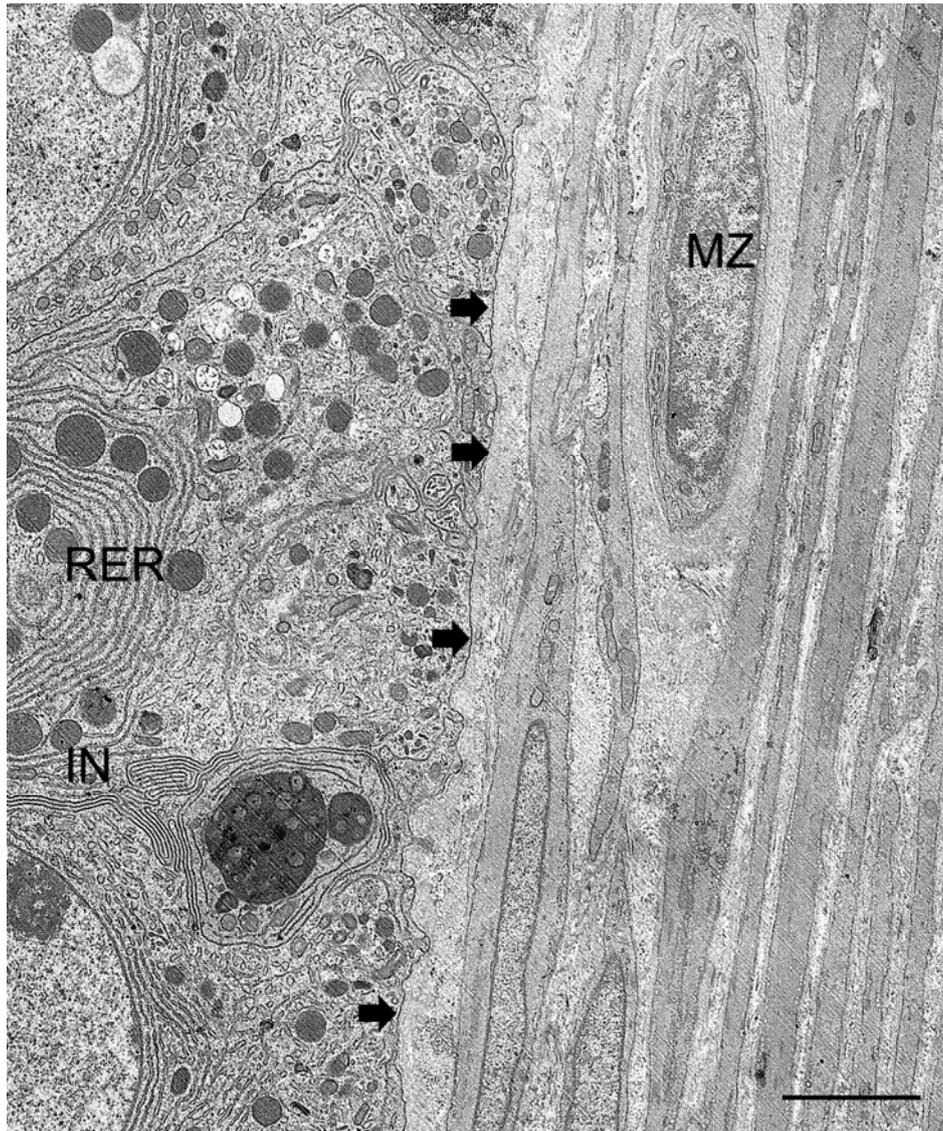


Bild 82: Darstellung der Basalmembran im Terminalsegment. SB = 3 μ m

Die Basalmembran (Pfeil) ist dünn und verläuft geschlängelt. Darunter liegt eine Bindegewebsschicht.
IN = Invagination, MZ = Muskelzelle, RER = raues endoplasmatisches Retikulum

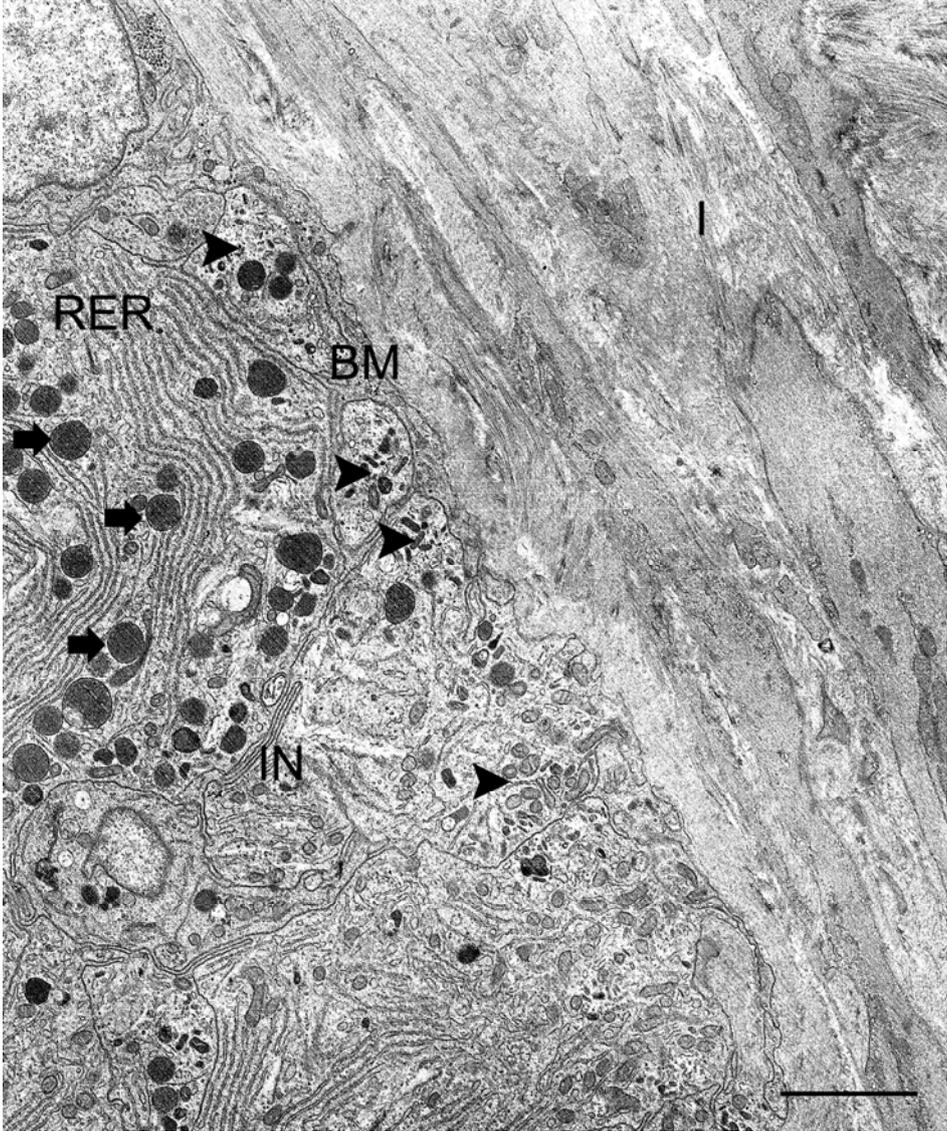


Bild 83: Basalbereich des Terminalsegmentes mit lysosomalen Abbauprodukten. SB = 3 µm
Es kommen zahlreiche Lysosomen (Pfeilspitze) und „Residualbodies“ vor. BM = Basalmembran,
I = Interstitium, IN = Invagination, RER = raues endoplasmatisches Retikulum

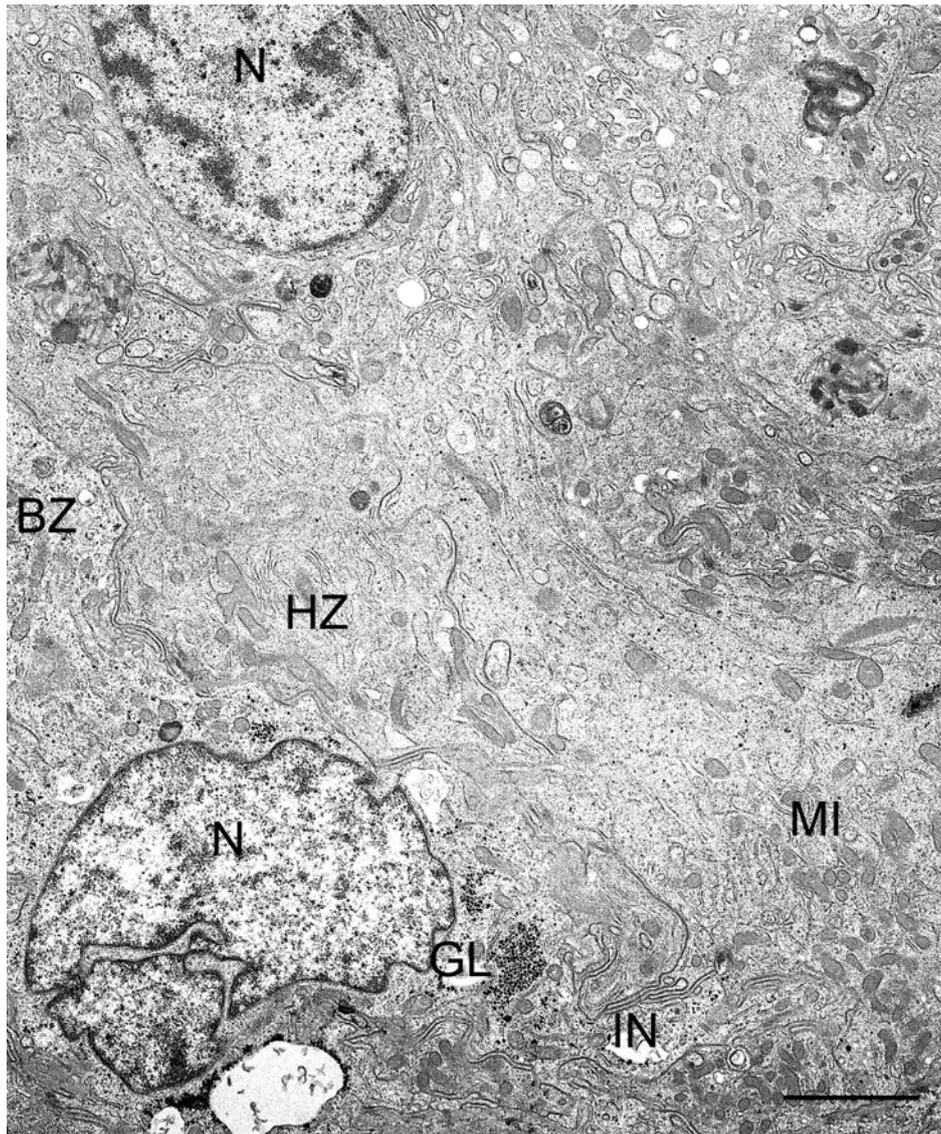


Bild 84: Glykogenansammlung im Basalbereich des Terminalsegmentes. SB = 3 μ m

Im Zytoplasma der Basalzellen kommen Glykogenansammlungen (GL) vor, die sich als stark elektronendichte Granula darstellen. BZ = Basalzelle, HZ = Hauptzelle, IN = Invagination, MI = Mitochondrien, N = Nukleus

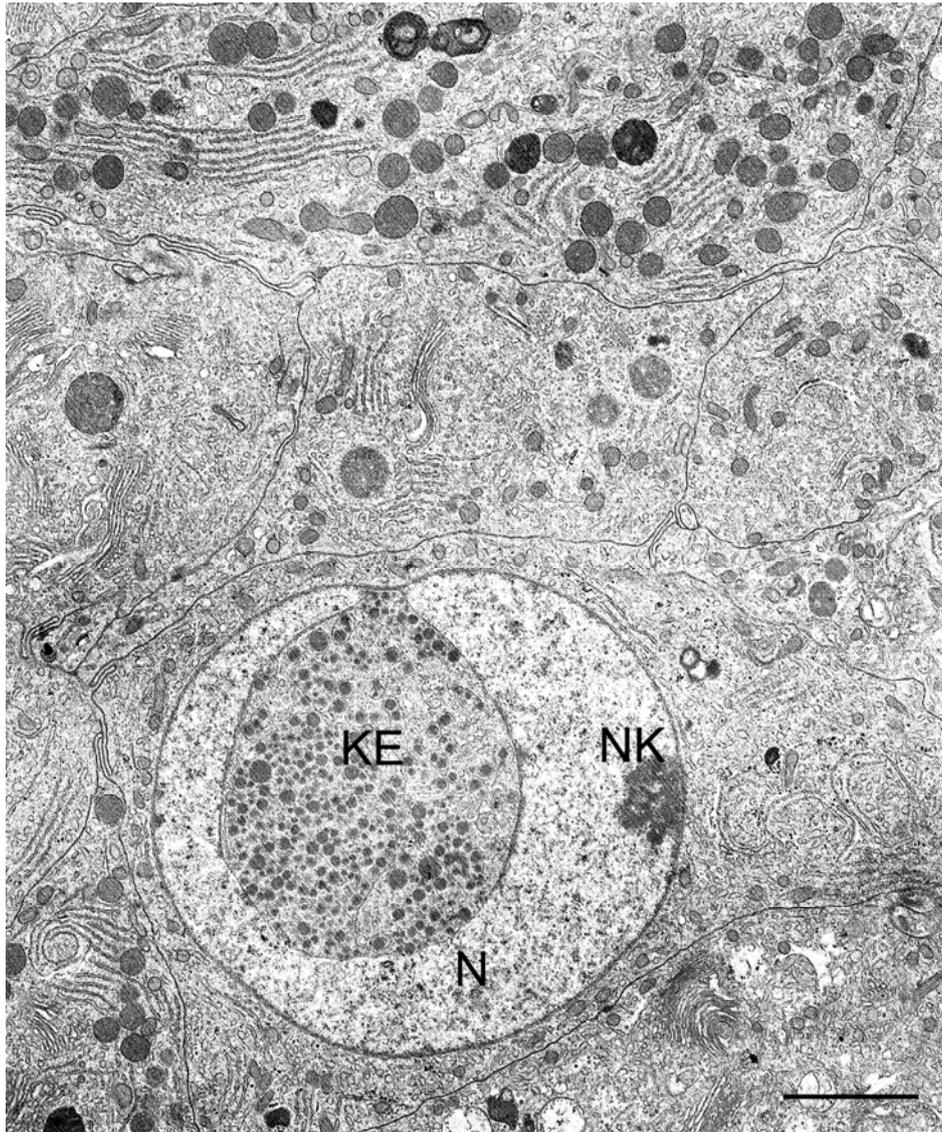


Bild 85: Kerneinschluss im Zellkern einer Hauptzelle des Terminalsegmentes. SB = 3 μ m

Im Zellkern einer Hauptzelle zeigt sich ein auffälliger Kerneinschluss (KE), der kleine elektronendichte Granula beinhaltet und eine Verbindung zur Kernmembran hat. N = Nukleus, NK = Nukleolus

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem histologischen und ultrastrukturellen Aufbau sowie der Glyko- und Immunhistochemie des Nebenhodens des Hundes.

Der Nebenhoden liegt dem Hoden hantelförmig in der Längsrichtung an und ist mit ihm verwachsen beziehungsweise durch ein Gekröse verbunden. Er kann makroskopisch in die drei Abschnitte Caput, Corpus und Cauda epididymidis unterteilt werden. Der Nebenhodenschwanz entlässt den Samenleiter, der geschlängelt in Richtung Leistenspalt zieht. Da diese Einteilung jedoch nur unzureichend die strukturellen und funktionellen Besonderheiten des Nebenhodenganges berücksichtigt, wird hinsichtlich histologischer, histochemischer und ultrastruktureller Gesichtspunkte eine Einteilung in eine unterschiedliche Anzahl von Segmenten vorgeschlagen (Nicander, 1958). Diese ist tierartlich unterschiedlich und charakteristisch, zudem werden für ein und dieselbe Tierart mitunter verschiedene Segmentierungen genannt. Sanchez et al. (1998) schlagen bei Katzen eine Einteilung in vier Regionen vor. Bei Pferd, Schaf und Rind wird von Nicander (1958) eine Einteilung in sechs Segmente zu Grunde gelegt, beim Kaninchen wird der Nebenhoden sogar in acht Abschnitte untergliedert (Nicander, 1957). Beim Eber findet man sechs (Wrobel et al., 1974), bei der Ratte neun (Zunke et al., 1981) und beim Meerschweinchen sieben (Greenberg, 1979) Segmente. Beim Hund werden in der Literatur unterschiedliche Einteilungen genannt. Rován (2001) gibt eine Unterteilung in sechs Segmente vor. Von Schimming et al. (1997) wird eine Segmentierung in fünf histologische Zonen vorgeschlagen. Die Ergebnisse meiner Arbeit bestätigen die von Glover et al. (1971) vorgeschlagene und von Chandler et al. (1981) und Orsi (1983) unterstützte Unterteilung in ein Initial-, Mittel- und Terminalsegment. Die Ductuli efferentes und das Initialsegment bilden beim Hund das Caput epididymidis, das anschließende Corpus wird vom Mittelsegment gebildet und das Terminalsegment entspricht der Cauda epididymidis.

Die Ductuli efferentes durchbrechen am Kopfende des Hodens die Tunica albuginea testis und verbinden das Rete testis mit dem Anfangsabschnitt des Ductus epididymidis. Hemeida et al. (1978) geben für den Hund 13 - 15 Kanälchen an, bei der Katze stellen 14 - 17 Ductuli eine Verbindung her und bei Bulle, Hengst und Eber kommen sogar bis zu 20 Ductuli efferentes vor. Das Epithel der Ductuli efferentes ist mehrreihig und wechselt zwischen hochprismatischen Zellen mit Kinozilienbesatz und niedrige zilienlose Epithelzellen, die stattdessen Mikrovilli an ihrer Oberfläche tragen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Chandler et al. (1981). In der Goldner-Färbung sind die an der Basis der Zilien sitzenden Basalkörper gut zu sehen. Wakui et al. (1996) unterteilen die zilienlosen Zellen der Ductuli efferentes des Hundes in drei Typen, die auf dem unterschiedlichen Vorhandensein von Granula und Vakuolen beruht. Sie vermuten, dass es sich bei den drei Typen um

voneinander völlig unabhängige Zelltypen handeln könnte. Ich konnte in meinen Untersuchungen ebenfalls eine Differenzierung der zilienlosen Zellen vornehmen. Eine genaue Beschreibung derselben folgt in den Ausführungen über die ultrastrukturellen Untersuchungen. Die von Chandler et al. (1981) beim Hund beschriebene dritte Zellart der Ductuli efferentes, die Basalzellen, konnten Wakui et al. (1996) nicht nachweisen. Kinozilien tragende und zilienlose Zellen zeigen bei den konventionellen Färbungen ein unterschiedliches Reaktionsmuster. In der Alcianblau-Färbung beispielsweise, die saure Mukosubstanzen darstellt, reagieren bei pH 2,5 die Kinozilien der hochprismatischen Zellen deutlich positiv und in ihrem Zytoplasma kommen schwach positive Granula vor. Die zilienlosen Zellen zeigen hingegen keinerlei Reaktion. Das unterschiedliche Färbeverhalten dieser beiden Zellarten macht deutlich, dass sie unterschiedliche Funktionen erfüllen. Das Epithel der Ductuli efferentes ist mit $19 \mu\text{m}$ ($\pm 3 \mu\text{m}$) wesentlich niedriger als das des Initialsegmentes ($37 \mu\text{m}$), daher ist dieser Übergang deutlich erkennbar.

Der Nebenhodengang ist mit einem mehrreihigen und hochprismatischen Epithel ausgekleidet, das aus Stereozilien tragenden Hauptzellen und kleinen Basalzellen besteht. Von Schimming et al. (1997) wird zudem das regelmäßige Vorkommen so genannter Apikalzellen beim Hund beschrieben. Diese konnte ich jedoch in keinem Gangabschnitt nachweisen.

Im Initialsegment (durchschnittliche Epithelhöhe $37 \mu\text{m}$ $\pm 13 \mu\text{m}$) liegen die kleinen Basalzellen direkt der Basallamina an. Die Hauptzellen sind hochprismatisch und besitzen weit ins Lumen reichende Stereozilien. Durch die Stereozilien wird die Epitheloberfläche stark vergrößert. Ihre Rolle liegt in der Resorption von Flüssigkeit. Im mittleren Segment reichen die Stereozilien noch weit ins Lumen, wohingegen sie im Terminalsegment wesentlich kürzer sind und sich büstensaumartig darstellen. Die Epithelhöhe ist in meinen Untersuchungen im Mittelsegment am höchsten und beträgt ca. $46 \mu\text{m}$ ($\pm 4 \mu\text{m}$). In diesem Abschnitt liegen die länglichen Kerne der Hauptzellen auf gleicher Höhe zentral im Epithel, dagegen scheinen sie im Terminalsegment in unterschiedlicher Höhe zu liegen. Zudem ist hier die Epithelhöhe mit durchschnittlich $31 \mu\text{m}$ ($\pm 5 \mu\text{m}$) am geringsten. Der deutlich kürzere Stereozilienbesatz und die runden Zellkerne der Hauptzellen erlauben eine klare Abgrenzung zum Mittelsegment. Diese histologischen Merkmale werden auch von anderen Autoren beschrieben (Chandler et al., 1981). Schimming et al. (1997), die beim Hund eine Unterteilung in fünf Nebenhodensegmente zu Grunde legen, geben eine kontinuierliche Zunahme des Lumens von proximal nach distal an. Der Durchmesser nimmt von $126 \mu\text{m}$ ($\pm 8 \mu\text{m}$) im ersten bis ca. $600 \mu\text{m}$ ($\pm 32 \mu\text{m}$) im letzten Segment zu. Die Messung der durchschnittlichen Luminaweite ergab in meinen Untersuchungen $127 \mu\text{m}$ ($\pm 23 \mu\text{m}$) im Initialsegment, $120 \mu\text{m}$ ($\pm 30 \mu\text{m}$) im Mittelsegment und $321 \mu\text{m}$ ($\pm 95 \mu\text{m}$) im Endsegment und weicht damit von diesen Angaben deutlich ab. Der Lumendurchmesser ist im

Terminalsegment mit ca. 321 µm am weitesten. Auch sind hier immer massenhaft Spermien zu finden, was für die bereits häufig in der Literatur beschriebene Speicherfunktion des Terminalsegmentes spricht und die Untersuchungen von Chandler et al. (1981) bestätigt. Die Anzahl der das Epithel des Ductus epididymidis umgebenden Muskelzellagen nimmt, in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Chandler et al. (1981,) in meinen Untersuchungen im Verlauf des Nebenhodenganges von proximal nach distal zu. In den Ductuli efferentes und im Initialsegment sind zwei bis drei Lagen dünner glatter Muskelzellen vorhanden, im Terminalsegment sind bis zu fünf Muskelzellschichten erkennbar. Nach Wrobel (1990) kontrahiert sich die Muskulatur des Initial- und des Mittelsegmentes autonom auf Dehnungsreize, wohingegen sich die des Terminalsegmentes reflektorisch während der Ejakulation kontrahiert

Durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten die lichtmikroskopischen Beobachtungen bestätigt und präzisiert werden. Das Epithel der Ductuli efferentes besteht aus Zilienzellen mit Kinozilien und zilienlosen Zellen, deren Oberfläche durch eine Vielzahl von Mikrovilli vergrößert wird. In Übereinstimmung mit Untersuchungen von Goyal (1980) und Goyal und Hrudka (1981) beim Rind können in der vorliegenden Arbeit die zilienlosen Zellen in drei Subtypen klassifiziert werden. Typ I Zellen enthalten weder Granula noch Vakuolen, in Typ II Zellen kommen zahlreiche zytoplasmatische Granula vor und Typ III Zellen sind reich an Vakuolen. Ilio et al. (1994) legen beim Hund eine Unterteilung in vier Subtypen zugrunde, wobei sie die Lokalisation der Vakuolen und Granula basal oder apikal mit einbeziehen. In meinen Untersuchungen ist der Zellkern der Typ II Zellen kleiner und weniger gelappt als der der Vakuolen enthaltenden zilienlosen Zellen. Ansonsten verfügen die drei Zelltypen über die gleichen ultrastrukturellen Merkmale (Goyal, 1980; Alkafafy, 2005). Die luminale Oberfläche ist mit zahlreichen Mikrovilli ausgestattet. Apikale Protrusionen, wie sie von Alkafafy (2005) beim Rind beschrieben wurden, konnte ich beim Hund nicht finden. Jedoch weisen zahlreiche kleine Bläschen im Apikalbereich auf aktive Mikropinozytose hin. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen am Nebenhoden des Rindes ist in den Ductuli efferentes des Hundes der Golgi-Apparat wenig entwickelt und es liegt nur eine geringe Menge von endoplasmatischem Retikulum vor. Lopez et al. (1989) beschreiben dagegen beim Pferd einen prominent entwickelten Golgi-Apparat mit zahlreichen Vesikeln. Zilienzellen können durch ihre Kinozilien und die apikale Lokalisation ihres Zellkerns, der ovoid und heterochromatisch ist, charakterisiert werden. Zudem besitzen sie unterhalb der Kinozilien Basalkörperchen. Chandler et al. (1981) fanden in ihren Untersuchungen am Nebenhoden des Hundes in den Ductuli efferentes Zellen, die sowohl Mikrovilli als auch Kinozilien besitzen. In der vorliegenden Arbeit konnte ich eine Kombination dieser Oberflächenstrukturen in den Ductuli efferentes nicht ausmachen. Übereinstimmend mit Untersuchungen von Goyal und Hrudka (1981) beim Rind kommen in

den Zilienzellen des Hundes zahlreiche längliche Mitochondrien im apikalen Zytoplasmabereich vor. Der Golgi-Apparat ist nur wenig entwickelt. In der Literatur wird das Vorkommen einer dritten Zellart im Epithel der Ductuli efferentes, den Basalzellen, kontrovers diskutiert. Goyal und Hrudka (1981) fanden beim Rind organellenreiche Basalzellen. Abweichend hiervon kommen in Untersuchungen von Alkafafy (2005) keine Basalzellen vor. Lopez et al. (1989) fanden beim Pferd Basalzellen, die in ihrem Zytoplasma Einschlüsse beinhalten und mit den basalen Anteilen der Hauptzellen Verbindungen eingehen. Chandler et al. (1981) berichten in ihren Untersuchungen am Nebenhoden des Hundes über das Vorkommen von Basalzellen im Epithel der Ductuli efferentes. Sie beschreiben diese als weitgehend inaktive Zellen, die viel Glykogen enthalten. Ich konnte in meinen Untersuchungen keine Basalzellen im Epithel der Ductuli efferentes finden. Eingelagertes Glykogen kommt im Zytoplasma der Zilienzellen und in dem der zilienlosen Zellen vor.

Das Epithel des Nebenhodens besteht aus regelmäßig vorkommenden Haupt- und Basalzellen und wird allgemein als zweireihiges, hochprismatisches Epithel klassifiziert. Die hochprismatische Zellen machen den Hauptanteil aus. Zudem kommen vereinzelt Apikalzellen, Lymphozyten und Makrophagen vor (Chandler et al., 1981; Sinowatz, 1981). Bezüglich ihrer Ausstattung mit Organellen, ihrer Größe und Lokalisation im Epithel bestehen segmentale Unterschiede, die auf unterschiedliche zelluläre Aufgaben und Funktionen in den verschiedenen Abschnitten des Nebenhodens hinweisen.

Die kleineren Basalzellen sind im Verlauf des Ductus epididymidis weitgehend einheitlich ausgebildet. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen ergaben in meiner Arbeit eine nur mäßige Ausstattung der Basalzellen mit Zellorganellen. Sie enthalten in allen Abschnitten einen kleinen Golgi-Apparat, wenige längliche und runde Mitochondrien und vereinzelt Vakuolen. Auch Schimming et al. (2001) berichten in ihrer Arbeit über den Nebenhoden des Hundes von nur wenigen Organellen im Zytoplasma der Basalzellen. Der Anteil an Zytoplasma, das den Zellkern umgibt, ist relativ gering und zeigt in den ersten beiden Abschnitten Ausläufer in Richtung der Zellkerne der Hauptzellen. Das Zytoplasma der Basalzellen ist weit weniger elektronendicht als das der Hauptzellen und kann daher deutlich von diesem abgegrenzt werden. Der Zellkern ist ovoid geformt und zeigt im Initialsegment teilweise Einkerbungen. Die Basalzellen sitzen der Basalmembran in allen Abschnitten direkt auf. Zwischen die Basalzellen schiebt sich regelmäßig Zytoplasmafortsätze der Hauptzellen. Die Basalzellen erreichen, wie schon bei Schimming et al. (2001) beschrieben, das Lumen nicht. Auch beim Rind (Sinowatz, 1981) und beim Pferd (Arrighi et al., 1993) wird von einer nahezu gleichbleibenden Form und Lage sowie spärlichen Organellenausstattung der Basalzellen berichtet. Im Terminalsegment kommen in meinen Untersuchungen im Zytoplasma der Basalzellen Glykogenansammlungen vor, die sich als stark elektronendichte

Granula darstellen. Glykogen gilt als wichtigstes Speicherpolysaccharid in tierischen Zellen und ist die energiereiche Speicherform der Glukose. Zur Funktion der Basalzellen gibt es in der Literatur verschiedenste Angaben, gesichert ist bis heute keine. Hamilton (1972) und Chandler et al. (1981) beobachteten Mikropinozytose an den basalen Membranen der Basalzellen. Sie stellen die Vermutung auf, dass Basalzellen Transportfunktion haben könnten. An den Basalzellen des Hundes wies in der vorliegenden Arbeit nichts auf Mikropinozytose im Basalbereich hin. Auch die Meinung, dass Basalzellen eine Art Vorläuferzellen der Hauptzellen darstellen, hat wenig Zustimmung erhalten. Sinowatz (1981) konnte keinerlei Übergangsformen zwischen Basalzellen und Hauptzellen beim Rind nachweisen. Weiterhin wurde postuliert, Basalzellen hätten Stützfunktion für das Epithel. Da diese jedoch zum Teil nur geringen Kontakt zur Basalmembran haben und zudem deutlich kleiner sind als die Hauptzellen, erscheint dies eher unzutreffend. Die hochprismatischen Hauptzellen weisen im Verlauf des Nebenhodenganges deutliche Unterschiede in ihrer Morphologie auf. Dies weist möglicherweise auf spezielle Zelleistungen der Hauptzellen in den einzelnen Abschnitten hin (Sinowatz, 1981). Die Hauptzellen reichen von der Basallamina bis zum Lumen und besitzen auf ihrer Oberfläche Stereozilien, die unterschiedliche Höhen in den einzelnen Segmenten des Nebenhodenganges haben. Die Höhe der Stereozilien nimmt generell nach distal hin ab. Bei den Stereozilien handelt es sich um sehr lange Mikrovilli, die biegsam sind und der Oberflächenvergrößerung dienen. Vermutlich liegt ihre Funktion im Bereich der Flüssigkeitsresorption und Sekretion (Geneser, 1990). Im Initialsegment reichen sie weit ins Lumen. Dies spricht für umfangreiche Transportvorgänge zwischen Lumen und Epithel und bestätigt die Hypothese, dass in den proximalen Abschnitten der Großteil der Rete testis-Flüssigkeit aufgenommen wird (Sinowatz, 1981). Unterstützend konnte ich in meinen Untersuchungen am Nebenhoden des Hundes in den ersten Segmenten mikropinozytotische Aktivität an der apikalen Epithelmembran nachweisen. Im apikalen Zytoplasmabereich sind viele Bläschen und Vesikel vorhanden und direkt an der Epithel-Lumen-Grenze sind zahlreiche kleine, sich mitunter ins Lumen öffnende Bläschen sichtbar. Im Terminalsegment weisen schon die deutlich kürzeren Stereozilien auf ein geringeres Maß der Austauschprozesse zwischen Lumen und Epithel als in den ersten Segmenten hin. Zudem sind in der zytoplasmatischen Apikalzone weit weniger Vesikel zu sehen als im Initial- und Mittelsegment. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Sinowatz (1981) bei Untersuchungen am Nebenhoden des Rindes und unterstützt die These, dass die Hauptfunktion des Nebenhodenschwanzes in der Speicherung der Spermien besteht und Resorptionsvorgänge hier nur in geringerem Maße ablaufen. Die Hauptzellen stehen apikal durch „junctional complexes“ miteinander in Verbindung, welche in allen Segmenten zahlreich ausgebildet sind. Damit ist nach Geneser (1990) der interzelluläre Weg für Transportstoffe verschlossen und aufgenommene Stoffe

müssen transzellulär passieren.

Die Zellkerne der Hauptzellen wiesen in allen Abschnitten unterschiedliche Gestalt auf, jedoch sind sie nie, wie zum Beispiel von Hamilton (1972) beim Kaninchen und Chinchilla oder von Sinowatz (1981) beim Rind beschrieben, gelappt oder gefurcht. Im Initialsegment liegt der längsovale Kern im basalen Drittel des Zytoplasmas. Er enthält ein bis zwei große Nukleoli und zwei bis fünf weniger elektronendichte, auffällige Kerneinschlüsse. Diese kommen auch, wenn auch in geringerer Zahl, im Mittelsegment vor. Im Terminalsegment konnte ich sie nicht mehr nachweisen. Sie wurden bereits 1964 von Nicander und 1981 von Chandler et al. beschrieben. Nicander teilt die Kerneinschlüsse in drei unterschiedliche Gruppen ein: große, Granula-enthaltende Vesikel, kleinere periphere Vesikel und solche ohne Granula. Chandler et al. (1981) fanden in ihren Untersuchungen beim Hund, dass diese „bizarren Kerneinschlüsse“ unterschiedliche Form annehmen und hauptsächlich membrangebunden sind. Sie treten gehäuft im Caput auf und sind nur gelegentlich in den anderen Abschnitten zu finden. In meinen Untersuchungen sind sie überwiegend membranbegrenzt, jedoch immer rund und oftmals enthalten sie noch kleine, elektronendichte Granula. Bei meinen elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden nur Nebenhoden von Hunden der Rasse Labrador und Labrador-Mischlinge verwendet. Da Chandler et al. (1981) jedoch Hunde verschiedener Rassen untersucht haben und Einschlusskörper zudem auch beim Pferd (Lopez et al., 1989) beschrieben wurden, ist nicht davon auszugehen, dass es sich bei den Kerneinschlüssen um rassespezifische Veränderungen handelt.

In den Hauptzellen aller Segmente kommt endoplasmatisches Retikulum vom rauhen Typ vor. Es ist im Initial- und vor allem gehäuft im Terminalsegment im basalen Zytoplasma in direkter Verbindung zum Zellkern lokalisiert. Im Mittelsegment ist das Vorkommen reduziert, jedoch treten hier vereinzelt kurze Zisternen im apikalen Zytoplasmabereich auf. Die große Anzahl von Zisternen, vor allem im Terminalsegment, deutet auf eine gesteigerte Proteinsyntheseleistung in diesem Bereich hin. In meinen Untersuchungen konnte glattes endoplasmatisches Retikulum nicht eindeutig lokalisiert werden, wohingegen Chandler et al. (1981) in ihrer Arbeit glattes endoplasmatisches Retikulum in den Ductuli efferentes und im Initialsegment fanden.

Vor allem im Mittelsegment nimmt der Golgi-Apparat einen großen supranukleären Bereich ein, in dem sich lang gezogenen, dunkle Dictyosomen um eine große Zahl heller, kleiner Bläschen anordnen. Daneben kommen auch vereinzelt größere Vesikel vor. Im Terminalsegment umschließt der Golgi-Apparat weniger Vesikel als in den vorherigen Abschnitten. Auch Schimming et al. (2001) bestätigen das Vorkommen einer großen supranukleären Golgi-Zone beim Hund. Ebenso wird beim Rind von einem umfangreichen und gut ausgebildeten Golgi-Apparat berichtet (Sinowatz, 1981).

Die Mitochondrien der Hauptzellen zeigen hinsichtlich ihrer intrazellulären Verteilung und ihrer Form in den einzelnen Segmenten und auch innerhalb des Zytoplasmas Unterschiede: im Terminalsegment kommen im apikalen Zytoplasma und basal vermehrt runde Mitochondrien vor, in Zellkernnähe sind diese länglich. Im Mittelsegment wandelt sich das Bild: in der apikalen Zone sind zahlreiche längliche Mitochondrien lokalisiert, dazwischen lagern sich vereinzelt rundliche. Im Terminalsegment finden sich nur einzelne längsovale Mitochondrien, es überwiegt die runde Form. Die morphologische Heterogenität ist nach Sinowatz (1981) schwer zu erklären. Abweichend von meinen Ergebnissen berichten Schimming et al. (2001) beim Hund von Mitochondrien, die hauptsächlich entlang der Zisternen des Golgi-Apparates und zwischen den Ansammlungen von rauem endoplasmatischem Retikulum liegen. Auch beim Rind (Alkafafy, 2005) und bei der Katze (Arrighi, 1986) wird von unterschiedlichen Erscheinungsformen und Lokalisationen im Zytoplasma berichtet. Nach Geneser (1990) liegen Mitochondrien gleichmäßig im Zytoplasma verteilt vor. In Bereichen besonders hohen Energiebedarfs ist ihr Vorkommen jedoch konzentriert.

Im Terminalsegment fallen zudem in meinen Untersuchungen vermehrt Lysosomen und eine große Anzahl lysosomaler Abbauprodukte auf.

Neben den Basal- und Hauptzellen kommen im Epithel noch weitere Zellarten wie Apikalzellen und Lymphozyten vor. Apikalzellen konnte ich, entgegen den Angaben von Schimming et al. (2001), nicht als regelmäßig anzutreffende Zellart finden. Lymphozyten liegen in meinen Untersuchungen häufig in direkter Nähe zu Basalzellen. Schimming et al. (2001) erwähnen zudem das Vorkommen sogenannter „Clear-Zellen“ im Nebenhoden. Übereinstimmend mit Chandler et al. (1981) kann ich eine solche Zellart im Nebenhoden des Hundes nicht identifizieren.

Das Nebenhodenepithel wird durch eine in allen Abschnitten regelmäßige Basallamina vom darunter liegenden Gewebe getrennt. Sie verläuft mitunter leicht geschlängelt.

Bei den immunhistochemischen Nachweisen reagieren die verschiedenen Nebenhodenabschnitte oft unterschiedlich, was die regionale Spezialisierung des Epithels unterstreicht. Das Zytoskelett einer Zelle setzt sich aus drei Komponenten zusammen: Mikrotubuli (25 nm Durchmesser), Mikrofilamente (7 nm Durchmesser) und Intermediärfilamente (10 nm Durchmesser). Es passt sich effizient den zellulären Erfordernissen an und spielt unter anderem eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zellform, bei Bewegungsvorgängen und bei Transportprozessen im Zytoplasma. Zytoskelettproteine können weiter als Differenzierungsmarker herangezogen werden, um die Herkunft einer Zelle zu bestimmen. Die Gruppe der Intermediärfilamente ist chemisch nicht einheitlich, so dass sich fünf verschiedene Proteinklassen unterscheiden lassen: Vimentin,

Desmin, Cytokeratin, Neuro- und Gliafilamente. In der vorliegenden Arbeit zeigte das Epithel der Ductuli efferentes keine Reaktion mit dem Vimentinantikörper. Auch die Hauptzellen erscheinen in allen drei Segmenten immunnegativ. Dagegen reagierte bei einigen der untersuchten Tiere das Zytoplasma der Basalzellen. Eine Rasse- oder Altersabhängigkeit in der Ausbildung des Zytoskelett konnte ich am Nebenhodenepithel nicht feststellen. Beim immunhistochemischen Nachweis von Vimentin reagiert das Initialsegment und auch das Mittelsegment deutlich positiv. Bei Untersuchungen von Wakui et al. (1994) am Nebenhoden des Hundes reagierten die Ductuli efferentes immunnegativ. Dies deckt sich mit meinen Ergebnissen. Im Initial-, Mittel- und Terminalsegment beobachteten sie jedoch eine positive Vimentin-Reaktion im basalen Zytoplasmaanteil der Hauptzellen, die von proximal nach distal abnahm. Das Terminalsegment wies auch bei ihnen keine Immunreaktion auf Vimentin auf. Auch die Basalzellen waren Vimentin negativ. Im Unterschied zu den genannten Autoren konnte ich in meinen Untersuchungen die immunpositive Reaktion auf Vimentin eindeutig dem Zytoplasma der Basalzellen zuordnen. Auch beim Kater wird von einer deutlichen Anfärbung der Basalzellen mit dem Vimentin-Antikörper im Nebenhoden berichtet (Sanchez et al., 1998; Ruff, 2005). Palacios et al. (1993) beschreiben in ihrer Arbeit über den Nebenhoden des Menschen, dass das Zytoplasma der Hauptzellen im Apikalbereich beim Vimentin-Nachweis positiv reagiert. Es kommen auch positive Areale im Zytoplasma der Basalzellen vor. In meinen Untersuchungen zeigen sich außerdem eine in allen Abschnitten deutlich positiv reagierende Muskelzellige und Basalmembran. Außerhalb des Epithels reagieren die Gefäßendothelien immunpositiv. Dies stimmt mit allen Literaturangaben überein. Die abweichenden Angaben innerhalb einer Spezies können auf unterschiedliche Probengewinnung, Fixierung und Unterschiede bei den verwendeten Antikörpern zurückgeführt werden. Cytokeratine stellen eine Proteinfamilie dar, die Intermediärfilamente in Epithelien und anderen Zellarten ausbilden. Bis heute sind 20 verschiedene Cytokeratine bekannt, die in die saure Typ I- und die basische Typ II- Gruppe eingeteilt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Cytokeratin-Antikörper verwendet, der sowohl gegen basische als auch gegen saure Keratine gerichtet ist. Die zilienträgenden Zellen der Ductuli efferentes zeigen dabei eine stark positive Immunreaktion. Auch die Basalzellen reagieren in allen drei Gangabschnitten mit dem Pancytokeratin-Antikörper. Das Zytoplasma der Hauptzellen färbt sich immunhistochemisch nicht an, lediglich der lumenseitige Epithelbereich zeigt eine positive Reaktion. Dies stimmt größtenteils mit den Untersuchungen von Wakui et al. (1994) überein. Demnach ist Cytokeratin in den Ductuli efferentes in den Zilienzellen zu finden und im Nebenhodengang in den apikalen Epithelanteilen. Die Basalzellen reagieren bei den Untersuchungen von Wakui et al. (1994) im Terminalsegment nicht mehr mit dem Antikörper, wohingegen in meinen Untersuchungen eine deutliche Pancytokeratin-Reaktion erkennbar ist. Palacios et al. (1993) untersuchten ebenfalls die Expression von Cytokeratin beim

Menschen und fanden heraus, dass das Färbeverhalten nach distal deutlich zunimmt. Sie nehmen an, dass dies mit einer Anpassung des Zytoskeletts der Epithelzellen an die größere mechanische Beanspruchung während der Ejakulation zusammen hängt, die besonders im kaudalen Bereich des Nebenhodens das Epithel des Ductus epididymidis verformt. Laminine sind Bestandteil der extrazellulären Matrix. Sie bilden zusammen mit Kollagen IV und Proteoglykanen die Basalmembran (Ekblom, 1996). Laminine fungieren in der extrazellulären Matrix als Adhäsionsproteine: sie interagieren zum einen mit Bestandteilen der Matrix, zum anderen mit Zellrezeptoren. Die Basalmembran, die das Epithel mit dem darunter liegenden Gewebe verbindet, kann ultrastrukturell in eine Lamina rara interna, Lamina densa und Lamina rara externa unterteilt werden. Bei Rüden zeigt sich in allen Abschnitten des Nebenhodens eine deutlich Laminin-positive Basalmembran. Auch die Basalmembranen der Gefäße und Nerven reagieren positiv. Zudem kommt Laminin auch in der Basalmembran der glatten Muskelzellen vor. Die Stärkenzunahme der Muskelzelllagen nach distal hin ist deutlich erkennbar. Dasselbe Reaktionsmuster beobachtete Ruff (2005) beim Kater und auch beim Rind reagierte die Basalmembran der Ductuli efferentes und der einzelnen Nebenhodenabschnitte durchgehend positiv (Alkafafy, 2005). Palacios et al. (1993) untersuchten den Nebenhoden des Menschen und kamen zu demselben Ergebnis. Aktin gehört, genau wie Myosin, zu den Mikrofilamenten und stellt ein kontraktiles Protein dar. In Säugetiergeweben können sechs verschiedene Aktin-Isoformen unterschieden werden, vier davon kommen als muskuläre α -Isoformen vor: „ α -smooth-muscle-actin (α -sma)“ und „ γ -smooth-muscle-actin“ in glatten Muskelzellen, „ α -skeletal-actin“ im Skelettmuskel und „ α -cardiac-actin“ im Herzmuskel (Vandekerckhove et al., 1981). Untersuchungen von Skalli et al. (1986) haben gezeigt, dass α -sma-Antikörper am besten zur Untersuchung der glatten Muskulatur in normalen und pathologisch veränderten Geweben geeignet sind. In meinen Untersuchungen zeigten die das Epithel umgebende Muskelzelllagen durchgehend eine stark positive Reaktion beim immunhistochemischen Nachweis von Aktin.

Chromogranin A gehört zusammen mit Chromogranin B und Sekretogranin II zu den klassischen Graninen. Chromogranin A wird als Marker endokriner Zellen und standardisiert zur immunhistochemischen Analyse neuroendokriner Tumore angewandt. Arrighi et al. (2004), die das Vorkommen endokriner Zellen im Hoden und Nebenhoden verschiedener Ungulaten untersuchten, fanden heraus, dass im männlichen Urogenitaltrakt nur sehr vereinzelt Zellen mit positiver Immunantwort auf Chromogranin A vorkommen. Steffl et al. (2003) fanden bei ihren Untersuchungen am Eileiterepithel des adulten Rindes heraus, dass Chromogranin A ein sehr guter Marker für die ziliotragenden Zellen ist. Dies kann ich durch meine Untersuchungen an den Ductuli efferentes des Hundes bestätigen. In der vorliegenden Arbeit färbten sich beim immunhistochemischen Nachweis von Chromogranin

A die unter der apikalen Zellmembran der Zilienzellen der Ductuli efferentes liegenden Basalkörperchen stark positiv an.

Die Steroidhormone Östrogen und Androgen erreichen die Ductuli efferentes über die Rete testis-Flüssigkeit und den Blutweg. Östrogen wird im männlichen Geschlechtstrakt von Sertoli-, Leydig- und von Keimzellen synthetisiert (Hess et al., 2001). Die Wirkung von Östrogen wird durch einen intrazellulären Rezeptor vermittelt (Pelletier et al., 2000), von dem die Isoformen α und β unterschieden werden können. Beide Rezeptoren liegen im Nebenhoden vor (Hess et al., 1997b), in meiner Arbeit habe ich nur das Vorkommen von Östrogen-Rezeptor α (ER α) untersucht. In zahlreichen Studien an transgenen ER-knockout-Mäusen (α ERKO) und anderen Spezies wurde nachgewiesen, dass die höchste Konzentration des ER α in den Ductuli efferentes vorliegt und dass Östrogen die Reabsorption luminaler Flüssigkeit in den Ductuli efferentes reguliert (Hess et al., 2001; Hess und Bunick et al., 2001). Übereinstimmend hiermit reagieren in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die Kerne der Ductuli efferentes immunpositiv. Eine Unterbrechung der Östrogen-Funktion führt nach Hess et al. (1997a) zu Unfruchtbarkeit, was auf eine essentielle Funktion von Östrogen im männlichen Geschlechtstrakt hinweist. Der Östrogen-Rezeptor α wurde im Nebenhoden einiger Tierarten nachgewiesen und zeigt speziesabhängig ein unterschiedliches Expressionsmuster. In meinen Untersuchungen am Nebenhoden des Hundes zeigt sich eine starke Immunreaktion in den Zellkernen der zilienlosen Zellen und der Zilienzellen der Ductuli efferentes. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Nie et al. (2002) überein, die das unterschiedliche Expressionsverhalten der Östrogenrezeptoren α und β im Reproduktionstrakt von Hund und Katze untersuchten. Beim Hund ergab sich ein einheitlich starkes Färbeverhalten beider Zellarten der Ductuli efferentes, bei der Katze reagierten die Kerne der Zilienzellen jedoch weniger kräftig als die der zilienlosen Zellen. Beim Ziegenbock (Goyal et al., 1997) und Menschen (Ergün et al., 1997) hingegen reagierten die Zilienzellen negativ beim Östrogen-Rezeptor-Nachweis. Im Nebenhodenepithel kann in meinen Untersuchungen keine Expression des Östrogen-Rezeptors nachgewiesen werden. Im Interstitium kommen hingegen schwach positive Zellkerne vor. Zu dem weitgehend gleichen Ergebnis kamen Nie et al. (2002). Bei Katzen konnten sie aber positive Reaktionen in den Epithelzellen von Corpus und Cauda nachweisen, die Caput-Region war teilweise negativ. Tekpetey et al. (1988) konnten den Östrogen-Rezeptor beim Schafbock in allen Abschnitten des Nebenhodens in den Zellkernen der Hauptzellen lokalisieren. Die Reaktionsintensität stieg nach distal hin an. Am Nebenhoden des Pferdes wurde zudem eine altersabhängige Lokalisation von ER α festgestellt (Parlevliet et al., 2005). Das bei den untersuchten Tierarten festgestellte differente Vorkommen des Östrogen-Rezeptor α im männlichen Reproduktionstrakt könnte auf regional spezifische Funktionen hinweisen. Androgen-Rezeptoren vermitteln im Körper

die Wirkung von Testosteron und seiner Metaboliten. Das Hauptandrogen, das für das Erhalten der Struktur des Nebenhodens und dessen Funktionen verantwortlich ist, ist nach Robaire et al. (1995) der Metabolit 5 α -Dihydrotestosteron (DHT). Androgene können als lipophile Moleküle die Zellmembranen passieren und im Zytoplasma an den Androgen-Rezeptor binden. Dieser Komplex wird dann in den Kern transportiert und beeinflusst dort die Transkription verschiedener Proteine (Zhu et al., 2000). Die Hauptfunktion des Nebenhodens ist die Reifung der Spermien. Dafür stehen die Spermien in ständigem Austausch mit der sie umgebenden Flüssigkeit, die durch Sekretions- und Absorptionsvorgänge des Nebenhodenepithels verändert wird. Einige dieser Vorgänge sind Androgen-abhängig (Brooks, 1983). Androgen-Rezeptoren wurden bereits im Nebenhoden verschiedener Spezies beschrieben. Goyal et al. (1997) fanden in ihren Untersuchungen am Nebenhoden des Ziegenbockes heraus, dass in den Ductuli efferentes die Kerne der zilienlosen Zellen genau wie die der Zilienzellen und die Kerne der meisten glatten Muskelzellen sowie der Fibroblasten deutlich positiv auf den immunhistochemischen Nachweis des Androgen-Rezeptors reagieren. Im Nebenhoden, den sie in die Abschnitte I bis V unterteilen, ist die Reaktion in den Regionen II bis IV und in den Kernen der Hauptzellen am intensivsten. Auch bei Untersuchungen von Tekpetey et al. (1989) am Schafbock-Nebenhoden wurde die höchste Konzentration an Androgen-Rezeptoren im mittleren und distalen Caput sowie im mittleren Corpus bestätigt. Parlevliet et al. (2005) fanden in ihren Untersuchungen an Nebenhoden von Pferden heraus, dass der Androgen-Rezeptor altersunabhängig in den Hauptzellen aller Gangabschnitte lokalisiert ist. Sie schließen daraus, dass Androgen in allen Entwicklungsstadien des Nebenhodens für dessen Funktion und Entwicklung erforderlich ist. In meinen Untersuchungen zeigt sich eine starke Expression des Androgen-Rezeptors in den Haupt- und abgeschwächt in den Basalzellen aller Abschnitte des Ductus epididymidis des Hundes. Auch die Zellkerne in den Ductuli efferentes reagieren deutlich positiv, wobei zwischen den zilienlosen Zellen und den Zellen mit Kinozilienbesatz keine Reaktionsunterschiede beobachtet werden können. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen von Goyal et al. (1997) beim Ziegenbock überein, weicht jedoch von denen von Ruff (2005) beim Kater beschriebenen ab: hier zeigten die Ductuli efferentes beim immunhistochemischen Nachweis von Androgen-Rezeptor keine Reaktion. Ungefroren et al. (1997) fanden bei Untersuchungen am Nebenhoden des Menschen heraus, dass Signale für Androgen-Rezeptoren im Interstitium und in den Blutgefäßen fehlen. Übereinstimmend mit Goyal et al. (1997) kommt in meinen Untersuchungen jedoch eine deutliche Expression des Androgen-Rezeptors in den Kernen der glatten Muskelzellen und Fibroblasten des Interstitiums vor.

Der glykohistochemische Nachweis von Kohlenhydraten im Nebenhoden wurde mit FITC-konjugierten Lektinen durchgeführt. Während die PAS-Reaktion und die Färbung mit

Alcianblau nur einen relativ unspezifischen Nachweis von Kohlenhydraten liefern, sind Lektine aufgrund ihrer selektiven Bindung an reaktive Zucker geeignete Hilfsmittel zur histologischen Lokalisation und Identifizierung von Zuckerstrukturen auf Zelloberflächen und in der Zelle (Gabiuss et al., 1988). Die zur Untersuchung verwendeten 14 Lektine (Con A, LCA, PSA, PNA, GSL I, RCA, SBA, SJA, DBA, WGA, WGAs, UEA, PHA E, PHA L) zeigen, mit Ausnahme von SBA, im Nebenhoden des Hundes ein charakteristisches Bindungsmuster. Die Fixierung des Gewebes beeinflusst nach Söderstöm et al. (1984) die Bindungsaktivität der Lektine. Sie fanden in Untersuchungen am Hoden der Ratte heraus, dass die Bindung der Lektine PNA, WGA, Con A, RCA, SBA, DBA und UEA in Bouin-fixiertem Gewebe deutlich höher ist gegenüber Formalin-fixiertem Gewebe. Auch innerhalb einer Fixierung zeigen die Lektine unterschiedliches Bindungsverhalten: während PNA sensitiv in Formalin-fixiertem Gewebe bindet, zeigen andere Lektine bei dieser Fixierung abnehmende Bindungsintensität (SBA, DBA und UEA) beziehungsweise binden nicht (Con A, WGA, WGAs und RCA) (Malmi et al., 1988). In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben für die glykohistochemischen Untersuchungen in Bouin'scher Lösung fixiert. Dies muss bei den folgenden Gegenüberstellungen von Lektinbindungsstellen des Hundes mit Ergebnissen im selben Gewebe anderer Spezies kritisch berücksichtigt werden.

Mit den genannten Lektinen konnte ich im Nebenhoden des Hundes folgende Zuckerstrukturen nachweisen: Mannose, Fucose, D-Galaktose, N-Acetylgalaktosamin, N-Acetylglukosamin und komplexe Kohlenhydrate. Im Initial- und Mittelsegment zeigten die bevorzugt an N-Acetylgalaktosamin bindenden Lektine (DBA, SBA, SJA und GSL I) eine schwach positive Reaktion, was auf nur geringe Mengen dieser Glykostrukturen in den genannten Segmenten schließen lässt. Im Folgenden gehe ich detailliert auf die einzelnen Lektinbindungen ein. Con A ist ein D-Mannose/D-Glukose-bindendes Lektin. In meinen Untersuchungen hat Con A in den Ductuli efferentes sowohl in den zilienlosen Zellen als auch in den Zilienzellen reagiert. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen am Nebenhoden der Katze (Prem, 1992). Auch beim Kater reagieren beide Zellarten des Epithels. Abweichend hiervon berichten Kuhrau (1993) beim Pferd und Alkafafy (2005) beim Rind von einer positiven Reaktion der zilienlosen Zellen und einer negativen Reaktion der Zilienzellen. Beim Menschen findet hingegen keine Bindung von Con A statt (Arenas et al., 1996). LCA und PSA binden spezifisch an Mannose und gehören derselben Gruppe an wie Con A. Beide Lektine führen in meinen Untersuchungen zu einer Anfärbung des apikalen Epithelsaumes der Ductuli efferentes. Bei LCA kommt es, wie beim Rind (Alkafafy, 2005), zu einer positiven Reaktion der Zilienzellen, die zilienlosen Zellen reagieren negativ. WGA gehört zu den N-Acetyl-D-Glukosamin-bindenden Lektinen. Es zeigt in meinen Untersuchungen am apikalen Epithelsaum der Ductuli efferentes eine starke Fluoreszenz auf, im basalen Zytoplasmabereich dagegen eine schwache. Wakui et al. (1996), die die

zilienlosen Zellen beim Hund in drei unterschiedliche Typen unterteilen, berichten von einer positiven Reaktion der Kinozilien und des apikalen Zytoplasmabereiches der Zilienzellen und der zilienlosen Zellen. Auch beim Kater reagiert der apikale Zellbereich (Prem, 1992). WGAs zeigt eine deutlich positive Reaktion im apikalen Zellbereich und in den Kinozilien. Ein auffälliges Reaktionsmuster zeigt das zu den L-Fukose-bindenden Lektinen gehörende UEA in den Ductuli efferentes: das gesamte Zytoplasma der zilientragenden Zellen und die Kinozilien reagieren mit einer stark positiven, granulären Fluoreszenz. Zilienlose Zellen weisen hingegen keine Bindungsstellen für UEA auf, wodurch das Epithel der Ductuli gestreift erscheint. Beim Menschen reagieren die Ductuli efferentes mit UEA nicht (Arenas et al., 1996). Beim Kater dagegen kommt es zu einer deutlich positiven Reaktion des apikalen Zellbereiches (Prem, 1992). Lektine die an komplexe Kohlenhydrate binden (PHA E und PHA L) sind nach meinen Untersuchungen im apikalen Epithelbereich und zum Teil auch schwach im Zytoplasma der Ductuli efferentes lokalisiert. PNA und RCA zeigen, abweichend von den Untersuchungen von Wakui et al. (1996), eine stark positive Bindung am apikalen Epithelsaum. Das übrige Zytoplasma der Epithelzellen bleibt ansonsten negativ. Der apikale Epithelbereich weist zudem Bindungsstellen für DBA, GSL I, SBA und SJA auf. Die starke Reaktion vieler Lektine im apikalen Epithelbereich der Ductuli efferentes wurde auch beim Kater beobachtet (Prem, 1992). Sie deutet auf große sekretorische Aktivität in dieser Zone hin und unterstützt die Hypothese von Crabo (1965), dass mehr als 90 % der Rete testis-Flüssigkeit in den Ductuli efferentes reabsorbiert werden.

Die Stereozilien der Hauptzellen zeigen in allen drei Segmenten ein charakteristisches Bindungsmuster für Lektine. Das Initialsegment reagiert mit allen Lektinen außer RCA und den Galaktosamin-bindenden Lektinen (DBA, SBA und GSL I) positiv. Im Mittel- und vor allem im Terminalsegment nimmt die Zahl der Bindungsstellen deutlich ab und die Stereozilien reagieren nur noch mit Con A, PSA, WGA, LCA, PHA E und PHA L. Dies könnte auf eine Spezialisierung bestimmter Segmente hinweisen, die auch bei anderen Spezies nachgewiesen wurde. Sinowatz (1981) konnte am Nebenhoden des Rindes nachweisen, dass bestimmte Segmente ein charakteristisches Enzym an der apikalen Zellmembran aufweisen, wodurch eine Spezialisierung einzelner Abschnitte auf die Resorption ganz bestimmter Substanzen erreicht wird.

Auch die Golgi-Region der Hauptzellen zeigt in der vorliegenden Arbeit segmentale Unterschiede bezüglich ihrer Lektinbindungsstellen. Bei den Lektinen Con A, PSA, UEA, WGA, WGAs, PHA L und DBA ist eine deutliche Fluoreszenz im Initialsegment erkennbar, wohingegen sie in den distalen Abschnitten abnimmt oder ganz verschwindet. D-Galaktose-bindende Lektine reagieren im Initialsegment nicht. Die Lektine LCA, PHA E, GSL I, RCA, SBA, SJA und PNA binden nicht oder reagieren vereinzelt sehr schwach positiv in allen Abschnitten. Abweichend hiervon berichtet Prem (1992) in ihren Untersuchungen am

Nebenhoden des Katers vom Vorkommen von Bindungsstellen der Lektine Con A, DBA, SBA, UEA und WGA in Corpus und Cauda in Bereichen, welche der Lage des Golgi-Apparates entsprechen. Das spricht dafür, dass dem Nebenhodenkopf überwiegend sekretorische und Corpus und Cauda eher resorptive Funktionen zukommen. Arya et al. (1986) untersuchten die Nebenhoden von Gerbil, Meerschweinchen, Maus und Nutria. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Golgi-Zonen der verschiedenen Spezies auch unterschiedliche Bindungsstellen für Lektine aufweisen. Bei Maus, Gerbil und Meerschweinchen reagierten die proximale Abschnitte intensiv mit RCA und WGA, in Nutria und Meerschweinchen reagierten mit diesen Lektinen die weiter distalen Abschnitte. Die im proximalen Abschnitt große Vielzahl der Lektinbindungsstellen im Golgi-Bereich beim Hund unterstützt die von Sinowatz (1981) bestätigte Beteiligung des Golgi-Apparates an der Bildung von Glykoproteinen des Nebenhodens, die als Sekretgranula ins Lumen abgegeben werden. Bei den Bindungspartnern der Lektine im Bereich der Golgi-Zone könnte es sich um Zwischenprodukte einer Glykoproteinsynthese handeln. In meinen elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte ich zeigen, dass die Golgi-Zone im Initial- und Mittelsegment besonders groß ausgebildet ist. Dies unterstützt die Annahme dass vor allem die Anfangssegmente eine hohe sekretorische Aktivität aufweisen. Die nach distal bei allen Lektinen abgeschwächte Bindungsaffinität könnte mit einer abnehmenden Sekretionsleistung im Terminalsegment in Zusammenhang stehen.

Die Basalzellen des Nebenhodenepithels des Hundes weisen im Mittel- und Terminalsegment Bindungsstellen für die Lektine Con A, PSA, UEA, PHA E und PHA L auf. Im Initialsegment war in den Basalzellen nur eine Bindung von Con A zu beobachten. Prem (1992) berichtet von einer positiven Reaktion der Basalzellen mit Con A und WGA im Nebenhoden des Katers und in Untersuchungen von Alkafay (2005) am Nebenhoden des Rindes kommt es zu einer positiven Reaktion mit den Lektinen Con A, WGA, PSA und LCA. Arya und Vanha-Perttula (1985) konnten beim Rind ein ähnliches Bindungsmuster der Lektine RCA, Con A und WGA sowohl in den Basalzellen als auch in den basalen Zytoplasmaanteilen der Hauptzellen feststellen. Sie nahmen an, dass Basalzellen absorptive und digestive Funktion besitzen und die Hauptzellen zu entsorgende Glykoproteine überbringen. Eine solche Beobachtung kann ich in meinen Untersuchungen nicht machen. Basale Zytoplasmaanteile der Hauptzellen reagieren in der vorliegenden Arbeit mit den Lektinen PSA, WGA, PHA E und DBA und damit nicht in Übereinstimmung (außer PHA E) mit der Lektinbindung der Basalzellen.

Lektin-positive intraepitheliale Makrophagen, wie sie von verschiedenen Autoren beschrieben wurden (Goyal, 1985; Sinowatz, 1981), konnten in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Die Basalmembran zeigt in meinen Untersuchungen lediglich eine positive Reaktion mit den Lektinen WGA und WGAs, die an N-Acetyl-D-Glukosamine binden. Die starke Fluoreszenz weist auf einen hohen Gehalt an (D-GlcNAc)²NeuNAc hin. Übereinstimmend hiermit wird beim Rind (Alkafafy, 2005) von WGA-Bindungsstellen der Basalmembran berichtet, ebenso beim Pferd (Kuhrau, 1993) und beim Kater (Prem, 1992). Abweichend von anderen Studien zeigten jedoch in der vorliegenden Arbeit weder das Interstitium noch die darin liegenden Gefäße eine positive Reaktion.

Die im Lumen vorkommenden Spermien weisen Bindungsstellen für die Lektine Con A, PSA, UEA, WGA, WGAs, PHA L, RCA und PNA auf. Mit LCA, DBA, SBA und SJA reagieren sie nicht. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Prem (1992) reagieren die Spermien in allen Segmenten deutlich mit dem Lektin WGA und mit WGAs. Eine schwache, aber in allen Abschnitten gleichmäßige Reaktion zeigen die luminalen Spermien mit Con A und PNA. Das unterschiedliche Reaktionsverhalten der Spermien während ihrer Passage durch die Ductuli efferentes und die einzelnen Nebenhodenabschnitte gibt einen Hinweis auf Veränderungen der kohlenhydrathaltigen Strukturen der Spermienmembran. Um die einzelnen Bereiche eines Spermiums genau untersuchen zu können, müssten Untersuchungen von Ausstrichen mit Spermien aus den einzelnen Segmenten durchgeführt werden.

Bei den durchgeführten elektronenmikroskopischen, immun- und glykohochemischen Untersuchungen konnte ich keinen Einfluss von Alter und Rasse der untersuchten Hunde auf die Struktur des Nebenhodens feststellen. Die Funktionen des Nebenhodens sind vielfältig und noch immer nicht gänzlich geklärt. Die hier ermittelten Ergebnisse am Nebenhoden des Hundes können vor allem für weiterführende Untersuchungen des noch immer nicht genau aufgeklärten Ablaufs der epididymalen Spermienreifung herangezogen werden.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden mit licht- und elektronenmikroskopischen Methoden sowie mit immun- und glykohistochemischen Techniken die Nebenhoden von 10 klinisch gesunden Hunden unterschiedlicher Rassen und Altersstufen untersucht.

Der Aufbau des Nebenhodens des Hundes entspricht grundsätzlich dem der anderen Säugetiere. Auf der Grundlage histologischer und zytologischer Merkmale kann der Nebenhoden des Hundes in drei verschiedene Gangabschnitte unterteilt werden: das Caput epididymidis wird von den Ductuli efferentes und dem Initialsegment gebildet, dem Mittelsegment entspricht das Corpus epididymidis und das Terminalsegment bildet die Cauda epididymidis.

Das Epithel der Ductuli efferentes besteht aus Zilienzellen und zilienlosen Zellen, die an ihrer Oberfläche Mikrovilli tragen. Die zilienlosen Zellen konnten anhand des Vorkommens von Vakuolen und Granula in drei Subtypen unterteilt werden. Typ I Zellen enthalten weder Granula noch Vakuolen. Typ II Zellen enthalten in ihrem Zytoplasma zahlreiche elektronendichte Granula. Typ III Zellen beinhalten helle, unterschiedlich große Vakuolen.

Um Vimentin, Laminin, „ α -smooth-muscle-actin“, Pancytokeratin, Chromogranin A und die Hormonrezeptoren Östrogen Rezeptor α , Androgen Rezeptor und Progesteron Rezeptor im Nebenhoden zu lokalisieren, wurden immunhistochemische Untersuchungen mit der ABC-Methode durchgeführt. Alle genannten Antikörper zeigten, mit Ausnahme des Antikörpers gegen den Progesteron Rezeptor, im Nebenhoden ein charakteristisches Verteilungsmuster. Dabei fiel besonders die positive Immunreaktion auf Vimentin im Zytoplasma der Basalzellen im Initial- und Mittelsegment auf. Der Östrogen-Rezeptor α wurde in den Ductuli efferentes sowohl in den Zilienzellen als auch in den zilienlosen Zellen nachgewiesen. Eine starke Expression des Androgen-Rezeptors zeigte sich in den Haupt- und Basalzellen aller Gangabschnitte des Ductus epididymidis und in den Ductuli efferentes.

Die Untersuchung über die Verteilung von Saccharidgruppen im Nebenhoden des Hundes wurde mit 14 Fluoreszeinisothiocyanate (FITC)- konjugierten Lektinen durchgeführt (Con A, LCA, PSA, PNA, RCA, DBA, SBA, SJA, GSL I, WGA, WGAs, UEA, PHA E und PHA L). Die Ductuli efferentes und die sich anschließenden drei Gangabschnitte des Nebenhodens wiesen für alle untersuchten Lektine Bindungsstellen auf. SBA reagierte als einziges Lektin nur in den Ductuli efferentes, alle anderen sowohl in den Ductuli efferentes als auch in Initial-, Mittel- und Terminalsegment.

7 Summary

Immunohistochemical, ultrastructural and glycohistochemical studies of the canine epididymis (*canis familiaris*)

The epididymis of 10 clinical healthy dogs of different breeds and ages were examined using light- and electron-microscopic methods as well as immuno- and glycohistochemical techniques. The structure of the epididymis is essentially similar to that of other mammals. The epididymis of the dog can be divided into three different segments on the basis of histological and cytological features: the initial segment consisting of the head and the efferent ductules, the middle segment consisting of the corpus and the terminal segment consisting of the tail.

The epithelium of the efferent ductules consists of ciliated cells with cilia and cells without cilia that have microvilli on the surface. Cells that lack cilia can be differentiated in three subtypes according to the presence of vacuoles and granules. Type I cells contain neither vacuoles nor granules. Type II cells contain numerous electron dense granules in their cytoplasm. The cytoplasm of type III cells contains light vacuoles of different sizes.

Immunohistochemical stainings were conducted using the Avidin-Biotin-peroxidase Complex method to localize Vimentin, Laminin, α -smooth-muscle-actin (α -sma), Pancytokeratin, Chromogranin and the receptors for estrogen α , androgen and progesterone in the epididymis. All antibodies, except for the one for progesterone receptor, showed a characteristic distribution in the epididymis. The positive immune staining for vimentin in the cytoplasm of the basal cells in the initial and middle segments were especially interesting. Estrogen receptor α was found in the ciliated and non-ciliated cells of efferent ductules. The androgen receptor was distinctly expressed in the principal cells and basal cells of the epididymis and in epithelium of the ductules efferentes.

The examination of the distribution of saccharide groups in the epididymis of the dog was conducted with 14 fluoresceinisothiocyanate (FITC) conjugated lectins. The efferent ductules and the following parts of the duct of the epididymis contain binding sites for all examined lectins. SBA was the only lectin that bound only in the efferent ductules, while the other lectins recognised specific carbohydrate stimuli in the efferent ductules as well as in the initial, middle and terminal segment.

8 Verzeichnisse

8.1 Literaturverzeichnis

Alkafafy, M. (2005)

Glycohistochemical, immunohistochemical and ultrastructural studies of the bovine epididymis
Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München

Amann, R. P., R. H. Hammerstedt, D. N. R. Veeramachaneni (1993)

The epididymis and sperm maturation: a perspective
Reprod Fertil Dev 5: 361-381

Arenas, M., M. De Miguel, F. Bethencourt, B. Fraile, M. Royuela, R. Paniagua (1996)

Lectin histochemistry in the human epididymis
J Repro Fert 106: 313-320

Arrighi, S., F. Cremonesi, G. Bosi, C. Domeneghini (2004)

Endocrine-paracrine cells of the male urogenital apparatus: a comparative histochemical and immunohistochemical study in some domestic ungulates
Anat Histol Embryol 33: 225-232

Arrighi, S., M. G. Romanello, C. Domeneghini (1993)

Ultrastructure of epididymal epithelium in *Equus caballus*
Ann Anat 175: 1-9

Arrighi, S., M. G. Romanello, C. Domeneghini (1986)

Ultrastructural study on the epithelium lining ductus epididymis in adult cats (*Felis catus*)
Arch Biol 97: 7-24

Arya, M., T. Vanha-Perttula (1986)

Comparison of lectin-staining pattern in testis and epididymis of gerbil, guinea pig, mouse and nutria
Am J Anat 175: 449-469

Arya, M., T. Vanha-Perttula (1985)

Lectin-binding pattern of bull testis and epididymis
J Androl 6: 230-242

Arya, M., T. Vanha-Perttula (1984)

Distribution of lectin binding in rat testis and epididymis
Andrologia 16: 495-508

Bamberg, E. (1975)

Untersuchungen über die Spermienreifung im Nebenhoden
Habilitationsschrift, Tierärztliche Hochschule Wien

Bedford, J. M. (1973)

Components of sperm maturation in the human epididymis
Adv Biosci 10: 145-155

Bedford, J. M. (1975)

Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis
In: Handbook of Physiology, Section 7: Endocrinology 5: Male Reproductive System: 303

Boyd, W. C., E. Shapleigh (1954)

Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins)
Science 119: 419

Brooks, D. E. (1983)

Epididymal functions and their hormonal regulation
Aust J Biol Sci 6: 205-221

Busch, W., A. Holzmann (2001)

Veterinärmedizinische Andrologie
Schattauer Verlag Stuttgart

Castagnaro, M., F. Valenza (1990)

Lectin histochemistry of normal and neoplastic canine testicle
Schweiz Arch Tierheilk 132: 420-421

Chandler, J. A., F. Sinowatz, C. G. Pierrepoint (1981)

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

Connell, C. J. (1974)

The Sertoli cell of the sexually mature dog
Anat Rec 178: 333

Cooper, T. G. (1998)

Interactions between epididymal secretions and spermatozoa
J Reprod Fertil Suppl 53: 119-136

Crabo, B. (1965)

Studies on the composition of epididymal content in bulls and boars
Acta Vet Scand 6: 8-94

Dym, M., J. C. Caviccia (1978)

Functional morphology of the testis
Biol Rep 18: 1-15

Dym, M., D. W. Fawcett (1971)

Further observations on the number of spermatogonia, spermatocytes and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis
Biol Rep 4: 195-215

Ekblom, P. (1996)

Receptors for laminins during epithelial morphogenesis
Curr Opin Cell Biol 8: 700-706

Ergün, S., H. Ungefroren, A. F. Holstein, M. S. Davidoff (1997)

Estrogen and progesteron receptors and estrogen-related antigen (ER-D5) in human epididymis
Mol Repro Dev 47: 448-455

Ertl, C., K. H. Wrobel (1992)

Distribution of sugar residues in the bovine testis during postnatal ontogenesis demonstrated with lectin-horseradish peroxidase conjugates
Histochemistry 97: 161-171

Fawcett, D. W. (1975)

The mammalian spermatozoon
Dev Biol 44: 394-436

Foote, R. H., E. E. Swiestra, W. L. Hunt (1972)

Spermatogenesis in the dog

Anat Rec 173: 341-352

Gabius, H. J., H. Rüdiger, G. Uhlenbruck (1988)

Lektine

Spektrum der Wissenschaft: 50-60

Gaddum, P. (1968)

Sperm maturation in the male reproductive tract: development of motility

Anat Rec 161: 471-482

Gallagher, J. T. (1984)

Carbohydrate-binding properties of lectins: a possible approach to lectin nomenclature and classification

Biosci Rep 4: 621-632

Geneser, F. (1990)

Histologie

Deutscher Ärzteverlag, Köln

Glover, T. D., L. Nicander (1971)

Some aspects of structure and function in the mammalian epididymis

J Reprod Fert Suppl 13: 39-50

Goldstein, I. J., C. E. Hayes (1978)

The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals

Adv Carbohydr Chem Biochem 35: 127-340

Goldstein, I. J., R. D. Poretz (1986)

Isolation, physicochemical characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins

In: Properties and functions and application in biology and medicine (Eds: Liener, I. E., N. Sharon, I. J. Goldstein)

Academic Press, New York, London: 33-247

Goyal, H. O., F. F. Bartol, A. A. Wiley, C. W. Neff (1997)

Immunolocalization of receptors for androgen and estrogen in male caprine reproductive tissues: unique distribution of estrogen receptors in efferent ductule epithelium

Biol Reprod 56: 90-101

Goyal, H. O. (1985)

Morphology of the bovine epididymis

Am J Anat 172: 155-172

Goyal, H. O., F. Hrudka (1981)

Ductuli efferentes of the bull. A morphological, experimental and developmental study

Andrologia 13: 292-306

Goyal, H. O. (1980)

The resorptive activity in the bull efferent ductules. A morphological and experimental study

Andrologia 12: 401-404

Greenberg, J. (1979)

Zur Morphologie der Segmentabschnitte im Nebenhoden

Verh Anat Ges 73: 701-702

Guraya, S. S. (1987)

Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals

Springer Verlag Berlin, Heidelberg

Hamilton, D. W. (1972)

The mammalian epididymis

In: H. Balin, S. Glasser: Reproductive Biol: 268-337

Hees, H., F. Sinowatz (1992)

Männliche Geschlechtsorgane

In: Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie

Deutscher Ärzte Verlag, 3. Auflage: 325-338

Hemeida, N. A., W. O. Sack, K. McEntee (1978)

Ductuli efferentes in the epididymis of boar, goat, ram, bull and stallion

Am J Vet Res 39: 1892-1900

Hess, R. A., D. Bunick, J. Bahr (2001)

Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract- a review

Mol Cell Endocrin 178: 29-38

Hess, R. A., Q. Zhou, R. Nie, C. Oliveira, H. Cho, M. Nakai, K. Carnes (2001)

Estrogens and epididymal function

Reprod Fertil Dev 13: 273-283

Hess, R. A., D. Bunick, K. H. Lee, J. Bahr, J. A. Taylor, K. S. Korach (1997a)

A role for estrogens in the male reproductive system

Nature 390: 509-512

Holt, W. V. (1984)

Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoon

Int Rev Cytol 87: 159-194

Hsu, S. M., L. Raine, H. Fanger (1981)

Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques

J Histochem Cytochem 29: 577-580

Ibach, B., B. Weissbach, B. Hilscher (1976)

Stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the dog

Andrologia 8: 297-307

Ilio, K., R. Hess (1994)

Structure and function of the ductuli efferentes: a review

Microsc Res Tech 29: 432-467

Jones, R. (1998)

Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis

J Reprod Fertil Suppl 53: 73-84

Jones, R. (1989)

Membrane remodelling during sperm maturation in the epididymis

Oxt Rev Reprod Biol 11: 285-337

Kawakami, E., Y. Morita, T. Hori, T. Tsutsui (2002)

Lectin-binding characteristics and capacitation of canine epididymal spermatozoa

J Vet Med Sci 64: 543-549

König, H. E., H. G. Liebich (2004)

Männliche Geschlechtsorgane (*Organa genitalia masculina*)

In: Anatomie der Haussäugetiere

Schattauer Verlag: 119-127

Kolb, G. (1991)

Männliche Geschlechtsorgane

In: Vergleichende Histologie

Springer Lehrbuch, Heidelberg: 298-308

Kuhrau, J. (1993)

Histologische, ultrastrukturelle und histochemische Untersuchungen an Hoden und Nebenhoden des Pferdes (*Equus przewalskii „caballus“*)

Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München

Le Blond, C. P., Y. Clermont (1952)

Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat

Ann N. Y. Acad Sci 55: 548-573

Liebich, H. G. (2004)

Männliche Geschlechtsorgane (*Organa genitalia masculina*)

In: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Lehre

Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, 4 Auflage: 271-292

Liener, I. E., N. Sharon, I. J. Goldstein (1986)

The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine

Academic Press, New York, London

Lis, H., N. Sharon (1986)

Lectins as molecules and as tools

Ann Rev Biochem 55: 35-67

Lopez, M., P. Grez, I. Gribbel, E. Bustos-Obregon (1989)

Cytochemical and ultrastructural characteristics of the stallion epididymis (*Equus caballus*)

J Submicrosc Cytol Pathol 21: 103-120

Malmi, R., K. O. Söderström (1988)

Lectin binding in rat spermatogenic cells: effects of different fixation methods and proteolytic enzyme treatment

Histochem J: 276-282

Montkowski, A. (1992)

Lichtmikroskopische, ultrastrukturelle und glykohistochemische Untersuchungen am Hoden des Hundes (*Canis familiaris*)

Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München

Nelson, D., M. Cox (2001)

Glycokonjugate, Proteoglycane und Glycolipide

In: Lehninger Biochemie

Springer Verlag: 326-333

Nicander, L. (1964)

Fine structure and cytochemistry of nuclear inclusions in the dog epididymis

Exp Cell Res 34: 533-541

Nicander, L. (1958)

Studies on the regional histology and cytochemistry of the ductus epididymidis in stallions, rams and bulls

Acta morphol neerl scand 1: 337-362

Nicander, L. (1957)

On the regional histology and cytochemistry of the ductus epididymidis in rabbits

Acta morphol neerl scand 1: 99-118

Nickel, R., A. Schummer, E. Seiferle (1999)

Männliche Geschlechtsorgane (*Organa genitalia masculina*)

In: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band II

5. Auflage, Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg: 327-339

Nickel, R., A. Schummer, E. Seiferle (1999)

Männliche Geschlechtsorgane der Fleischfresser

In: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band II

5. Auflage, Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg: 349-350

Nie, R., Q. Zhou, E. Jassim, P. Saunders, R. Hess (2002)

Differential expression of estrogen receptors α and β in the reproductive tracts of adult male dogs and cats

Biol Reprod 66: 1161-1168

Orsi, A. M. (1983)

Regional histology of the epididymis of the dog. A light microscope study

Anat Anz Jena 153: 441-445

Palacios, J., J. Regadera, R. Paniagua, C. Gamallo, M. Nistal (1993)

Immunohistochemistry of the human ductus epididymis

Anat Rec 235: 560-566

Parlevliet, J. M., C. A. Pearl, M. F. Hess, T. R. Famula, J. F. Roser (2005)

Immunolocalization of estrogen and androgen receptors and steroid concentrations in the stallion epididymis

Theriogenology 2006, article in press

Pelletier, G., C. Labrie, F. Labrie (2000)

Localization of oestrogen receptor α , oestrogen receptor β and androgen receptors in the rat reproductive organs

J Endocrin 165: 359-370

Phillips, D. M. (1975)

Mammalian sperm structure

In: Handbook of Physiology, Section 7, V: 405-419

Prem, J. (1992)

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

Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München

Pühler, A., M. Regitz, R. Schmid (2000)

Lexikon Biochemie und Molekularbiologie

Georg Thieme Verlag

Rasband, W. S.

Image J, U.S. National Institutes of Health

Bethesda, Maryland, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2006

Reynolds, E. S. (1963)

The use of lead citrate at high ph as an electron-opaque stain in electron microscopy
J Cell Biol 17: 208-212

Robaire, B., R. Viger (1995)

Regulation of epididymal epithelial cell functions
Biol of Reprod 52; 226-236

Romeis, B. (1989)

Mikroskopische Technik
Urban und Schwarzenberger, München, 17. Auflage

Rovan, E. (2001)

Biochemie der Spermien
In: Busch, W. und A. Holzmann (Hrsg.): Veterinärmedizinische Andrologie
Schattauer Verlag, Stuttgart: 23-54

Rüsse, I., F. Sinowatz (1998)

Spermatogenese
In: Lehrbuch der Embryologie der Haustiere
Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg: 53-70

Ruff, T. (2005)

Ultrastrukturelle und immunhistochemische Untersuchungen am Nebenhoden des Katers
(*felis silvestris „familiaris“*)
Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München

Ruhl, S. (2001)

Immunzytochemische Lokalisation von Spermadhäsinen im Hoden und Nebenhoden des Hundes
(*canis familiaris*)
Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München

Sanchez, B., J. M. Flores, M. Pizarro, P. Garcia (1998)

Histological and immunohistochemical study of the cat epididymis
Anat Histol Embryol 27: 135-140

Schimming, B. C., C. A. Vicentini (2001)

Ultrastructural features in the epididymis of the dog (*Canis familiaris, L.*)
Anat Histol Embryol 30: 327-332

Schimming, B. C., C. A. Vicentini, A. M. Orsi, I. B. Franceschim-Vicentini, M. A. Abreu-Rays (1997)

Regional histology of the ductus epididymidis in the dog (*Canis familiaris*)

Rev Chil Anat 15: 5-12

Sharon, N. (1977)

Lectins

Scient Americ 236: 108-119

Sinowatz, F. (1992)

Männliche Geschlechtsorgane

In: H. Hees, F. Sinowatz: Histologie, Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie

Deutscher Ärzteverlag, Köln, 2. Auflage

Sinowatz, F., H. J. Gabius, J. K. Voglmayr, A. E. Friess (1989)

Cytochemical analysis of mammalian sperm membranes

Prog Histochem Cytochem 19: 1-71

Sinowatz, F., W. Amselgruber (1988)

Ultrastructure of sustentacular (sertoli) cells in the bovine testis

Acta Anatomica 133: 274-281

Sinowatz, F., A. E. Friess, W. Amselgruber (1988)

Zytochemischer Nachweis von Lektinbindungsstellen an epididymalen Spermien

Acta Histochem Suppl 36: 159-168

Sinowatz, F., K.-H. Wrobel, A. E. Friess (1985)

Histochemistry and cytochemistry of the mammalian epididymis

Acta Histochem Suppl 31: 151-158

Sinowatz, F. (1981)

Ultrastrukturelle und enzymhistochemische Untersuchung am Ductus epididymidis des Rindes

Fortschritte der Veterinärmedizin 32, Paul Parey Verlag

Sinowatz, F., M. Fischer, R. Skolek-Winnisch, J. A. Chandler (1979)

Histochemical localization of glycosidases in dog epididymis

Eur J Histochem 11: 103-109

Skalli, O., P. Popraz, A. Trzeciak, G. Benzonana, D. Gillessen, G. Gabbiani (1986).

A monoclonal antibody against α -smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation.

J Cell Biol 103:2787-2796

Söderström, K. O., R. Malmi, K. Karjalainen (1984)

Binding of fluorescein isothiocyanate conjugated lectins in rat spermatogenic cells in tissue sections. Enhancement of lectin fluorescence obtained by fixation in Bouins fluid.

Histochemistry 80: 575-579

Steffl, M., M. Schweiger, W. M. Amselgruber (2003)

Colocalization of chromogranin A and inositol 1,4,5-Trisphosphate receptor in ciliated cells of the bovine oviduct

Ann Anat 185: 103-108

Stryer, L. (1996)

Biochemie

Spektrum Akademischer Verlag: 500-502

Tekpetey, F. R., D. N. Veeramachanei, R. R. Amann (1989)

Localization of androgen receptors in ram epididymal principal cells

J Reprod Fertil 87: 311-319

Tekpetey, F. R., R. P. Amann (1988)

Regional and seasonal differences in concentrations of androgen and estrogen receptors in ram epididymal tissues

Biol Reprod 38.: 1051-1060

Töpfer-Petersen, E., J. J. Calvete, L. Sanz, F. Sinowatz (1995a)

Carbohydrate and heparin-binding proteins in mammalian fertilization. Review

Andrologia 27: 303-324

Ungefroren, H., R. Ivell, S. Ergün (1997)

Region specific expression of the androgen receptor in the human epididymis

Mol Hum Repro 3: 933-940

Vanderkerckhove, J., K. Weber (1981)

Actin typing on total cellular extracts: a highly sensitive protein-chemical procedure able to distinguish different actins

Eur J Biochem 113: 595-603

Wakui, S., M. Furusato, H. Takahashi, M. Motoya, S. Ushigome (1996)

Lectin histochemical evaluation of glycoconjugates in dog efferent ductules

J Anat 188: 541-546

Wakui, S., M. Furusato, S. Ushigome, Y. Kano (1994)

Coexpression of different cytokeratins, vimentin and desmin in the rete testis and epididymis in the dog

J Anat 184: 147-151

Wrobel, K.-H. (1990)

Männliche Geschlechtsorgane

In: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere

Mosimann, W., T. Kohler (eds.): 206-231

Wrobel, K.-H., E. Fallenbacher (1974)

Histologische und histochemische Untersuchungen am Nebenhodenepithel erwachsener Eber

Zuchthyg 9: 20-31

Zhu, L.-J., M. Hardy, I. Inigo, I. Huhtaniemi, C. Bardin (2000)

Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative immunohistochemical study

Biol Reprod 63: 368-376

Zunke, U., R. Gossrau (1981)

Morphology and zonal division of the ductus epididymidis of rats. Investigation of semithin-sections

Anat Anz 149: 409-424

8.2 Abkürzungsverzeichnis

AB	Alcianblau
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
BGW	Bindegewebe
BM	Basalmembran
BZ	Basalzellen
BPA	Bauhinia purpurea Agglutinin
CON A	Canavalia ensiformis
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DBA	Dolichos biflorus Agglutinin
DE	Ductuli efferentes
E	Epithel
ECA	Erythrina cristagalli Agglutinin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ER α	Östrogenrezeptor alpha
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FMP	Forward motility protein
FUC	Fukose
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
G	Gefäß
GA	Golgi-Apparat
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
GJ	Gap junction
GL	Glykogen
Glc	Glukose
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GSA	Griffonia simplicifolia Agglutinin

GS II	Griffonia simplicifolia II
GZ	Golgi-Zone
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPA	Helix pomatia Agglutinin
HZ	Hauptzellen
I	Interstitium
IN	Invagination
IS	Initialsegment
JC	Junctional complexes
K	Kinozilien
KE	Kerneinschluss
LAA	Laburnum alpinum Agglutinin
LBA	Phaseolus limensis Agglutinin
LCA	Leus culinaris Agglutinin
LFA	Limax flavus Agglutinin
LPA	Limulus polyphemus Agglutinin
LTA	Lotus tetragonolobus Agglutinin
LU	Lumen
LY	Lymphozyten
Man	Mannose
MI	Mitochondrien
MPA	Macula pomifera Agglutinin
MS	Mittelsegment
MZ	Muskelzelle
MZL	Muskelzelllage
N	Nukleus
NK	Nukleolus
NV	Nerv
PAS	Perjodic Acid Schiff
PBS	Phosphate buffered saline-Puffer

PHA	Phaseolus vulgaris Agglutinin
PNA	Arachis hypogaea Agglutinin
PSA	Pisum sativum Agglutinin
RCA	Ricinus communis Agglutinin
RER	Raues endoplasmatisches Retikulum
SB	Scalebar
SBA	Glycine max Agglutinin
SK	Spermienköpfe
SMA	Smooth-muscle-actin
SP	Spermium
SS	Spermienschwänze
STA	Solanum tuberosum Agglutinin
SZ	Stereozilien
T	Tier
TJ	Tight junctions
TS	Terminalsegment
UEA	Ulex europaeus Agglutinin
V	Vesikel
VA	Vakuole
VVA	Visea villosa Agglutinin
WGA	Triticum vulgare Agglutinin
ZP	Zytoplasma

8.3 Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1	Einteilung der Lektine nach ihrer Zuckerbindungsspezifität (Goldstein und Poretz, 1986)	14
Tab. 2	Übersicht über die verwendeten Tiere.....	19
Tab. 3	Übersicht über die verwendeten Antikörper	24
Tab. 4	Übersicht über die in der Studie verwendeten FITC-markierten Lektine.....	28
Tab. 5	Histomorphologische Befunde der Ductuli efferentes	32
Tab. 6	Histomorphologische Befunde des Initialsegmentes.....	35
Tab. 7	Histomorphologische Befunde des Mittelsegmentes.....	37
Tab. 8	Histomorphologische Befunde des Terminalsegmentes	39
Tab. 9	Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin	44
Tab. 10	Immunhistochemischer Nachweis von Laminin.....	47
Tab. 11	Immunhistochemischer Nachweis von Östrogen-Rezeptor α (ER α)	49
Tab. 12	Immunhistochemischer Nachweis von α -sma	52
Tab. 13	Immunhistochemischer Nachweis von Pancytokeratin	55
Tab. 14	Immunhistochemischer Nachweis von Chromogranin A.....	58
Tab. 15	Immunhistochemischer Nachweis des Androgen-Rezeptors	61
Tab. 16	Verteilung der Bindungsstellen von FITC-markierten Lektinen in den Ductuli efferentes	67
Tab. 17	Übersicht über die Bindungsstellen von Lektinen im Ductus epididymidis des Hundes.....	68

8.4 Verzeichnis der Bilder

Bild 1:	Ductuli efferentes, Goldner-Färbung	31
Bild 2:	Epithel der Ductuli efferentes, Goldner-Färbung.....	31
Bild 3:	Ductuli efferentes, PAS-Färbung	31
Bild 4:	Ductuli efferentes, Alcianblau-Färbung bei pH 2,5.....	31
Bild 5:	Ductuli efferentes und Initialsegment	32
Bild 6:	Initialsegment, HE-Färbung.....	34
Bild 7:	Initialsegment, PAS-Färbung mit Amylase	34
Bild 8:	Initialsegment, PAS-Färbung	34
Bild 9:	Gefäß im Initialsegment, PAS-Färbung.....	34
Bild 10:	Mittelsegment, Goldner-Färbung.....	36
Bild 11:	Mittelsegment, Alcianblau-Färbung bei pH 2,5.....	36
Bild 12:	Mittelsegment, HE-Färbung.....	36
Bild 13:	Mittelsegment, HE-Färbung.....	36
Bild 14:	Terminalsegment, PAS-Färbung	38
Bild 15:	Terminalsegment, PAS-Färbung	38

Bild 16: Grafische Darstellung der Epithelhöhen.....	40
Bild 17: Graphische Darstellung der Lumendurchmesser.....	41
Bild 18: Ductuli efferentes, immunhistochemischer Nachweis von Vimentin.....	43
Bild 19: Mittelsegment, immunhistochemischer Nachweis von Vimentin.....	43
Bild 20: Terminalsegment, immunhistochemischer Nachweis von Vimentin.....	43
Bild 21: Initialsegment, immunhistochemischer Nachweis von Vimentin.....	43
Bild 22: Ductuli efferentes, immunhistochemischer Nachweis von Laminin.....	46
Bild 23: Initialsegment, immunhistochemischer Nachweis von Laminin.....	46
Bild 24: Mittelsegment, immunhistochemischer Nachweis von Laminin.....	46
Bild 25: Terminalsegment, immunhistochemischer Nachweis von Laminin.....	46
Bild 26: Ductuli efferentes, immunhistochemischer Nachweis des Östrogen-Rezeptors.....	48
Bild 27: Terminalsegment, immunhistochemischer Nachweis des Östrogen-Rezeptors.....	48
Bild 28: Grafische Darstellung der Anteile ER-alpha schwach und stark positiver Zellen in den Ductuli efferentes.....	50
Bild 29: Ductuli efferentes, immunhistochemischer Nachweis von α -sma.....	51
Bild 30: Initialsegment, immunhistochemischer Nachweis von α -sma.....	51
Bild 31: Mittelsegment, immunhistochemischer Nachweis von α -sma.....	51
Bild 32: Terminalsegment, immunhistochemischer Nachweis von α -sma.....	51
Bild 33: Ductuli efferentes, immunhistochemischer Nachweis von Pancytokeratin.....	54
Bild 34: Initialsegment, immunhistochemischer Nachweis von Pancytokeratin.....	54
Bild 35: Mittelsegment, immunhistochemischer Nachweis von Pancytokeratin.....	54
Bild 36: Ductuli efferentes, immunhistochemischer Nachweis von Chromogranin A.....	57
Bild 37: Mittelsegment, immunhistochemischer Nachweis von Chromogranin A.....	57
Bild 38: Terminalsegment, immunhistochemischer Nachweis von Chromogranin A.....	57
Bild 39: Terminalsegment, immunhistochemischer Nachweis von Chromogranin A.....	57
Bild 40: Ductuli efferentes, immunhistochemischer Nachweis des Androgen-Rezeptors.....	60
Bild 41: Initialsegment, immunhistochemischer Nachweis des Androgen-Rezeptors.....	60
Bild 42: Mittelsegment, immunhistochemischer Nachweis des Androgen-Rezeptors.....	60
Bild 43: Grafische Darstellung der Expressionsstärke des Androgen-Rezeptors.....	62
Bild 44: WGA-Bindung in den Ductuli efferentes und im Initialsegment.....	70
Bild 45: WGAs-Bindung in den Ductuli efferentes und im Initialsegment.....	70
Bild 46: UEA-Bindung in den Ductuli efferentes.....	70
Bild 47: LCA-Bindung im Terminalsegment.....	70
Bild 48: PHA E-Bindung im Initialsegment.....	71
Bild 49: PHA L-Bindung im Initialsegment.....	71
Bild 50: Con A-Bindung im Initialsegment.....	71
Bild 51: PSA-Bindung im Terminalsegment.....	71
Bild 52: PNA-Bindung in den Ductuli efferentes.....	72

Bild 53: RCA-Bindung in den Ductuli efferentes.....	72
Bild 54: DBA-Bindung in den Ductuli efferentes.....	72
Bild 55: GSL I-Bindung in den Ductuli efferentes.....	72
Bild 56: Übersicht über das mehrreihige Epithel der Ductuli efferentes.....	74
Bild 57: Apikalbereich der Ductuli efferentes testis.....	75
Bild 58: Apikale Zytoplasmazone der Ductuli efferentes.....	76
Bild 59: Übersicht über den Basalbereich der Ductuli efferentes.....	77
Bild 60: Basalbereich der Ductuli efferentes.....	78
Bild 61: Übersicht über das mehrreihige, hochprismatische Epithel des Initialsegmentes....	80
Bild 62: Elektronenmikroskopische Darstellung des Lumens des Initialsegmentes.....	81
Bild 63: Apikalregion des Epithels des Initialsegmentes.....	82
Bild 64: Darstellung der Hauptzellen im Initialsegment.....	83
Bild 65: Kerneinschlüsse in den Zellkernen der Hauptzellen des Initialsegmentes.....	84
Bild 66: Basalregion des Initialsegmentes.....	85
Bild 67: Übersicht über das mehrreihige, hochprismatische Epithel des Mittelsegmentes ...	87
Bild 68: Apikalbereich des Mittelsegmentes.....	88
Bild 69: Lumen und Apikalbereich des Mittelsegmentes.....	89
Bild 70: Mikropinozytose im Apikalbereich des Mittelsegmentes.....	90
Bild 71: Zellverbindungen im Apikalbereich des Mittelsegmentes.....	91
Bild 72: Golgi-Zone des Mittelsegmentes.....	92
Bild 73: Supranukleärer Epithelbereich des Mittelsegmentes.....	93
Bild 74: Übersicht über den supranukleären Epithelbereich des Mittelsegmentes.....	94
Bild 75: Übersicht über den Basalbereich des Mittelsegmentes.....	95
Bild 76: Basaler Epithelbereich des Mittelsegmentes.....	96
Bild 77: Übersicht über das hochprismatische Epithel des Terminalsegmentes.....	98
Bild 78: Darstellung des Apikalbereiches des Terminalsegmentes.....	99
Bild 79: Stereozilienbesatz des Terminalsegmentes.....	100
Bild 80: Darstellung der Zellverbindungen im Terminalsegment.....	101
Bild 81: Übersicht über den Basalbereich des Terminalsegmentes.....	102
Bild 82: Darstellung der Basalmembran im Terminalsegmentes.....	103
Bild 83: Basalbereich des Terminalsegmentes mit lysosomalen Abbauprodukten.....	104
Bild 84: Glykogenansammlung im Basalbereich des Terminalsegmentes.....	105
Bild 85: Kerneinschluss im Zellkern einer Hauptzelle des Terminalsegmentes.....	106

9 Methodik

Lösungen für die Lichtmikroskopie

Bouin'sche Lösung:

15 ml gesättigte Pikrinsäure¹

5 ml 35 %iges Formalin¹

1 ml Eisessig¹

Methanol-Eisessig-Lösung:

Methanol und Eisessig im Verhältnis 2:1

Formalin:

35 %iges Formalin verdünnen im Verhältnis 1:10

PBS (Phosphate Buffered Saline), pH 7,4:

NaCl ¹	42,50 g
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O ¹	6,35 g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O ¹	1,95 g
Aqua dest.	ad 5,00 l
pH auf 7,4 einstellen	

TRIS-Puffer, pH 6,8 :

NaCl	43,90 g
TRIZMA-HCL ²	34,25 g
TRIZMA-Base ²	4,50 g
Aqua dest.	ad 5,00 l
pH auf 6,8 einstellen	

DAB (3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid)-Wasserstoffperoxid-Lösung:

Lösung A:

Aqua dest.	60 ml
DAB ⁶	6 Tabletten

Lösung B:

Aqua dest.	5 ml
30 % H ₂ O ₂ ¹	15 µl

Gebrauchslösung:

Lösung A	60 ml
Lösung B	400 µl

gut mischen und filtrieren

Lösungen für die ElektronenmikroskopieFixierlösung nach Karnovsky:

10 % Paraformaldehyd-Lösung:

Paraformaldehyd ¹	10 g
Aqua dest.	ad 100 ml
NaOH, 1 M ¹	bis zu 6 Tropfen

Karnovsky-Stammlösung:

Paraformaldehyd-Lösung	20 ml
Cacodylat-Puffer, 0,2 M	50 ml
Kalziumchlorid, wasserfrei ⁵	0,05 g

Karnovsky-Gebrauchslösung:

Karnovsky-Stammlösung	10 ml
Glutaraldehyd, 2,5 % ⁴	1,37 ml

Propylenoxid:Propylenoxid¹**Kontrastierungslösung:****Osmiumtetroxid-Lösung, 2 %:**

Osmiumtetroxid, 4 %ig ³	2 ml
Cacodylat-Puffer, 0,1 M	2 ml

Kaliumferrocyanid-Lösung, 3 %:

Kaliumferrocyanid ²	0,3 g
Cacodylat-Puffer, 0,1 M	ad 10 ml

Osmiumtetroxid (1 %)-Kaliumferrocyanid (1,5 %) in Cacodylat-Puffer, 0,1 M:

Osmiumtetroxid-Lösung, 2 %	4 ml
Kaliumferrocyanid-Lösung, 3 %	4 ml

Cacodylat-Puffer:**Lösung A:**

Cacodylat $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ ⁴	8,56 g
Aqua dest.	ad 200 ml

Lösung B:

HCl 0,2 M¹

Cacodylat-Puffer 0,2 M, pH 7,2

Lösung A	50,0 ml
Lösung B	4,2 ml
Aqua dest.	ad 100,0 ml

Cacodylat-Puffer 0,1 M, pH 7,2 :

Cacodylat-Puffer 0,2 M	50 ml
Aqua dest.	50 ml

Epon :

Poly/bed 812 ³	16 ml
DDSA ³	10 ml
NMA ³	9 ml
DMP-30 ³	0,3 - 0,5 ml

Bleicitrat-Lösung nach Reynolds:

Natriumcitrat Stock:

Natriumcitrat Na ₃ (C ₆ H ₅ O ₇) x 2 H ₂ O ¹	35,7 g
Aqua dest.	ad 100 ml

Bleinitrat Stock:

Bleinitrat Pb (NO ₃) ₂ ¹	33,1 g
Aqua dest.	ad 100 ml

Bleicitrat-Lösung:

Aqua dest.	16 ml
Natriumcitrat Stock	3 ml
Bleinitrat Stock	2 ml
NaOH, 1 M ¹	4 ml
Aqua dest.	ad 100 ml

- 1 Merck, Darmstadt
- 2 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- 3 Polysciences Inc., Warrington, USA
- 4 Agar Scientific LTD, Essex, England
- 5 Serva, Heidelberg
- 6 Kem-En-Tec, Kobenhavn, Dänemark

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Barbara Schick
Geburtsdatum	28.09.1974
Geburtsort	Heilbronn
Familienstand	Ledig
Eltern	Heidi Schick, geb. Rettstatt Gerd Schick
Geschwister	Peter Schick

Schul- und Berufsausbildung

09/1995 – 07/1997	Berufsausbildung zur Bankkauffrau mit Zusatzqualifikation Finanzassistentin bei der Kreissparkasse Heilbronn
08/1985 – 06/1994	Mönchseegymnasium Heilbronn Abschluss Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium

03/2004	Approbation
02/2004	Bestehen des Staatsexamen
10/1998 – 03/2004	Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

11 Danksagung

Für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die jederzeitige freundliche Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz sehr herzlich danken.

Bei Frau C. Zahn, Frau G. Rußmeier und Frau Dr. S. Schuster bedanke ich mich für die Einarbeitung in lichtmikroskopische-, immun- und glykohistochemische Techniken. Frau C. Neumüller danke ich für ihren engagierten Einsatz bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Frau M. Kazior danke ich für ihre Hilfe bezüglich aller organisatorischen Fragen. Vielmals bedanken möchte ich mich auch bei Frau M. Vermehren und Frau Dr. R. Kenngott für ihre große, nicht nur fachliche Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn Dr. F. Habermann, der sich zu jeder Zeit geduldig aller großen und kleinen Probleme der Statistik, Daten und Textverarbeitung angenommen hat und immer mit fachkundigem Rat zur Stelle war.

Frau Dr. Marion Böhm danke ich für ihren tollen Einsatz bei der Probenentnahme, das Korrekturlesen und vor allem ihre Einführung in die praktische Welt der Kleintiermedizin.

Herr Jörg Knepper war mir bei der Durchsicht des Manuskripts eine große Hilfe. Dafür vielen Dank.

Ich bedanke mich von Herzen bei meinen Heilbronner und Münchner Freunden, die immer für mich da sind! Danke für ihr großes Verständnis, ihre Unterstützung, Aufmunterung, kulinarische Höhepunkte und Beratung in allen Lebenslagen.

Für Jonna: könnte ich singen und hätte ich ein Millionenpublikum...wirklich niemand hätte es mehr verdient als du!!

Meinem Bruder Peter und Jule danke ich sehr für ihren Zuspruch und für Felix.

Ich widme diese Arbeit meinen großartigen Eltern, die mir nicht nur diesen Traum ermöglicht haben. Worte können nur schwer ausdrücken, wie sehr ich ihnen für ihre Liebe, ihre Unterstützung und ihr großes Vertrauen in mich dankbar bin!